

Biosíntesis de auxinas y papel del ácido indol-3-acético como molécula señal en *Pseudomonas savastanoi*: aproximación genómica, transcriptómica y metabolómica

ADRIÁN PINTADO CALVILLO

Dirigida por CAYO RAMOS RODRÍGUEZ

Facultad de Ciencias


Universidad de Málaga – IHSM – CSIC





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Adrián Pintado Calvillo

 <http://orcid.org/0000-0001-6045-3018>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Memoria presentada por:

ADRIÁN PINTADO CALVILLO

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga

**Biosíntesis de auxinas y papel del ácido indol-3-acético
como molécula señal en *Pseudomonas savastanoi*:
aproximación genómica, transcriptómica y metabolómica**

Director: **CAYO J. RAMOS RODRÍGUEZ**

Área de Genética.

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga

Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM)
Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Málaga, 2020

COMITÉ EVALUADOR

Presidente

Dr. Antonio De Vicente Moreno

Departamento de Microbiología

Universidad de Málaga

Secretaria

Dra. Victoria Pastor

Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural

Universidad Jaume I

Vocal

Dr. Víctor Carrión Bravo

Instituto de Biología Leiden

Universidad de Leiden

Suplentes

Dr. Francisco Manuel Cazorla López

Departamento de Microbiología

Universidad de Málaga

Dra. Emilia López Solanilla

Departamento de Biotecnología

Universidad Politécnica de Madrid

Dra. Isabel María Matas Casado

Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar (ICBAS)

Universidad de Oporto



Área de Genética.

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga

Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM)
Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CAYO J. RAMOS RODRÍGUEZ, Catedrático del Área de Genética del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga.

INFORMA:

Que **ADRIÁN PINTADO CALVILLO** ha realizado en este Departamento y bajo mi dirección el trabajo titulado “**Biosíntesis de auxinas y papel del ácido indol-3-acético como molécula señal en *Pseudomonas savastanoi*: aproximación genómica, transcriptómica y metabolómica**”, que constituye su memoria de Tesis Doctoral para aspirar al grado de Doctor con Mención Internacional en el Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada. Y para que así conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento con la legislación vigente, extiendo el presente informe.

En Málaga, a 20 de Octubre de 2020

Fdo: Cayo J. Ramos Rodríguez



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ADRIÁN PINTADO CALVILLO

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: BIOSÍNTESIS DE AUXINAS Y PAPEL DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO COMO MOLÉCULA SEÑAL EN PSEUDOMONAS SAVASTANOI: APROXIMACIÓN GENÓMICA, TRANSCRIPTÓMICA Y METABOLÓMICA

Realizada bajo la tutorización de CAYO J. RAMOS RODRÍGUEZ y dirección de CAYO J. RAMOS RODRÍGUEZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 20 de Octubre de 2020

Fdo.: ADRIÁN PINTADO CALVILLO



A mi familia

A Pixel

Una Tesis Doctoral de
ADRIAN PINTADO CALVILLO

Dirigida por
CAYO RAMOS RODRIGUEZ

Realizada con la colaboración y el apoyo de

Marisa Antequera	Dolores Fernández	Julia Pastor
Maite Añorga	Víctor Flors	Isabel Pérez
Francesca Aprile	Jordi Gamir	Ana Pérez
Isabel Aragón	Pablo García	Alejandro Pérez
Antonio Arroyo	Soon Go Lee	Álvaro Polonio
Carmen Beuzón	Ana González	Paola Rallo
Eloy Caballo	Montse Grife	Diana Ramírez
Jesús Cámara	José Antonio Gutiérrez	Luis Rodríguez
Pepe Cana	Zaira Heredia	Eduardo Rodríguez
Joaquín Caro	Carla Lavado	Beatriz Romero
Pilar Castañeda	Jesús Leal	Diego Romero
Araceli Castillo	Irene Linares	Javier Rueda
Francisco Cazorla	Diego López	José Rufián
Miguel Cerezo	Nieves López	Javier Ruíz
Jesús Cruz	Unzu López	Blanca Sabarit
Antonio De Vicente	Laura Martín	Paloma Sánchez
Ángel Del Espino	Marta Martínez	Carlos Sánchez
Belén Delgado	Carlos Molina	Neus Sanmartín
Daniel Di Zeo	Saray Morales	María Teresa Soto
Luis Díaz	Alba Moreno	Sandra Tienda
Eduardo Domínguez	Irina Murieva	José Antonio Torés
Hilario Domínguez	Jesús Murillo	Sito Torres
Laura Domínguez	Begoña Orozco	Carmen Vida
José Antonio Duarte	Nadira Oukala	Alejandra Vielva
Mario Fenech	Victoria Pastor	Patricia Viñas

GRACIAS A TODOS

“Stay hungry, stay foolish”

Steve Jobs

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2014-53242-C2-1-R y AGL2017-82492-C2-1-R del Plan Nacional I+D del Ministerio de Economía y Competitividad (cofinanciado por FEDER) y por la Beca para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) FPU14/05551

| ÍNDICE |

Abreviaturas y acrónimos	23
Abstract	31
Introducción general	49
El complejo <i>Pseudomonas syringae</i>	51
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	54
Factores de virulencia de <i>Pseudomonas savastanoi</i>	56
Producción de fitohormonas	64
Objetivos	75
Capítulo 1	79
Introducción	81
Material y métodos	85
Resultados	89
Discusión	103
Anexos	110
Capítulo 2	115
Introducción	117
Material y métodos	120
Resultados	180
Discusión	144
Capítulo 3	151
Introducción	153
Material y métodos	156
Resultados	158
Discusión	172
Capítulo 4	181
Introducción	183
Material y métodos	187
Resultados	197
Discusión	222
Discusión general	231
Conclusiones	245
Conclusions	249
Bibliografía	253
Apéndices	285

| ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS |

A

aa: aminoácido

ADP: Adenosín difosfato

AHL: N-Acil Homoserina Lactona

Ala: Alanina

ald: Aldehído deshidrogenasa

AMP: Adenosín monofosfato

ARFs: Factor de respuesta a auxinas

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

ATP: Adenosín trifosfato

AuxRE: Elemento de respuesta a auxinas

B

BPGA: del inglés, *Bacterial Pan Genome Analysis*

BSA: seroalbúmina bovina

C

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CFBP: *Collection Française de Bactéries Phytopathogènes*

Cis: Cisteína

CK: Citoquininas

D

DAPP: *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia*

di-GMPc: Monofosfato dimérico cíclico de la guanosina

DMAPP: Dimetilalil difosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditiotreitól

E

ESI: Ionización por electroespray

G

GH3: GRETCHEN HAGEN 3

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

H

His: Histidina

HMBDP: Hidroximetilbutenil difosfato

HR: Respuesta hipersensible

hrc: del inglés, *hypersensitive response and conserved*

hrp: del inglés, *hypersensitive response and pathogenicity*

I

IAA: Indol-3-acético

IAA-Lys: 3-indol-acetil- ϵ -L-lisina

IAAId: Indol-3-acetaldehído

IAM: Indol-3-acetamida

IAN: Indol-3-acetonitrilo

IAOx: Indol-3-acetaldoxima

ICMP: *International Collection of Microorganisms from Plants*

Ile: Isoleucina

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

IPyA: Indol-3-piruvato

K

Km: Kanamicina

L**LB:** Medio de cultivo lisogénico**Leu:** Leucina**Lys:** Lisina**M****Met:** Metionina**MG:** Medio mínimo manitol-glutamato**MLSA:** Análisis multilocus de secuencia**mRNA:** RNA mensajero**N****NCPPB:** *National Collection of Plant Pathogenic Bacteria***Nf:** Nitrofurantoína**O****OxIAA:** Oxindol-3-acético**P****PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa**PG:** Filogruppo**Phe:** Fenilalanina**Pro:** Prolina**PS:** Peso seco**Psf:** *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini***Psm:** *Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae***Psn:** *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii***Psr:** *Pseudomonas savastanoi* pv. *retacarpa***Psv:** *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi***Pto:** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***pv.:** patovar

Q

Q-TOF: Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo

QS: *quorum sensing*

R

RNA: Ácido ribonucleico

RND: transportador de tipo acridina

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S

Ser: Serina

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

SOB: Medio de cultivo súper óptimo

sRNA: Pequeño RNA

T

T2SS: Sistema de secreción tipo II

T3SS: Sistema de secreción tipo III

T4SS: Sistema de secreción tipo IV

T6SS: Sistema de secreción tipo VI

TAM: Triptamina

TC: Tasa de cambio

Thr: Treonina

Tm: Temperatura de *melting*

TQD: Detector de triple cuadrupolo

tRNA: RNA de transferencia

Trp: Triptófano

TSO: Cadena de oxidación lateral del triptófano

Tyr: Tirosina

U

UPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

V

Val: Valina

W

WHOP: del inglés, Woody Host and P*seudomonas*

| ABSTRACT |

ABSTRACT

Introduction

The *Pseudomonas syringae* complex is composed of an enormous number of Gram-negative bacteria responsible for causing various diseases in agronomically important crops (Mansfield et al., 2012). The bacteria belonging to this complex are generally associated with plants, however, environmental isolates of *P. syringae* have also been described from non-plant reservoirs or from components of the water cycle, such as soil, clouds or precipitation (Morris et al., 2013). This complex is made up of 15 different species taxonomically closely related. The strains of the *P. syringae* complex are divided into 9 genomespecies using methods based on DNA-DNA hybridizations (Gardan et al., 1999; Marcelletti and Scortichini et al., 2014) and into 13 phylogroups, applying MultiLocus Sequence Analysis (MLSA) to the genes present in all strains (core) of *P. syringae* (Berge et al., 2014; Gomila et al., 2017). In addition, these phylogroups are divided into primary phylogroups (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 10), monophyletic and mainly composed of agricultural isolates, and secondary (7, 8, 9, 11, 12 and 13) where numerous environmental isolates are included (Dillon et al., 2019). Based on its host range, the *P. syringae* complex is subdivided into more than 65 pathovars (pv.), composed of genetically related bacteria that share specificity in their host range (Sakar et al., 2004; Hwang et al., 2005; Almeida et al., 2010; Bull et al., 2011; Berge et al., 2014).

The host range of these bacteria is made up of more than 180 species of plants, although most of the strains isolated from agricultural crops show a high degree of specialization to their host and most only have the ability to infect a single host plant (Baltrus et al., 2011; Morris et al., 2013; Berge et al., 2014; Monteil et al., 2016; Dillon et al., 2019). Recent work has identified a continuous overlap of their host range in the *P. syringae* complex strains, concluding that the pathovar classification do not necessarily correspond to the biology of *P. syringae* (Morris et al., 2019). Therefore, the ability to integrate phenotypic, genomic and evolutionary data make the *P. syringae* complex one of the most relevant models

for studying the evolution of host specificity in phytopathogenic bacteria (O'Brien et al., 2011; Vinatzer et al., 2014; Baltrus et al., 2017; Hulin et al., 2018; Dillon et al., 2019a).

The *P. savastanoi* species includes five pathovars capable of producing tumors or outgrowths in woody hosts, such as *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn), *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (Psr), *P. savastanoi* pv. *fraxini* (Psf) and *P. savastanoi* pv. *mandevillae* (Psm). The *P. savastanoi* species also belongs to phylogroup 3, the only phylogroup of the *P. syringae* complex that includes bacteria that cause tumors in woody hosts, such as Psv, Psn, Psr, Psm, *P. meliae*, *P. tremae* and the patovares from *P. syringae* *cerasicola*, *daphniphylli*, *dendropanacis*, *myricae*, and *rhaphiolepidis*. However, non-woody host pathogens are found, such as *P. savastanoi* pv. *glycinea* and *phaseolicola*, (Berge et al., 2014; Lamichhane et al., 2014; Caballo-Ponce et al., 2017), although through phylogenetic analysis of the core strains of the *P. syringae* complex have shown that strains of Psv, Psn, Psf and Psr are phylogenetically closer to other phytopathogenic bacteria than to the pathovars *glycinea* and *phaseolicola* (Nowell et al., 2014; Baltrus et al., 2017). Therefore, in this Doctoral Thesis, the pathovars *glycinea* and *phaseolicola* are included within the species *P. syringae* and are not considered within the species *P. savastanoi*.

Among the symptoms induced by *P. savastanoi*, hyperplastic growths (tumors) and the production of cankers on stems and branches stand out. Psv, Psn, Psr, Psf and Psm correspond to isolated strains of olive (*Olea europaea*), oleander (*Nerium oleander*), ash (*Fraxinus Excelsior*), broom (*Retama sphaerocarpa*) and dipladenia (*Mandevilla spp.*), respectively (Janse, 1981; Gardan et al., 1992; Bull et al., 2010; Caballo-Ponce et al., 2017). Through cross-pathogenicity tests it has been determined that the strains of Psv, Psn and Psm produce tumors in olive and ash, while Psn and Psm also infect oleander and dipladenia, respectively. Psf isolates produce cankers accompanied by outgrowths on both ash and olive trees. In contrast, Psr restricts its host range to broom (Janse, 1982; Janse, 1991;

Alvarez et al., 1998; Iacobellis et al., 1998; Ramos et al., 2012; Eltlbany et al., 2012; Caballo-Ponce et al., 2017; Moreno-Perez et al., 2020).

The establishment of a good plant material and the development of virulence assays in micropropagated olive plants (Rodríguez-Moreno et al., 2008), and with the sequencing of the Psv NCPPB 3335 genomic draft (Rodríguez-Palenzuela et al., 2010), the first genome of *P. savastanoi* sequenced, as well as the complete sequence of its three plasmids (Bardaji et al., 2011), makes Psv NCPBB 3335 a model bacterium for the study of factors that determine interactions with woody hosts (Matas et al., 2012; Ramos et al., 2012), allowing the identification of a wide repertoire of genes involved in virulence. In recent years, a series of factors necessary for the adaptation and virulence of Psv in micropropagated and lignified olive plants have been identified in Psv NCPPB 3335. Among the virulence factors described in Psv NCPPB 3335 are the production of phytohormones, such as indole-3-acetic acid (IAA) and cytokinins (CKs), the presence of a functional type III secretion system (T3SS), communication bacterial through quorum sensing (QS), calcium or di-GMP-cyclic metabolism and the presence of a 15 kb region called WHOP (Woody Host and *Pseudomonas*), which is involved in the metabolism of aromatic compounds (Caballo-Ponce et al., 2017). In addition to the above virulence and pathogenicity factors, additional mechanisms or metabolic pathways necessary for the virulence of Psv NCPPB 3335 in olive plants have also been identified, such as genes involved in amino acid biosynthesis, genes related to vitamin biosynthesis or citrate, sulfate and amino acids transporters. In addition, genes related to type II and IV secretion systems, proteins involved in stress tolerance, and hydrolytic enzymes involved in cell wall biosynthesis were also identified (Matas et al., 2012).

In this Doctoral Thesis we have focused on the analysis of the auxin production, which play a relevant role in the growth and development of plant tissues (Santner and Estelle, 2009; Kieffer et al., 2010). In plants, indole-3-acetic acid (IAA) is the most relevant auxin in terms of its quantity and activity, whose homeostasis is

mediated by a complex network of processes related to its biosynthesis, catabolism, conjugation, signaling and transport (Ljung et al., 2013). Many plant-associated bacteria have the ability to produce IAA, being able to change the auxin balance of the plant and interfering with its development, therefore this phytohormone has been described as a pathogenicity and virulence factor in phytopathogenic bacteria (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Patten et al., 2013). The IAA production routes described in bacteria and plants show a high degree of similarity. To date, five IAA biosynthetic pathways have been described using the amino acid L-tryptophan (Trp) as a precursor. These routes are defined as: indole-3-acetamide (IAM), indole-3-pyruvate (IPyA), tryptamine (TAM), indole-3-acetonitrile (IAN) and the tryptophan side chain oxidase pathway (TSO) (Patten et al., 2013; Spaepen et al., 2007).

In *P. savastanoi*, IAA biosynthesis occurs via the IAM pathway, the IAA biosynthesis pathway best characterized in plant tumor-inducing phytopathogenic bacteria and characterized for the first time in the phytopathogenic bacteria *A. tumefaciens* and *P. savastanoi* (Smidt and Kosuge, 1978; Thomashow et al., 1984). Trp is initially converted into IAM by the action of the enzyme tryptophan 2-monooxygenase (*iaaM* gene) and is subsequently transformed into IAA through a reaction catalyzed by the indole-3-acetamide hydrolase enzyme (*iaaH* gene) (Kosuge et al., 1966; Magie et al., 1963). The *iaaM* and *iaaH* genes are organized in an operon (*iaaMH*) and Psv strains frequently encode two copies of the *iaaMH* operon (called *iaaMH1* and *iaaMH2*), both with a predominantly chromosomal location (Perez-Martinez et al., 2008; Rodríguez -Palenzuela et al., 2010). In Psv NCPPB 3335, the *iaaM2* gene has an insertion of 22 nucleotides and by the construction of mutants in both operons it has been shown that IAA biosynthesis depends solely on the *iaaMH1* operon functionality, since inactivated mutant strains in the *iaaMH2* operon produced amounts of IAA similar to the wild type strain (Aragón et al., 2014). Interestingly, the single deletion mutant (Δ *iaaMH1*), as well as the double mutant (Δ *iaaMH12*) of Psv NCPPB 3335 produce residual amounts of IAA, suggesting a redundancy of IAA biosynthesis pathways in *P. savastanoi* (Aragón et al., 2014). IAA

production has historically been identified as an essential factor in the pathogenicity and virulence of Psv and Psn (Comai and Kosuge, 1980; Iacobellis et al., 1994). By the construction of single mutants ($\Delta iaaMH1$ and $\Delta iaaMH2$) or double mutants ($\Delta iaaMH12$) of Psv NCPPB 3335 and mutant strains lacking the *iaaM* gene in Psn ESC23, the inability of these strains to induce tumor formation in olive trees and oleander was demonstrated, respectively (Aragón et al., 2014; Cerboneschi et al., 2016).

During the infection process, *P. savastanoi* can also regulate the levels of free IAA by transforming it into a less biologically active amino acid conjugate, such as 3-indole-acetyl- ϵ -L-lysine (IAA-Lys), a reaction carried out by the enzyme IAA-Lys synthase, encoded in the *iaaL* gene (Glass and Kosuge, 1986; Hutzinger and Kosuge, 1968). Psv strains generally contain two paralogs of the *iaaL* gene with chromosomal location, while Psn strains generally encode the *iaaL* gene in plasmids (Matas et al., 2009). It has recently been shown that mutant strains of Psn ESC23 in the *iaaL* gene are unable to produce IAA-Lys (Tegli et al., 2020). Together with the *iaaL* gene, *P. syringae* complex bacteria, including *P. savastanoi*, encode a multiple-compound transporter of the MATE family (*matE* gene), generally located upstream of the *iaaL* gene. The MATE transporter intervenes in the expulsion of IAA to the culture medium, contributing, together with IAA-Lys synthase (*iaaL* gene), to the correct balance of intracellular levels of IAA during the infection process (Tegli et al., 2020).

The deletion of either two genes resulted in a reduction of the virulence of Pto DC3000 in tomato plants, as well as in mutant strains of Psn PB213 in the *iaaL* gene obtained by insertion of a Tn5 transposon, while the inactivation of the *iaaL* gene in a Psn ESC23 isolate, resulted in a hypervirulent strain, causing an increase in the size of the tumors produced (Castillo-Lizardo et al., 2015; Cerboneschi et al., 2016). Therefore, more studies are needed to clarify the functionality and role of the *iaaL* gene in the synthesis of IAA-Lys and in the virulence of *P. savastanoi* strains.

Chapter 1: Identification by genomic comparison of pathovar-specific genes in *Pseudomonas savastanoi* strains isolated from woody hosts.

Advances in sequencing technologies have made possible study the genomic evolution of the *Pseudomonas syringae* complex, incorporating greater diversity into comparative and functional analyzes. During the last decade the sequence of a large number of genomes of the *P. syringae* complex has been obtained, among which are sequences of *P. savastanoi*. Initially, the draft genome of the Psv NCPPB 3335 species was published (Rodríguez-Palenzuela et al., 2010), as well as the complete sequence of its three plasmids (Bardaji et al., 2011). Subsequently, the genomic drafts of the Psv DAPP-PG722 (Moretti et al., 2014) and PseNe107 (Bartoli et al., 2015) strains were obtained. Shortly after, the genomic sequences of the four type strains of *P. savastanoi* were made public, such as Psv ICMP 4352, Psn ICMP 16943 (CFBP 5067), Psr ICMP 16945 (CECT 4861) and Psf ICMP 7711 (CFPB 5062) (Nowell et al., 2016; Thakur et al., 2016). Finally, the draft sequence of the Psm Ph3 strain was published in the GenBank database (unpublished data), and 11 new genomic sequences of *P. savastanoi* strains isolated from woody hosts were published (Dillon et al., 2019b).

In this Chapter, the complete sequence of the chromosome of Psv NCPPB 3335 has been obtained, which has been used as reference in genomic analysis, together with the sequence of its three native plasmids. In addition, in order to increase the number of representatives of the 5 *P. savastanoi* pathovars with their genomic sequence available, the genomic drafts of four strains whose pathogenicity in their respective hosts had been previously demonstrated were obtained: Psn ESC23 (Cerboneschi et al., 2016; Tegli et al., 2011), Psf NCPPB 1006 (Janse, 1981; 1991; Tegli et al., 2011), Psr CECT 4861 (Alvarez et al., 1998) and Psm Ph3 (Caballo-Ponce, 2017 ; Eltlbany et al., 2012).

The availability of this number of sequenced *P. savastanoi* genomes has made it possible to carry out a comparative genomic analysis of 21 strains of *P. savastanoi* isolated from olive, oleander, broom, ash and dipladenia, belonging to the five pathovars of *P. savastanoi* that include strains isolated from woody

hosts, such as Psv (8 genomes), Psn (5 genomes), Psr (3 genomes), Psf (5 genomes) and Psm (1 genome). A total of 136962 genes were identified, which were grouped into a pangenome of 7982 groups of orthologs, of which 3004 were found in all strains (core genome). Using a nucleotide alignment of the concatenated sequence of the genes present in the core genome of these strains, their phylogenetic relationships were analyzed. The phylogenetic tree allowed to identify five well-defined groups, two of them with a monophyletic character, formed exclusively by strains belonging to Psr and Psf. On the other way, the pathovar Psv seems not to be monophyletic, since its strains are distributed in two independent clades, one consisting exclusively of Psv strains and the other where Psv strains were grouped with the ICMP 13786 and 0485_9 oleander isolates. The rest of the Psn strains were grouped into an independent clade together with the Psm Ph3 strain.

At the patovar level, Psf and Psr showed the highest number of genes present in their soft-core genome (present in at least 20 of the 21 genomes), with Psf being the largest (4769 genes), despite analyzing five Psf genomes and only three Psr genomes. On the other hand, Psn showed a soft-core genome of 4218 genes, while Psv reduced its size to 3834 genes, indicating a greater variability in the presence of genes in the Psv strains. These results suggest that the gene content of the Psf strains is more homogeneous than the other four pathovars.

In addition, the existing differences in the gene repertoire among the *P. savastanoi* pathovars were also analyzed, identifying 165 exclusive genes present, as well as 62 genes exclusively absent in a pathovar. Most of these genes belonged to the pathovars Psr, Psf and Psm, with a total of 88, 71 and 65 genes, respectively. Only 3 exclusively present genes were identified in Psv, while no genes were identified in Psn. Among the genes identified, the presence of hypothetical proteins and genes related to metabolism, as well as genes involved in DNA replication, recombination, mutation and repair. However, among the genes exclusive to patovar, genes that encode proteins with a possible role in virulence and / or host specificity were identified, such as 13

transcription factors, 3 proteins related to cyclic di-GMP metabolism, 2 related proteins with chemotaxis, 20 transporters belonging to 8 different superfamilies, 4 type III secretion system (T3SS) effectors exclusive to P_{sr} and 11 genes related to the type IV secretion system (T4SS) exclusive to P_{sm}. In addition, the absence of genes involved in the biosynthesis of auxins (*iaaMH*), cytokinins (*ptz* and *idi*) and of the phytotoxin rhizobitoxin (*rtxA* and *rtxC*), and the genes *hxcU*, *hxcP* and *hxcV*, were also identified in all P_{sf} genomes of the type II secretion system (T2SS), so the presence of these genes in the 4 tumorigenic pathovars of *P. savastanoi*, suggests that they could be essential for the induction of tumors in various plant hosts.

Finally, the reassignment of the P_{sm} Ph3 strain as a member of the patovar *nerii*, caused a decrease in its soft-core genome to 3780 genes and the identification of a total of 14 exclusive genes present, as well as 14 exclusive genes absent in these strains. Among the elements with a possible role in virulence and / or host specificity, the exclusive presence of the transcription factor *dksA* and the T3SS chaperone ShcF-2 was identified, as well as the absence of the required transcription factor *gstR* and the *hsvC* gene, implicated in the biosynthesis of the phytotoxin phevamine A (O'Neill et al., 2018).

Chapter 2: Identification of new routes of indole-3-acetic acid biosynthesis in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335

In this chapter, the production of IAA present in the mutant strain of P_{sv} Δ *iaaMH1-2*, lacking the genes *iaaM* and *iaaH* responsible for the production of IAA through the main pathway of IAA biosynthesis in P_{sv}, has been analyzed. The amount of IAA produced in these cultures was similar to that present in cultures of P_{sf} and *P. syringae* strains lacking these genes, suggesting the presence of an alternative IAA biosynthesis pathway in these strains. Initially, it was determined that the P_{sv} Δ *iaaMH1-2* strain exhibited a similar behavior to the wild strain of P_{sv} NCPPB 3335 and to other strains of the *P. syringae* complex, producing a 300-fold greater amount of IAA in medium supplemented with Trp.

By comparing the metabolic profiles of the culture supernatants of the Psv *ΔiaaMH1-2* strain in MG medium and in MG medium supplemented with Trp, the differential accumulation in medium with Trp of compounds IAA, IAM, IAAlD, indole 3-lactate, indole 3-ethanol and indole, all of them precursors or derivatives of the IAA molecule, was identified. Subsequently, the concentration of the main intermediates of the IAA production routes previously described in cultures of Psv NCPPB 3335 and Psv *ΔiaaMH1-2* in MG medium and in MG medium supplemented with Trp was quantified. In the absence of Trp, the accumulation of IAA and IAN was identified in both strains. Furthermore, IAM was only detected in Psv NCPPB 3335. The presence of Trp in the medium caused a greater accumulation of IAA in both Psv strains, while the levels of IAN were not modified, suggesting that its biosynthesis could be independent of Trp or not be an intermediate of the alternative IAA biosynthesis pathway in Psv *ΔiaaMH1-2*. Finally, IAM was only detected in Psv *ΔiaaMH1-2* after supplementing the medium with Trp.

The genomic analysis performed in this chapter revealed the presence of genes related to the TAM pathway and aldehyde dehydrogenases (ald) involved in the conversion of IAAlD to IAA in Pto (McClerking et al., 2018). The deletion of the *aldA*, *aldB*, *aldC* and *aldD* genes identified in Psv NCPPB 3335 and Psv *ΔiaaMH1-2* and the decrease in IAA produced in culture, suggests an important role of *ald* genes in the synthesis of IAA in Psv, both in the wild strain with the active IAM pathway, and in the mutant strain affected on this route. Furthermore, the non-elimination of IAA production in Psv *ΔiaaMH1-2*, suggested that multiple proteins with aldehyde dehydrogenase activity could be involved. Through sequence analysis, the presence of 16 proteins with functional domains with aldehyde dehydrogenase activity have been identified in Psv NCPPB 3335, some of which could potentially be involved in IAA biosynthesis in Psv *ΔiaaMH1-2*. Finally, the RNAseq transcriptomic analysis carried out in this work has allowed the identification of 11 genes with dehydrogenase activity whose expression levels increase in the presence of Trp.

In conclusion, this work has shown the role of aldehyde dehydrogenase proteins in the IAA production in Psv. Furthermore, and due to the absence in Psv of genes involved in the pathways described to date, it has been suggested that IAA synthesis could be carried out through a pathway that involves the conversion of Trp to IAAld through a TSO activity. However, the detection of IAM and IAN in the mutant strain Psv *ΔiaaMH1-2* opens the doors to the identification of other pathways not described to date in Psv NCPPB 3335 and suggests that the production of IAA would be mediated by the combined action of multiple pathways with these intermediary compounds as protagonists. Therefore, a more detailed study of the metabolism of IAA in the *P. syringae* complex strains that produce this phytohormone is still necessary.

Chapter 3: Global transcriptional regulation by endogenous and exogenous IAA in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

In this chapter, the effect of IAA on the gene expression of Psv NCPPB 3335 has been analyzed, differentiating between IAA produced by itself (endogenous IAA) and IAA added to the culture medium (exogenous IAA).

To analyze the endogenous effect, the transcriptome of the wild strain Psv NCPPB 3335 was compared with the mutant strain Psv *ΔiaaMH1-2*, which lacks the *iaaM* and *iaaH* genes, involved in the biosynthesis of more than 90% of the IAA produced by this strain. In total, 53 differentially expressed genes were identified, of which 14 genes were up-regulated and 39 genes were down-regulated in Psv *ΔiaaMH1-2*.

Hypothetical proteins and genes related to metabolism were the categories that encompassed the largest number of genes. Genes related to IAA biosynthesis were also identified, such as the *iaaM* and *iaaH* genes, which were down-regulated in Psv *ΔiaaMH1-2*, which lacks them, and an annotated gene with aldehyde dehydrogenase activity down-regulated, too. On the other hand, regulatory genes, involved in signal transduction or transcriptional regulators,

were identified. In this last group, the *hrpR* and *hrpS* genes stand out, which are overexpressed in Psv $\Delta iaaMH1-2$. Finally, repression of non-coding RNA, such as transference RNA (tRNA) or a small RNA (sRNA), was also identified. Among the possible target mRNAs of the sRNA, the identification of a gene encoding a histidine kinase sensor protein with PAS functional domains stands out, which, like sRNA, decreases its expression in an environment of low IAA concentration.

In this chapter, the variation in gene expression due to the decrease of IAA concentration in the Psv $\Delta iaaMH1-2$ strain has been related to the presence of AuxRE regulation boxes in the promoter region of these genes. To date, their presence had only been described in genes related to IAA metabolism. In this work, the presence of AuxRE boxes in one of the operons formed by the *iaaM* gene and the *iaaH* gene and in the *hrpR* and *hrpS* genes, involved in the regulation of T3SS, have been identified in Psv NCPPB 3335. Therefore, the presence of AuxRE boxes in genes not related to IAA production suggests the existence of a regulatory mechanism at the transcriptomic level, caused by IAA and mediated by these AuxRE sequences, and possibly present in other producing bacteria.

On the other hand, the role of exogenously added IAA on the transcriptome of Psv NCPPB 3335 incubated in HRP culture medium, a medium that simulates the conditions of the cell apoplast, has also been evaluated. A total of 567 differentially expressed genes were identified in comparative transcriptomic analysis, with 213 up-regulated genes and 354 down-regulated genes in the presence of exogenous IAA. Most of the up regulated genes were classified into only three categories with a huge number of genes: nitrogenous compound biosynthesis and genes related with protein translation and metabolism. In contrast, the repressed genes were classified in multiple categories with a variable number of genes, highlighting the repression of genes classified in the categories related to secretion, pathogenesis and host defenses regulation.

In order to obtain an integrated view of the regulation of the different virulence factors described in Psv NCPPB 3335 caused by IAA, the effect of IAA on the expression of genes related to these factors was manually analyzed. The presence of exogenous IAA in the medium caused a generalized down-regulation of the genes encoding T3SS structural proteins. However, the expression of any of the regulatory elements of this system (*hrpL*, *hrpR* and *hrpS*) was not modified and only the expression of 4 of the 31 T3SS effectors described in Psv NCPPB 3335 was varied. Furthermore, the presence of IAA also it caused the down regulation of most of the genes present in the WHOP region and, similarly to T3SS, the expression of the *antR* or *benR* regulatory genes was not modified. Finally, exogenous IAA also down-regulated the expression of the *rtxA* and *rtxC* genes, responsible for the biosynthesis of the phytotoxin rhizobitoxin, and significantly up-regulate the expression of the *ptz* gene, which is involved in the biosynthesis of cytokinins. Therefore, the presence of exogenous IAA seems to be directly affecting the expression of genes related to virulence factors of Psv NCPPB 3335, making it clear that Psv has the ability to perceive the levels of IAA present outside the cell, produced by itself or by the plant, inducing changes in the regulation of other virulence genes.

Chapter 4: Allelic variation of the *iaaL* gene and IAA-Lysine biosynthesis in *Pseudomonas savastanoi*

In bacteria, the best characterized IAA production pathway is the indole-3-acetamide (IAM) pathway, where the enzymes tryptophan-2-monooxygenase and IAM hydrolase, encoded by the *iaaM* and *iaaH* genes, respectively, convert sequentially tryptophan (Trp) to IAM and subsequently to IAA (Kosuge et al., 1966; Magie et al., 1963). Furthermore, IAA can be metabolized by transformation to a less biologically active amino acid conjugate such as 3-indole-acetyl- ϵ -L-lysine (IAA-Lys), through the action of the enzyme IAA-lysine synthase, encoded in the gen *iaaL* (Glass and Kosuge, 1986; Hutzinger and Kosuge, 1968).

In *P. savastanoi*, the number and location of the *iaaL* gene varies between different strains, since *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) generally contains two chromosomal copies of the *iaaL* gene, while *P. savastanoi* strains pv. *nerii* (Psn) shows plasmid coding (Matas et al., 2009). To date, the presence of 3 allelic variants of the *iaaL* gene, the *iaaL*_{Psn}, *iaaL*_{Psv} and *iaaL*_{Pto} alleles, described in strains of Psn and Psv, and *P. syingae* pv. *tomato* (Pto), respectively, has been determined. However, the search for paralogous proteins in *P. savastanoi* strains, the construction of a phylogenetic tree with these sequences and the subsequent analysis by RFLP (restriction fragment length polymorphism) and sequence comparison, has allowed us to describe the presence of a new allele of the *iaaL* gene (*iaaL*_{Psf}) exclusively present in Psf strains.

On the other hand, all the *P. savastanoi* strains analyzed in this chapter produced IAA in culture, describing for the first time its production in the Psm Ph3 strain. However, no correlation was found between the amount of IAA-Lys and IAA produced, since non-tumorigenic strains such as Psf, produced small concentrations of IAA and a large amount of IAA-Lys, therefore the production of the conjugate could not be essential for tumor development.

The activity of the different alleles of the *iaaL* gene was indirectly quantified by overexpression of these in Psv NCPPB 3335. The effect of the different *iaaL* alloenzymes on the total pool of IAA produced was observed through a biological assay based on the analysis of the effect of bacterial IAA in the root elongation of *A. thaliana* Col-0 seedlings. The presence of high concentrations of IAA causes a strong inhibition of root elongation in *A. thaliana*, so that differences in root growth would be directly influenced by the activity of the different alloenzymes on the IAA pool. The alleles *iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psf-1} e *iaaL*_{Psf-3} caused greater root elongation than the wild strain Psv NCPPB 3335, suggesting that they are capable of removing free IAA from the medium through its transformation into IAA-Lys. On the other hand, no differences were observed in the root elongation of *A. thaliana* seedlings treated with Psv strains that overexpressed the *iaaL*_{Psv-1}, *iaaL*_{Psv-2} e *iaaL*_{Pto} alleles. Therefore, these alloenzymes could be inactive or show

a residual activity that causes a variation in the concentration of free IAA not detectable by the bioassay used.

In order to verify the functionality of the different allozymes tested, and to be able to correlate the effect on root elongation with the concentration of free IAA, the levels of IAA and IAA-Lys produced were quantified. The overexpression of the *iaaL_{Psf-3}* e *iaaL_{Psn-1}* alleles drastically reduced the levels of free IAA in the culture medium, where the highest IAA-Lys concentrations was accumulated. In contrast, the wild type Psv NCPPB 3335 strain and the Psv NCPPB 3335 strain overexpressing the *iaaL_{Psv-1}* allele produced similar amounts of IAA and did not accumulate IAA-Lys. However, and although the expression of the *iaaL_{Pto}* allele induced the appearance of a low concentration of IAA-Lys in the medium (approximately 130 times lower), a significant decrease in the levels of IAA produced was not observed in comparison with the wild strain. Therefore, despite the production of IAA-Lys by this strain, the absence of changes in IAA levels is consistent with the similar root elongation observed for the *iaaL_{Psv-1}* and *iaaL_{Pto}* alleles. Therefore, the production of the IAA-Lys conjugate has been correlated with the presence of an allele *iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psf-3}* o *iaaL_{Pto}*. However, in some tumorigenic strains, producing high concentrations of IAA and with some of the 100% conserved functional alleles, such as Psr CECT 4861 and Psm Ph3, no production of the conjugate was detected, which has been correlated with differences in the levels expression of the *iaaL* genes in these strains compared to their counterparts in producer strains.

By in vitro biochemical analysis with the proteins *iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psf-3}* e *iaaL_{Psv-1}* confirmed the differences in activity previously proposed. Furthermore, the alloenzyme *iaaL_{Psf-3}* showed a higher specific activity for its substrates, as well as a higher catalytic efficiency and maximum speed, compared to the allozyme *iaaL_{Psn-1}*. Finally, no differences in activity were identified in the presence of IAA or Lys in the alloenzyme *iaaL_{Psv-1}*, so they could be inactive. It is unknown whether the inactivation of this *iaaL_{Psv}* allele is beneficial or not for the survival of Psv in certain cultivars, although the presence of several repeats of the TAC

(Tyrosine) triplet in the sequence of its *iaaL*_{Psv-1} alleles has been described (Matas et al. ., 2009), which, according to the results obtained in this work, causes the inactivation of the allele.

The production of the IAA-Lys amino acid conjugate is the only one described to date in phytopathogenic bacteria, however, in this work the production of other IAA conjugates with alanine, tryptophan, phenylalanine, aspartate and isoleucine has been identified. In phytopathogenic bacteria, it is considered that the predominant function of IAA conjugation is the control of free IAA concentrations, however, the presence of IAA-Asp in the culture medium of Psv NCPPB 3335, suggests that this conjugate could participate in the degradation of IAA, similar to what occurs in plants. Therefore, Psv NCPPB 3335 could present in its genome enzymes capable of metabolizing the IAA-Lys produced, as well as the rest of the conjugates described in this work, although they have not been identified to date.

| INTRODUCCIÓN GENERAL |

Parte del contenido de esta introducción general ha sido publicada en:

Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A. and Ramos, C. (2017) Knots Untie: Molecular Determinants Involved in Knot Formation Induced by *Pseudomonas savastanoi* in Woody Hosts. *Front. Plant Sci.* 8, 1089–16.

Añorga, M., Pintado, A., Ramos, C., De Diego, N., Ugena, L., Novák, O. and Murillo, J. (2020) Genes *ptz* and *idi*, Coding for Cytokinin Biosynthesis Enzymes, Are Essential for Tumorigenesis and In Planta Growth by *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. *Front. Plant Sci.*, 1–14

1. El complejo *Pseudomonas syringae*

El complejo *Pseudomonas syringae* esta formado por un enorme número de bacterias Gram negativas donde se encuentran algunas de las bacterias fitopatógenas más relevantes del mundo, responsables de causar diversas enfermedades en cultivos agrónomicamente importantes (Mansfield et al., 2012). Las bacterias pertenecientes a este complejo generalmente están asociadas a plantas, sin embargo, también se han descrito aislados ambientales de *P. syringae* procedentes de reservorios no vegetales o de los componentes del ciclo del agua, como son el suelo, las nubes o las precipitaciones (Morris et al., 2013). Los aislados ambientales, pese a mantener genes relevantes en virulencia, tienen un rango de huésped amplio y una menor virulencia en comparación a los aislados fitopatógenos (Monteil et al., 2016).

1.1. Taxonomía y filogenia del complejo *P. syringae*

El complejo *P. syringae* actualmente esta constituido por 15 especies diferentes estrechamente relacionadas taxonómicamente. Inicialmente, mediante el uso de técnicas moleculares basadas en hibridaciones de DNA-DNA, se estableció la división del complejo *P. syringae* en 9 genomoespecies (Gardan et al., 1999; Marcelletti and Scortichini, 2014). Por otro lado, mediante análisis multilocus de secuencia (MLSA, del inglés, *MultiLocus Sequence Analysis*) se establecieron grupos filogenéticos utilizando la concatenación de diferentes genes esenciales (Mulet et al., 2010; Parkinson et al., 2010). En primer lugar, se definieron 4 filogrupos dentro del complejo *P. syringae* (Sarkar and Guttman, 2004), pero con el aumento de la disponibilidad de más secuencias de genomas de diferentes cepas del complejo, se establecieron 7 filogrupos (Parkinson et al., 2010). Sin embargo, los avances en tecnologías de secuenciación han permitido la disponibilidad de un gran número de secuencias genómicas completas y borradores de cepas del complejo *P. syringae*. La aplicación de MLSA al conjunto de genes presentes en todas las cepas (*core*) de *P. syringae*, ha permitido un nivel de resolución más elevado, llegando a los 13 filogrupos actuales (Figura 1) (Berge et al., 2014; Gomila et al., 2017). Recientemente, estos filogrupos se han dividido en filogrupos primarios y secundarios. Los

filogrupos considerados primarios (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10) son monofiléticos y están integrados mayoritariamente por aislados agrícolas, donde encontramos la mayoría de las cepas tradicionalmente definidas dentro del complejo *P. syringae*. Los filogrupos restantes (7, 8, 9, 11, 12 y 13) son considerados secundarios e incluyen numerosos aislados ambientales. Además, las bacterias que forman estos filogrupos secundarios son lo suficiente divergentes como para ser considerados especies distintas (Figura 1) (Dillon et al., 2019b).

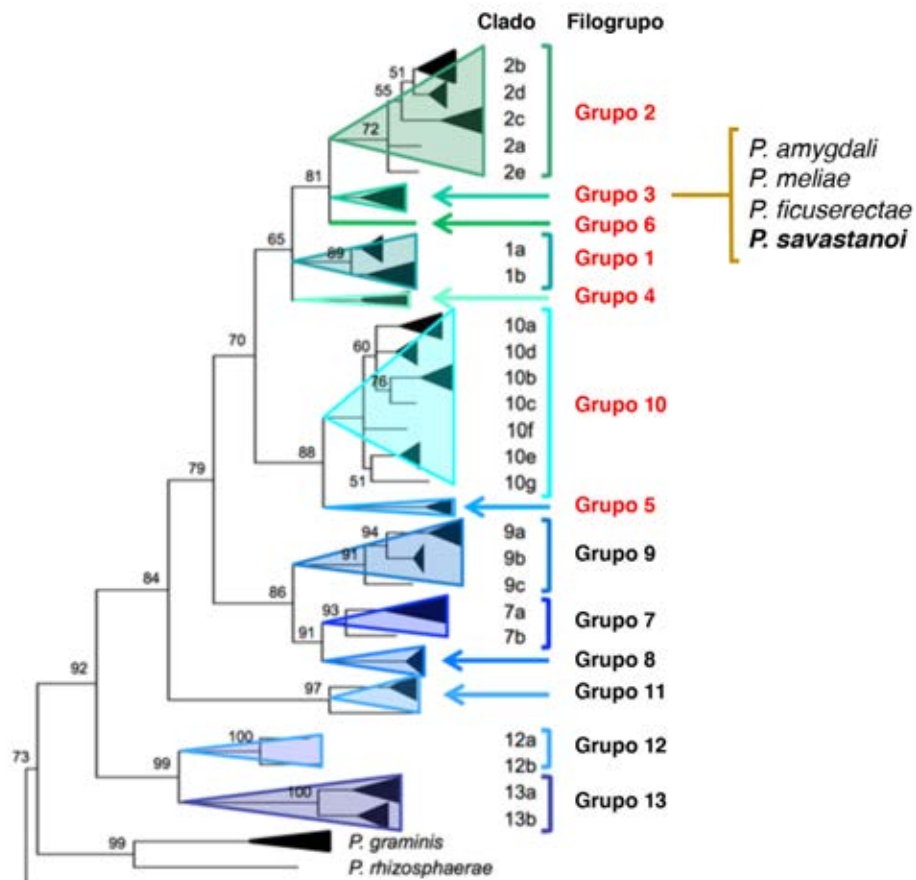


Figura 1. Análisis filogenético del complejo *Pseudomonas syringae*. El árbol se ha obtenido mediante la concatenación de la secuencia de los genes *cts*, *gyrB*, *gapA* y *rpoD* de 216 cepas del complejo *P. syringae*. Los valores en los nodos indican los porcentajes del bootstrap. En rojo se indican los filogrupos primarios, mientras que en negro los filogrupos secundarios. Dentro del filogrupo 3 se destaca el grupo *P. amygdali*, donde se encuentra *P. savastanoi*. Imagen adaptada de Berge et al., (2014).

1.2. Rango de huésped en el complejo *P. syringae*

A nivel intraespecífico, el complejo *P. syringae* está subdividido en más de 65 patovares (pv.), compuestos por bacterias genéticamente relacionadas y que comparten especificidad en su rango de huésped (Almeida et al., 2010; Berge et al., 2014; Bull et al., 2011; Hwang et al., 2005; Sarkar and Guttman, 2004). A su vez, algunos de estos patovares se dividen en biovares, basados en su diversidad fisiológica, como la producción de toxinas (Ferrante and Scortichini, 2014), o en razas, cuando existe especificidad por el genotipo del huésped (Joardar et al., 2005; Taylor et al., 1996).

El complejo *P. syringae* presenta un amplio rango de huésped formado por más de 180 especies de plantas. Sin embargo, la mayoría de las cepas aisladas de cultivos agrícolas muestra un elevado grado de especialización a su hospedador (Berge et al., 2014; Monteil et al., 2016; Morris et al., 2013). Además, mientras que el complejo presenta un amplio rango de huésped, la mayoría de las cepas individuales que lo forman, representadas en diversos filogrupos, únicamente presentan la capacidad de infectar una sola planta huésped (Baltrus et al., 2011; Dillon et al., 2019b). Sin embargo, el rango de huésped de las cepas de *P. syringae* es complicado de definir, debido a la falta de conocimiento sobre la patogenicidad de determinadas especies en plantas no relacionadas, así como sobre la capacidad de cepas filogenéticamente relacionados de infectar varios cultivos. Trabajos recientes han identificado en las cepas del complejo *P. syringae* un solapamiento continuo de su rango de huéspedes, concluyendo que las denominaciones de patovar no se corresponden necesariamente con la biología de *P. syringae* (Morris et al., 2019). Por lo tanto, la capacidad de integración de datos fenotípicos, genómicos y evolutivos hacen del complejo *P. syringae* uno de los modelos más relevantes para estudiar la evolución de la especificidad de huésped en bacterias fitopatógenas (Baltrus et al., 2017; Dillon et al., 2019b; Hulin et al., 2018; O'Brien et al., 2011; Vinatzer et al., 2014).

2. *Pseudomonas savastanoi*

La especie *P. savastanoi* incluye cinco patovares capaces de producir tumores o excrecencias en huéspedes leñosos, como son *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn), *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (Psr), *P. savastanoi* pv. *fraxini* (Psf) y *P. savastanoi* pv. *mandevillae* (Psm). Sin embargo, los ensayos de hibridación DNA-DNA también consideraron los patovares *glycinea* y *phaseolicola* como parte de *P. savastanoi* (Gardan et al., 1992a). Los análisis de hibridaciones DNA-DNA incluyeron la especie *P. savastanoi* dentro de la genomoespecie 2, definiéndola como una especie diferente a *P. syringae* (Gardan et al., 1999). La especie *P. savastanoi* también pertenece al filogrupo 3, el único filogrupo del complejo *P. syringae* donde se incluyen bacterias causantes de tumores en huéspedes leñosos, como son Psv, Psn, Psr, Psm, *P. meliae*, *P. tremae* y los patovares de *P. syringae* *cerasicola*, *daphniphylli*, *dendropanacis*, *myricae*, and *rhaphiolepidis*. No obstante, también se encuentran patógenos de huéspedes no leñosos, como *P. savastanoi* pv. *glycinea* y *phaseolicola* (Berge et al., 2014; Caballo-Ponce et al., 2017a; Lamichhane et al., 2014). Análisis filogenéticos basados en el *core* de cepas del complejo *P. syringae* han demostrado que cepas de Psv, Psn, Psf y Psr están filogenéticamente más próximas a otras bacterias fitopatógenas que a los patovares *glycinea* y *phaseolicola* (Baltrus et al., 2017; Nowell et al., 2014). Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral los patovares *glycinea* y *phaseolicola* se incluyen dentro de la especie *P. syringae* y no se consideran dentro de la especie *P. savastanoi*.

Trabajos recientes, incluyen la especie *P. savastanoi* dentro de un nuevo grupo filogenético superior denominado *P. amygdali* (Figura 1). Este grupo estaría formado por 25 patovares y englobaría las especies *P. savastanoi*, *P. amygdali*, *P. meliae* y *P. ficuserectae* (Gomila et al., 2017; Lalucat et al., 2020).

Entre los síntomas inducidos por *P. savastanoi* destacan los crecimientos hiperplásticos (tumores) y la producción de chancros en tallos y ramas (Figura 2). Psv, Psn, Psr, Psf y Psm se corresponden con cepas aisladas de olivo (*Olea europaea*), adelfa (*Nerium oleander*), fresno (*Fraxinus Excelsior*), retama

(*Retama sphaerocarpa*) y dipladenia (*Mandevilla* spp.), respectivamente (Bull et al., 2010; Caballo-Ponce, 2017; Gardan et al., 1992a; Janse, 1981). Sin embargo, también se ha descrito la producción de tumores por parte de *P. savastanoi* en otros huéspedes, como la forsythia (Bradbury, 1986), jazmín (Gardan et al., 1992b), ligustro (Gardan et al., 1992b), espino (Temsah et al., 2007a), mirto (Cinelli et al., 2014; Temsah et al., 2007b), fontanesia (Mirik et al., 2011), granado (Bozkurt et al., 2014), dipladenia (Caballo-Ponce and Ramos, 2016; Eltlbany et al., 2012; Pirc et al., 2015; Putnam et al., 2010).

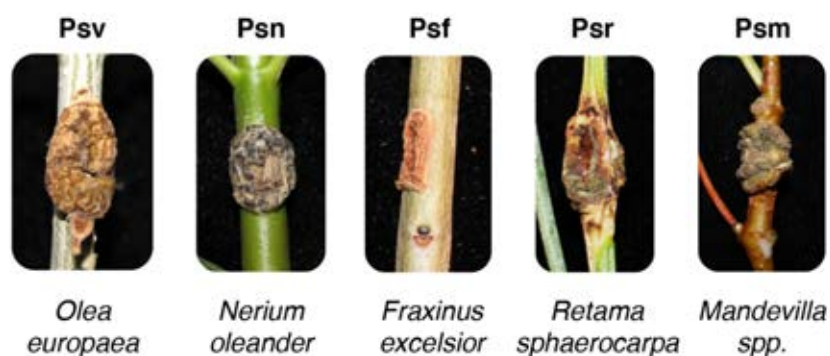


Figura 2. Síntomas producidos por los diferentes patovares de *P. savastanoi* en su huésped de aislamiento. Psv, Psn, Psf, Psr y Psm, *P. savastanoi* pv. savastanoi, nerii, fraxini, retacarpa y mandevillae, respectivamente. Imágenes cedidas por Alba Moreno Pérez.

Mediante ensayos de patogenicidad cruzada, los patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos han sido claramente diferenciados (Tabla 1). Inoculaciones artificiales de cepas de Psv, Psn y Psm forman tumores en olivo y fresno, mientras que Psn y Psm también infecta adelfa y dipladenia, respectivamente. Los aislados de Psf producen chancros acompañados de excrecencias tanto en fresno como en olivo. Por el contrario, Psr restringe su rango de huésped a la retama (Alvarez et al., 1998; Caballo-Ponce, 2017; Eltlbany et al., 2012; Iacobellis et al., 1998; Janse, 1982; 1991; Ramos et al., 2012). Ensayos de inoculaciones cruzadas realizadas recientemente, han corroborado las diferencias presentes en el rango de huésped de la mayoría de las cepas secuenciadas de *P. savastanoi* (Moreno-Pérez et al., 2020).

Tabla 1. Patogenicidad cruzada de los patovares de *P. savastanoi*

Huésped ^a	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. ^b				
	savastanoi	nerii	retacarpa	fraxini	mandevillae ^c
Olivo	T	T	-	E	T
Adelfa	-	T	-	-	-
Retama	-	-	T	-	-
Fresno	T	T	-	E	T
Dipladenia ^c	-	-/T	-	-	T

^aOlivo (*Olea europaea*), adelfa (*Nerium oleander*), fresno (*Fraxinus excelsior*), retama (*Retama sphaerocarpa*) y dipladenia (*Mandevilla* spp.)

^bT, Tumor; E, Excrecencia; -, similar al control negativo.

^c(Caballo-Ponce, 2017). Adaptado de Ramos et al., (2012).

3. Factores de virulencia de *Pseudomonas savastanoi*

La secuenciación del borrador genómico de Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela et al., 2010), primer genoma de *P. savastanoi* secuenciado, permitió la identificación de un amplio repertorio de genes implicados en virulencia. Posteriormente, la secuenciación completa de sus tres plásmidos también reveló la presencia de potenciales genes de virulencia en Psv (Bardaji et al., 2011). Además, la capacidad de producir tumores en material vegetal micropropagado de plantas de olivo (Rodríguez-Moreno et al., 2008), hacen de Psv NCPBB 3335 una bacteria modelo para el estudio de los factores que determinan las interacciones con huéspedes leñosos (Figura 3) (Matas et al., 2012; Ramos et al., 2012).

El estudio de los factores de virulencia en *P. savastanoi* se inició en los años 80 y principalmente se centró en la producción de fitohormonas por parte de estas bacterias (Smidt and Kosuge, 1978). Por la relevancia de las fitohormonas en el desarrollo de esta tesis doctoral, los resultados obtenidos hasta la fecha se detallan en mayor profundidad en el apartado siguiente. A continuación, se resumen los resultados más relevantes obtenidos hasta la fecha relativos a otros factores de virulencia diferentes a las fitohormonas.

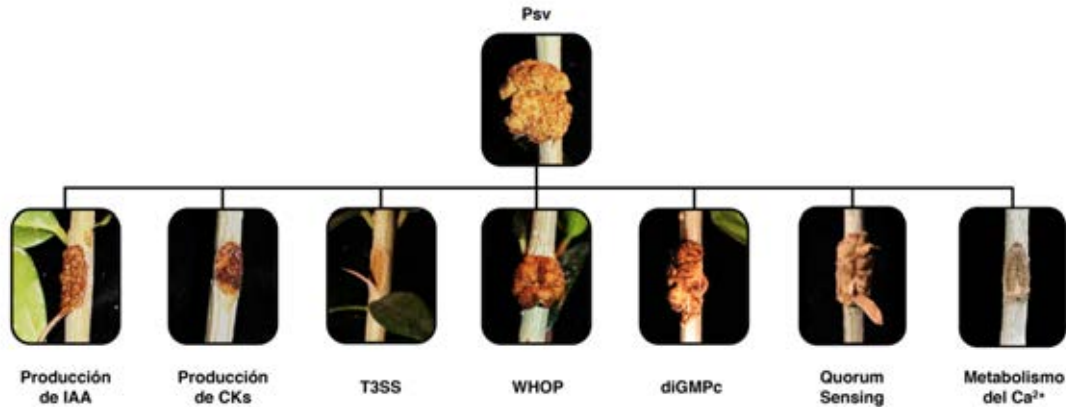


Figura 3. Tumores producidos por *P. savastanoi* pv. *savastanoi* y cepas mutantes derivadas con virulencia o patogenicidad alterada en plantas de olivos tras 90 días posinoculación. Las fotos se corresponden con los típicos síntomas inducidos por la cepa silvestre y los mutantes para los genes *iaaMH1* (producción de IAA), *hrpR* (sistema de secreción tipo III), *dgcP* (metabolismo del di-GMPc), *antA* (región genómica WHOP, del inglés, *Woody Host and Pseudomonas*), *pssR* (*Quorum Sensing*) y *cneA* (Metabolismo del Ca²⁺), así como una cepa silvestre NCPPB 3335 curada del plásmido pPsv48A, codificante del gen biosintético *ptz* (producción de citoquininas). Adaptado de Caballo-Ponce et al., (2017a).

3.1. Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (T3SS) es una jeringa molecular responsable de la translocación de proteínas especializadas, denominadas efectores, dentro del citoplasma de la célula vegetal. La presencia de un T3SS funcional es necesaria tanto para el desarrollo de la enfermedad en los huéspedes susceptibles como para la activación de la muerte celular programada o respuesta hipersensible (HR), en huéspedes resistentes (Büttner and He, 2009; Mansfield, 2009).

En el complejo *P. syringae*, el T3SS está agrupado dentro de una isla de patogenicidad y, salvo contadas excepciones, se localiza en el cromosoma bacteriano. El T3SS está formado por los genes *hrp* (del inglés, *hypersensitive response and pathogenicity*) y *hrc* (del inglés, *hypersensitive response and conserved*). En total, el T3SS está formado por 27 genes agrupados en 5 operones, de los cuales 4 son proteínas estructurales (Alfano et al., 2000; Collmer et al., 2000). El único operón no estructural está formado por los genes *hrpR* y *hrpS*, cuyas proteínas forman un heterodímero capaz de activar la transcripción del gen *hrpL* (Hutcheson et al., 2001; Ortiz-Martin et al., 2010a; 2010b). La proteína HrpL es uno de los reguladores transcripcionales más

importantes del T3SS y actúa como activador de los genes *hrp/hrc*, de las proteínas secretadas por este sistema y de sus correspondientes chaperonas, entre otros genes (Mucyn et al., 2014; Waite et al., 2017; Xiao and Hutcheson, 1994; Xiao et al., 1994). El gen *hrpA*, que da lugar a la proteína estructural del pili, regula positivamente la expresión del operón *hrpRS*.

Además del T3SS completo descrito anteriormente, se ha descrito la presencia de un grupo de genes que forman un T3SS incompleto, similar al descrito en la especie *Rhizobium* y que ha sido identificado en *P. savastanoi*, así como en multitud de genomas del complejo *P. syringae*. Sin embargo, la presencia de este T3SS incompleto no ha sido relacionada con patogenicidad y su función aún no está clara (Baltrus et al., 2017; Martínez-García et al., 2015; Rodríguez-Palenzuela et al., 2010; Tegli et al., 2011).

En Psv la formación de tumores es dependiente de la presencia de un T3SS funcional (Figura 3) (Matas et al., 2012; Perez-Martinez et al., 2010). La construcción de mutantes en elementos estructurales del T3SS como son el gen *hrcC* y *hrpA*, demostraron la incapacidad de las cepas de Psv de formar tumor en plantas de olivo (Perez-Martinez et al., 2010; Sisto et al., 2004). Resultados similares se obtuvieron tras la construcción de mutantes en los genes reguladores *hrpR* (Matas et al., 2012; Perez-Martinez et al., 2010) y *hrpL* (Matas et al., 2014). De igual forma, se ha demostrado en cepas de Psn que la ausencia del gen *hrpA* es esencial para la inducción de tumores en plantas *in vitro* de adelfa, así como para la producción de HR en plantas de tabaco. Además, las cepas de Psn carentes del gen *hrpA* no eran capaces de inducir crecimientos hiperplásicos en explantos de adelfa (Biancalani et al., 2016; Cerboneschi et al., 2016).

El repertorio de efectores del T3SS se ha identificado como uno de los determinantes más relevantes del rango de huésped en el complejo *P. syringae* (Baltrus et al., 2011). Los efectores del T3SS regulan diferentes procesos celulares, como la degradación de proteínas en proteosomas, la señalización de

fitohormonas, la estructura del citoesqueleto, el transporte de vesículas o la expresión génica (Büttner, 2016).

Recientemente se ha caracterizado el repertorio de efectores de 20 cepas de *P. savastanoi*, incluyendo representantes de cada uno de los patovares aislados de huéspedes leñosos. Se ha determinado la presencia de entre 28 y 31 efectores en las diferentes cepas de *P. savastanoi*, encontrando 21 de estos presentes en todas ellas (Moreno-Pérez et al., 2020). En Psv NCPPB 3335 se han identificado 31 efectores de los cuales 11 han sido caracterizados (AvrRpm2, HopA1, HopAA1, HopAF1-1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2, HopAZ1, HopBK1, HopBL1 y HopBL2), es decir, se ha demostrado su translocación a las células vegetales, su dependencia de HrpL y su interferencia con los sistemas de defensa de las plantas (Castañeda-Ojeda et al., 2017a; 2017b; Matas et al., 2014). Además, la mayoría de los efectores identificados están codificados en el cromosoma bacteriano, ya que únicamente dos de ellos (HopAF1-1 y HopAO1) son de localización plasmídica (Bardaji et al., 2011; Castañeda-Ojeda et al., 2017a; 2017b). Los tres efectores pertenecientes a las familias HopBK (HopBK1) y HopBL (HopBL1 y HopBL2) han sido identificados por primera vez en Psv NCPPB 3335 y los efectores HopBL están asociados únicamente a cepas aisladas de huéspedes leñosos, lo que sugiere un papel relevante en la interacción con plantas de olivo y otras plantas leñosas (Matas et al., 2014).

3.2. Quorum sensing

Mediante análisis metagenómico se ha determinado la existencia de un microbioma complejo y diverso en el interior de los tumores producidos por Psv en plantas de olivo. Los principales componentes de esta comunidad bacteriana son *Pseudomonas* spp. y *Pantoea* spp., representando Psv casi el 50% del contenido bacteriano total identificado. Sin embargo, aunque la proporción de otros géneros varió de una muestra a otra, también aparecieron representados los géneros *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hymenobacter*, *Kineococcus*, *Pectobacterium* y *Sphingomonas* (Passos da Silva et al., 2014). Mediante métodos de cultivo tradicional se han identificado tres especies

bacterianas no patógenas que conviven con Psv en el interior de tumor, *Pantoea agglomerans* (Marchi et al., 2006), *Erwinia toletana* (Rohas et al., 2004) y *Erwinia oleae* (Moretti et al., 2011). Además, se ha demostrado que la cooperación entre estas cepas y Psv tiene como resultado un aumento de su virulencia, ya que la coinoculación de *Erwinia toletana* con Psv incrementó el volumen de los tumores producidos en olivo. Las cepas *E. toletana*, *P. agglomerans* y Psv establecen comunidades bacterianas estables en el interior del tumor, capaz de comunicarse mediante la producción de acil-homoserina lactonas (AHL) a través de *quorum sensing* (QS) (Hosni et al., 2011). El QS es un mecanismo de señalización intraespecífico utilizado por multitud de especies bacterianas. Este sistema implica la producción y detección de determinadas moléculas señal capaces de provocar la regulación de la expresión génica en respuesta a la densidad celular (Miller and Bassler, 2001). La molécula señal de QS más extendida entre las bacterias Gram negativas son las AHLs, cuyo papel en la regulación de la expresión de determinados factores de virulencia en planta se ha descrito en bacterias fitopatógenas (Bodman et al., 2003; Danhorn and Fuqua, 2007). Las AHLs son producidas por proteínas de la familia LuxI y su estructura es variable, ya que puede presentar diferencias en la longitud de la cadena de acilo (4 a 20 carbonos) u oxidaciones en la posición C-3 de la cadena. Las AHLs producidas difunden hacia el exterior de la célula, donde pueden ser detectadas por proteínas de la familia LuxR presentes en diferentes bacterias del medio (Fuqua et al., 2001). Este sistema controla características asociadas con virulencia y el estilo de vida epifítico de las bacterias (Bodman et al., 2003). Además, se ha descrito la implicación de este sistema en la regulación de un gran número de genes en diferentes especies de *Burkholderia* (Coutinho et al., 2013; Kim et al., 2014) o de *P. syringae* pv. *tabaci* (Taguchi et al., 2014).

Trabajos recientes han identificado la presencia de un sistema LuxI/LuxR formado por los genes *pssI* y *pssR*, junto a dos copias independientes de *luxR* en todas las cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos. Mediante la construcción de mutantes, se ha demostrado que los genes *pssI* y *pssR* no están implicados en la virulencia de Psv NCPPB 3335 en plantas de olivo (Figura

3) (Caballo-Ponce et al., 2018), al contrario de lo que ocurre en Psv DAPP-PG 722, donde se observó una reducción significativa de la virulencia en olivo (Hosni et al., 2011). Además, se ha demostrado que la coinoculación de cepas de *E. toletana* pueden restablecer la virulencia en mutantes *pssI* de Psv DAPP-PG 722, ya que ambas cepas sintetizan variantes de AHLs estructuralmente idénticas, evidenciando la comunicación presente entre estas cepas (Hosni et al., 2011).

3.3. Metabolismo del calcio

En organismos eucariotas, el calcio (Ca^{2+}) presente en el citoplasma celular actúa como segundo mensajero regulando multitud de procesos celulares y diferentes rutas de señalización intercelulares (Bhosale et al., 2015; Islam, 2020; Rajagopal and Ponnusamy, 2017). En organismos procariotas, también se ha demostrado el papel fundamental del Ca^{2+} en la regulación de su fisiología, actuando como un segundo mensajero intracelular implicado en el mantenimiento de la estructura celular, división celular, expresión génica, regulación del T3SS, producción de exopolisacáridos, eliminación de hierro, *quorum sensing* y formación de *biofilms* (Cruz et al., 2012; Domínguez et al., 2015; Fishman et al., 2018; Gode-Potratz et al., 2010; Parker et al., 2016; Patrauchan et al., 2007; Shukla and Rao, 2013; Werthén and Lundgren, 2001; Zhou et al., 2014).

En bacterias fitopatógenas se ha demostrado que un correcto mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares son esenciales para la virulencia. En *P. syringae* pv. tomate DC3000 se ha identificado un sistema de dos componentes regulado por Ca^{2+} que controla la virulencia del patógeno (Fishman et al., 2018). Por otro lado, en Psv DAPP-PG722 se ha demostrado que la entrada de Ca^{2+} desde el apoplasto vegetal está estimulada por situaciones de baja disponibilidad de energía, estando mediada por un transportador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ codificado por el gen *cneA*. El correcto funcionamiento de este transportador es esencial para la virulencia de Psv, ya que un mutante en el gen *cneA* no induce la formación de tumores en plantas de olivo (Figura 3). Además, en este mutante disminuye la

expresión de genes de virulencia relacionados con el T3SS (*hrpL* y *hrpA*) y la producción de fitohormonas (*iaaM* y *ptz*).

3.4. Metabolismo del di-GMP cíclico

El di-GMP cíclico (di-GMPc) es un segundo mensajero capaz de controlar diversos procesos bacterianos que influyen en la virulencia, como son la motilidad (*swimming* y *swarming*), la producción y secreción de exopolisacáridos, la adhesión, la agregación o formación de *biofilms*. Además, el di-GMPc tiene un impacto directo en la regulación de la transición entre estilo de vida sésil y planctónico (Pérez-Mendoza et al., 2014). Las proteínas diguanilato ciclasas se caracterizan por la presencia de dominios GGDEF y son las responsables de la síntesis del di-GMPc, mientras que las proteínas fosfodiesterasas contienen dominios EAL o HD-GYP y se encargan de la hidrólisis del di-GMPc (Paul et al., 2004; Ryan et al., 2009; Sultan et al., 2011). En *Pseudomonas* fitopatógenas se ha demostrado la implicación del c-di-GMP en aspectos importantes para la virulencia de varias especies o patovares (Engl et al., 2014; Pérez-Mendoza et al., 2014; Pfeilmeier et al., 2016).

Análisis bioinformáticos han demostrado la presencia en Psv NCPPB 3335 de más de 34 proteínas con dominios GGDEF/EAL que podrían estar implicadas en el metabolismo del di-GMPc (Rodríguez-Palenzuela et al., 2010). Además, se ha demostrado la implicación en virulencia de alguna de estas proteínas, ya que la construcción de mutantes en las diguanilato ciclasas *pleD* y *dgcP* provocaron variaciones en la motilidad tipo *swimming*, así como en la formación de *biofilms*, junto a un aumento y disminución del volumen tumoral, respectivamente (Figura 3) (Aragón et al., 2015a; Pérez-Mendoza et al., 2014). Por otro lado, la mutación de la fosfodiesterasa *bifA*, provocó una reducción del tamaño tumoral, así como una reducción de la motilidad de tipo *swimming* (Aragón et al., 2015b).

3.5. Metabolismo de compuestos aromáticos

Trabajos recientes han descrito la presencia en Psv NCPPB 3335 y en otros patógenos leñosos una región de 15 kb denominada WHOP (del inglés, *Woody Host and Pseudomonas*), e implicada en el metabolismo de compuestos aromáticos. Además, se ha demostrado su relevancia en la adaptación a huéspedes leñosos, ya que únicamente estaba presente en cepas aisladas de hospedadores leñosos de los filogrupos 1 y 3 del complejo *P. syringae* (Caballo-Ponce et al., 2017b; Nowell et al., 2016; Ramos et al., 2012; Rodríguez-Palenzuela et al., 2010). Esta región está formada por cuatro operones (*catBCA*, *antABC*, *ipoABC*, and *dhoAB*) y tres genes independientes (*antR*, *PSA3335_3206* y *benR*). Los operones *catBCA* y *antABC* están implicados en el catabolismo del catecol y el ácido antranílico, respectivamente. El operón *ipoABC* está relacionado con una actividad oxigenasa capaz de actuar sobre los compuestos aromáticos. Sin embargo, ninguna función específica se ha asignado todavía al operón *dhoAB* (Caballo-Ponce et al., 2017b). La construcción de mutantes en los diferentes operones de la región WHOP ha permitido conocer en Psv NCPPB 3335 su importancia durante el proceso de formación de tumores en plantas de olivo. Estos mutantes no mostraron cambios en su virulencia en plantas de olivo micropropagadas, sin embargo, se observó una reducción en virulencia y en su multiplicación tras su inoculación en plantas de olivo leñosas (Figura 3). Por lo tanto, la región WHOP permite la degradación de compuestos aromáticos y favorece la colonización de tejidos leñosos de cepas de *P. savastanoi* y otras cepas del complejo *P. syringae* (Caballo-Ponce et al., 2017b).

3.6. Otros factores de virulencia

Además de los factores de virulencia y patogenicidad detallados anteriormente, también se han identificado mecanismos adicionales o vías metabólicas necesarias para la virulencia de Psv NCPPB 3335 en plantas de olivo. Siguiendo una estrategia de mutagénesis aleatoria, se identificaron genes relacionados con el T3SS, la producción de fitohormonas o con el metabolismo del di-GMP cíclico. También se han descrito genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos,

genes relacionados con la biosíntesis de vitaminas o transportadores de citrato, sulfato y aminoácidos. Además, esta estrategia también identificó genes relacionados con los sistemas de secreción tipo II y IV, proteínas involucradas en tolerancia a estrés y enzimas hidrolíticas implicadas en la biosíntesis de la pared celular (Matas et al., 2012).

4. Producción de fitohormonas

4.1. Citoquininas

Las citoquininas (CKs) son hormonas vegetales que participan en diversas funciones, como por ejemplo en procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos, así como en la modulación de la respuesta de las plantas a estrés (O'Brien and Benková, 2013; Sakakibara, 2006). Estas fitohormonas derivan de nucleósidos de adenosina (AMP, ADP o ATP) y poseen una cadena lateral derivada del isopreno o aromática en posición N⁶ (Sakakibara, 2006). En *Psv* se ha descrito la presencia de dos genes implicados en la producción de esta fitohormona, el gen *ptz* y el gen *idi* (Añorga et al., 2020).

El gen *ptz* (*Pseudomonas trans-zeatin producing gene*) codifica una isopentenil transferasa que cataliza la prenilación de los nucleósidos de adenosina con dimetilalil difosfato (DMAPP) o hidroximetilbutenil difosfato (HMBDP), principal paso en la biosíntesis de CKs (Sakakibara, 2006). Entre las CKs producidas por *P. savastanoi* encontramos la zeatina, dihidrozeatina, 1'-metilzeatina, ribosilzeatina, ribosildihidrozeatina y ribosil-1'-metilzeatina (Evidente et al., 1986; Iacobellis et al., 1994; Macdonald et al., 1986; Surico et al., 1985). El gen *ptz* se encuentra ampliamente distribuido entre bacterias que interaccionan con plantas, incluyendo bacterias beneficiosas y patogénicas, lo cual sugiere que este gen es requerido por las bacterias para una correcta interacción con las plantas (Añorga et al., 2020). El gen *ptz* está presente en la mayoría de cepas tumorigénicas de *P. savastanoi* (Moreno-Pérez et al., 2020). En *Psv* NCPPB 3335 se localiza en el plásmido pPsv48A (PSPSV_A0024), y mientras que en otras cepas de *Psv* la localización de este gen es mayoritariamente

cromosómica, en cepas de Psn se localiza preferentemente en plásmidos (Añorga et al., 2020; Caponero et al., 1995; Perez-Martinez et al., 2008; Ramos et al., 2012). En cepas de Psr también se ha identificado este gen, aunque no se ha precisado su localización (Moreno-Pérez et al., 2020). Los aislados de Psf, productores de excrecencias en fresno, carecen del gen *ptz* (Iacobellis et al., 1998; Moreno-Pérez et al., 2020; Ramos et al., 2012). La comparación de la secuencia de este gen con sus homólogos *tmr* y *tzs* presentes en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* e implicados en la producción de CKs en esta cepa, refleja un 50% de identidad con ellos, sugiriendo un origen común de la ruta de síntesis de CKs en ambas bacterias (Powell and Morris, 1986).

Tabla 2. Mutaciones descritas que afectan a la producción de fitohormonas en los patovares de *Pseudomonas savastanoi*.

Gen	Patovar	Función	Efecto en el desarrollo del tumor	Referencia
Metabolismo de IAA				
p-IAA ^a	savastanoi nerii	Biosíntesis	Ausencia	(Comai and Kosuge, 1980; Soby et al., 1991; Surico et al., 1985)
<i>ΔiaaMH</i>	savastanoi	Biosíntesis	Ausencia	(Aragón et al., 2014)
<i>ΔiaaM</i>	nerii	Biosíntesis	Ausencia	(Cerboneschi et al., 2016)
<i>ΔiaaL</i>	nerii	Conjugación con L-Lys	Reducción	(Glass and Kosuge, 1988)
<i>ΔiaaL</i>	nerii	Conjugación con L-Lys	Aumento	(Cerboneschi et al., 2016)
Producción de citoquininas				
p- <i>ptz</i> ^b	nerii	Biosíntesis	Reducción	(Iacobellis et al., 1994)
p-Psv48A ^c	savastanoi	Biosíntesis	Reducción	(Bardaji et al., 2011)
p-Psv48C ^c	savastanoi	Biosíntesis	Reducción	(Añorga et al., 2020)
<i>Δptz</i>	savastanoi	Biosíntesis	Reducción	(Añorga et al., 2020)
<i>Δidi</i>	savastanoi	Biosíntesis	Reducción	(Añorga et al., 2020)

^aAnalizado en cepas curadas de un plásmido que codifica el operón *iaaMH*.

^bAnalizado en cepas curadas de un plásmido que codifica el gen *ptz*.

^cAnalizado en cepas curadas del plásmido indicado de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

Adaptado de Caballo-Ponce et al., (2017a).

El gen *idi* codifica una isopentenil-difosfato delta isomerasa que cataliza la conversión de isopentenil pirofosfato en DMAPP, uno de los sustratos principales del producto del gen *ptz* y un paso clave en la biosíntesis de CKs a través de la

ruta del mevalonato (Sakakibara, 2006). Genes homólogos al gen *idi* se han identificado en una amplia variedad de bacterias no fitopatógenas, incluida *E. coli*, sugiriendo funcionalidades diferentes o alternativas a la síntesis de CKs en estas bacterias (Añorga et al., 2020).

Dentro del complejo *P. syringae* los genes *ptz* e *idi* están presentes en múltiples bacterias patógenas de plantas, entre las que encontramos cepas tumorigénicas y no tumorigénicas. El gen *idi* se encuentra altamente conservado, mientras que se han identificado dos genes homólogos distintos del gen *ptz*, siendo uno de ellos exclusivo de las cepas de *P. savastanoi* (Añorga et al., 2020).

Trabajos anteriores han demostrado la implicación de las CKs en la patogenicidad y virulencia de cepas tumorigénicas de *P. savastanoi* (Figura 3, Tabla 2). Los primeros trabajos ya demostraron una correlación positiva entre la cantidad de CKs producida en cultivo por cepas de Psv y Psn y la producción de tumores más grandes en planta, incluso después de períodos de incubación más cortos (Surico et al., 1985). En Psv NCPPB 3335 los genes *ptz* e *idi* forman parte del plásmido pPsv48A y pPsv48C, respectivamente. Ensayos de patogenicidad realizados con cepas de Psv NCPPB 3335 curadas de estos plásmidos y, por lo tanto, carentes de los genes *ptz* e *idi*, desarrollaron tumores más pequeños en plantas de olivo, atribuyendo la ausencia de estos genes a una disminución en los niveles de CKs (Añorga et al., 2020; Bardaji et al., 2011).

Para evaluar con una mayor precisión la contribución de las CKs al ciclo de vida bacteriano, se obtuvieron mutantes de Psv NCPPB 3335 ausentes del gen *ptz* e *idi*, donde se determinó que estos son clave en el desarrollo tumoral (Tabla 2). Inoculaciones de un mutante carente del gen *idi* en plantas de olivo produjeron tumores muy reducidos y equiparables a los obtenidos con la cepa de Psv curada del plásmido pPsv48C. Además, la complementación de la cepa curada de pPsv48C con el gen *idi* producía un fenotipo idéntico al obtenido en las cepas silvestres (Añorga et al., 2020). Sin embargo, mutantes incapaces de sintetizar CKs, pese a producir tumores más pequeños, alcanzaron tamaños poblacionales similar a los obtenidos en las cepas silvestres en hojas de adelfa (Iacobellis et

al., 1994). Por el contrario, inoculaciones en plantas de olivo de cepas de Psv NCPPB 3335 mutadas en los genes *ptz* e *idi*, así como de cepas curadas en los plásmidos pPsv48ABC, mostraron un tamaño poblacional inferior al obtenido en la cepa silvestre (Añorga et al., 2020). Por lo tanto, la ausencia de producción de CKs, así como la ausencia de los genes *ptz* e *idi*, afectan a la capacidad de las cepas de Psv NCPPB 3335 para multiplicarse y sobrevivir en las plantas de olivo.

4.2. Auxinas

Las auxinas son fitohormonas que juegan un papel relevante en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales, así como en las respuestas de las plantas a estímulos ambientales, tanto bióticos como abióticos (Kieffer et al., 2010; Santner and Estelle, 2009). En plantas, el ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina más relevante en cuanto a su cantidad y actividad, cuya homeostasis está mediada por una compleja red de procesos relacionados con su biosíntesis, catabolismo, conjugación, señalización y transporte (Ljung, 2013). Muchas bacterias asociadas a planta tienen la capacidad de producir IAA, pudiendo alterar el equilibrio de auxinas de la planta e interfiriendo en su desarrollo, por lo que esta fitohormona se ha descrito como un factor de patogenicidad/virulencia en bacterias fitopatógenas (Patten et al., 2013; Spaepen and Vanderleyden, 2011).

La síntesis de IAA en bacterias ha sido bien caracterizada, encontrándose una gran similitud entre las rutas de biosíntesis descritas en plantas y bacterias. Hasta la fecha, se han descrito cinco rutas biosintéticas de IAA (Figura 4) que utilizan como precursor el aminoácido L-triptófano (Trp). Estas rutas se definen como: de la indol-3-acetamida (IAM), del indol-3-piruvato (IPyA), de la triptamina (TAM), del indol-3-acetonitrilo (IAN) y la ruta de la cadena lateral de oxidación del triptófano (TSO) (Patten et al., 2013; Spaepen et al., 2007). La ruta de la IAM es la ruta biosíntesis de IAA mejor caracterizada en bacterias fitopatógenas formadoras de tumores en plantas, y se caracterizó por primera vez en las bacterias fitopatógenas *A. tumefaciens* y *P. savastanoi* (Smidt and Kosuge, 1978; Thomashow et al., 1984). Por su importancia en este trabajo se

desarrollará en mayor detalle más adelante.

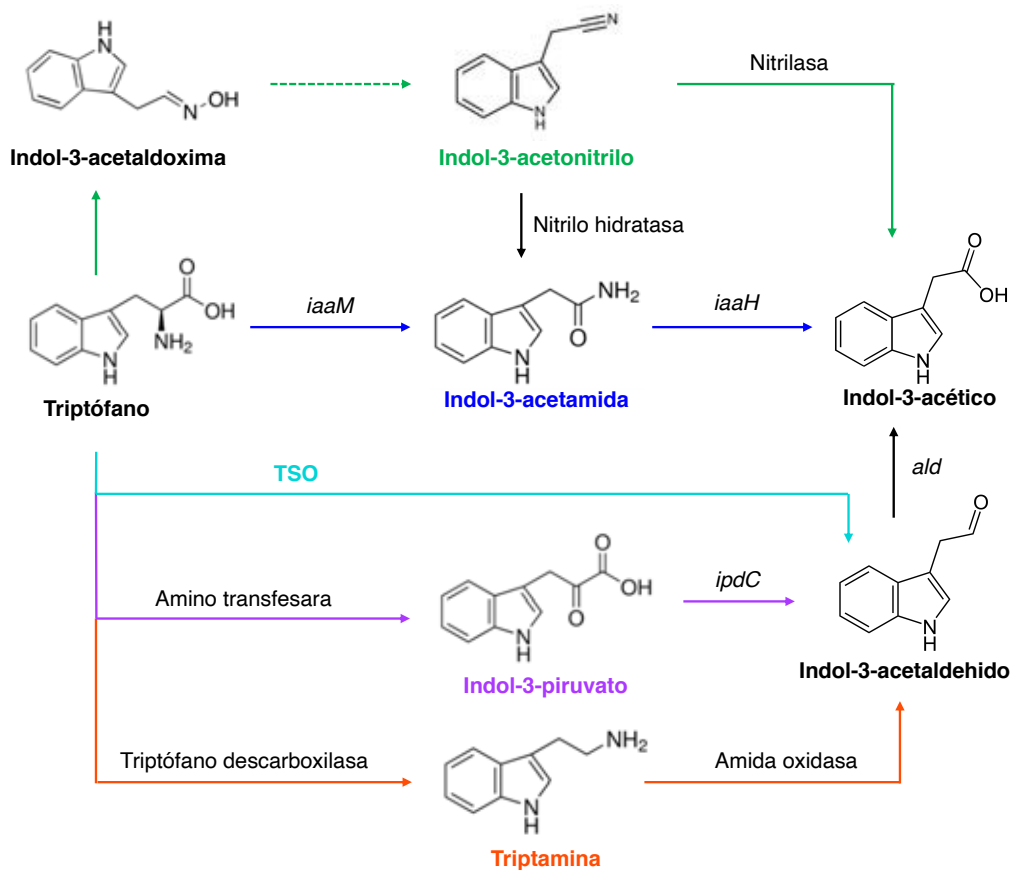


Figura 4. Resumen esquemático de las diferentes rutas de biosíntesis de IAA descritas en bacterias. El intermediario que da nombre a cada una de las rutas se muestra indicado con el mismo color que su ruta, indicadas por las flechas. Encima de las flechas, se indica el gen implicado en cada paso de la ruta de biosíntesis o, si no es conocido, la actividad enzimática predicha para ese paso. *iaaM*: triptófano monooxigenasa; *iaaH*: indol-3-acetamida hidrolasa; *ald*: aldehído dehidrogenasa; *ipdC*: indol-3-piruvato descarboxilasa TSO: cadena lateral de oxidación del triptófano. Adaptado de Spaepen et al., (2007).

La segunda ruta de biosíntesis de IAA mejor descrita es la que transcurre a través del intermediario IPyA. Esta ruta se ha descrito en un amplio rango de bacterias, algunas de ellas fitopatógenas, como son *P. agglomerans*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* o *Enterobacter cloacae*. El primer paso de esta ruta es la conversión del L-Trp en IPyA mediante la transferencia de su grupo amino a una molécula de ácido α -cetoglutarico, realizada por una enzima con actividad aminotransferasa. Posteriormente, se produce la descarboxilación del IPyA a indol-3-acetaldehído (IAAld), paso catalizado por una indolpiruvato descarboxilasa codificada en el gen *ipdC* (Patten et al., 2013; Spaepen et al.,

2007). El papel del gen *ipdC* en la biosíntesis de IAA ha sido experimentalmente confirmado en *E. cloacae* (Koga et al., 1991; Ryu and Patten, 2008), *A. brasilense* (Costacurta et al., 1994; Malhotra and Srivastava, 2008) y *P. agglomerans* (Brandl and Lindow, 1996). El paso final de esta ruta es la oxidación del IAAld a IAA mediante la acción de una enzima con actividad aldehído deshidrogenasa (*ald*) (McClerklin et al., 2018).

La ruta de la TAM se inicia con la descarboxilación del L-Trp en TAM mediante una enzima con actividad triptófano descarboxilasa. Posteriormente, una amina-oxidasa transforma la TAM en IAAld, siendo este finalmente convertido en IAA mediante enzimas con actividad aldehído deshidrogenasa (Spaepen et al., 2007). Esta ruta ha sido principalmente identificada en *Bacillus cereus* (Perley and Stowe, 1966) y en *Azospirillum* (Hartmann et al., 1983).

En la ruta del IAN el Trp es convertido en IAA a través de los intermediarios indol-3-acetaldoxima e IAN. Actualmente, no está caracterizada la enzima que cataliza la transformación del Trp en indol-3-acetaldoxima. Sin embargo, se ha descrito en *Bacillus* una aldoxima dehidratasa capaz de convertir este intermediario en IAN. Posteriormente, proteínas con actividad nitrilasa convertirán el IAN en su correspondiente ácido carboxílico, formando IAA (Spaepen et al., 2007). En *P. syringae* B728a se ha descrito la capacidad de crecer utilizando IAN como fuente de nitrógeno, así como de producir IAA en medio suplementado con éste (Howden et al., 2009). El IAN también puede convertirse en IAA a través de la ruta de la IAM, mediante la acción de una enzima con función nitrilo hidratasa cuya actividad ha sido demostrada en *Agrobacterium*, *Rhizobium*, y *Rhodococcus* (Kobayashi et al., 1995; Xie et al., 2003).

Por último, la ruta de la cadena lateral de oxidación del Trp únicamente se ha descrito en *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y participa en la conversión directa del Trp en IAAld, el cual posteriormente será oxidado en IAA (Oberhänsli et al., 1991).

Trabajos recientes, han identificado la coexistencia de genes implicados en diferentes rutas de biosíntesis de IAA en la misma cepa bacteriana (Aragón et al., 2014; Duca et al., 2014a; Manulis et al., 1998). Sin embargo, la presencia de un gen esencial para la biosíntesis de IAA no implica que la bacteria tenga la capacidad de producir IAA a través de esta ruta (Zhang et al., 2019). La identificación de genes de biosíntesis en todos los genomas disponibles hasta la fecha de cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos se ha abordado en los Capítulos 1 y 2 de esta Tesis Doctoral.

Ruta de la indol-3-acetamida

En *P. savastanoi* la biosíntesis de IAA se produce a través de la ruta de la IAM. En un primer paso el Trp es convertido en IAM por acción de la enzima triptófano 2-monooxigenasa (gen *iaaM*) y posteriormente es transformada en IAA a través de una reacción catalizada por la enzima indol-3-acetamida hidrolasa (gen *iaaH*) (Kosuge et al., 1966; Magie et al., 1963). En varias cepas de *P. savastanoi* se ha descrito la presencia de los genes *iaaM* e *iaaH* con una organización en forma de operón (*iaaMH*) (Comai and Kosuge, 1980; Comai et al., 1982; Palm et al., 1989). Sin embargo, aunque la mayoría de las cepas de Psv codifican el operón *iaaMH* en el cromosoma, los aislados de Psn generalmente lo codifican en plásmidos (Caponero et al., 1995; Glass and Kosuge, 1986; Perez-Martinez et al., 2008). Trabajos posteriores han revelado que las cepas de Psv con frecuencia codifican dos copias del operón *iaaMH* (denominadas *iaaMH1* e *iaaMH2*), ambas con ubicación mayoritariamente cromosómica (Perez-Martinez et al., 2008; Rodríguez-Palenzuela et al., 2010). En Psv NCPPB 3335, el gen *iaaM2* presenta una inserción de 22 nucleótidos y mediante la construcción de mutantes en ambos operones se ha demostrado que la biosíntesis de IAA depende únicamente de la funcionalidad del operón *iaaMH1*, ya que, las cepas mutantes inactivadas en el operón *iaaMH2* producían cantidades de IAA similares a la cepa silvestre (Aragón et al., 2014). Curiosamente, el mutante de delección simple ($\Delta iaaMH1$), así como el mutante doble ($\Delta iaaMH12$) de Psv NCPPB 3335 producen cantidades residuales de IAA, sugiriendo una redundancia de rutas biosíntesis de IAA en *P. savastanoi* (Aragón et al., 2014).

La identificación de rutas alternativas de biosíntesis de IAA independientes del operón *iaaMH* en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* se ha abordado en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

Papel en la virulencia de *P. savastanoi* de la ruta de la indol-3-acetamida

El papel de la producción de IAA en la patogenicidad y virulencia de Psv y Psn se ha abordado mediante diferentes enfoques. Primero, se utilizó el inhibidor del crecimiento α -metiltryptófano para aislar cepas de Psv y Psn que mostraban una producción de IAA alterada. Los mutantes con deficiencias en la producción de IAA no lograron desarrollar tumores en plantas de olivo y adelfa, mientras que las cepas de Psn que producían un exceso de IAA formaron tumores más grandes que la cepa silvestre, sugiriendo un rol importante de esta fitohormona en la patogenicidad de *P. savastanoi*. Por otro lado, se han obtenido cepas de *P. savastanoi* curadas de plásmidos que codifican el gen *iaaM* mediante el uso de un análogo del Trp, el 5-metiltryptófano. Esta estrategia esta basada en la toxicidad de este compuesto para los mutantes de *P. savastanoi* que carecen de la actividad 2-monooxigenasa del gen *iaaM*, gen que confiere resistencia a este compuesto y a otros análogos del Trp, pero no al α -metiltryptófano. Por lo tanto, mutantes de *P. savastanoi* sensibles a 5-metiltryptófano y que carecen del gen *iaaM*, frecuentemente debido a la curación de plásmidos codificantes de este gen, se seleccionaron tras un tratamiento con naranja de acridina, un agente intercalante del DNA (Comai and Kosuge, 1980). Sin embargo, pese a que aislados de Psn sin plásmidos que codifican *iaaM* pudieron inducir necrosis en los tejidos donde se inocularon, no pudieron generar tumores en plantas de adelfa (Tabla 2) (Iacobellis et al., 1994).

Posteriormente, mediante la inoculación en plantas de olivo de cepas mutantes simples ($\Delta iaaMH1$ e $\Delta iaaMH2$) o del doble mutante ($\Delta iaaMH12$) de Psv NCPPB 3335, se demostró la incapacidad de estas cepas para inducir la formación de tumores en olivo, proporcionando evidencias directas de la participación de este operón en la patogenicidad de Psv (Figura 3, Tabla 2) (Aragón et al., 2014). Además, cepas de Psn ESC23 carentes del gen *iaaM* mostrando un

comportamiento hipovirulento en plántulas de adelfa, así como una menor producción de IAA (Tabla 2) (Cerboneschi et al., 2016).

Producción de 3-indol-acetil- ϵ -L-lisina en *P. savastanoi*

Durante el proceso de infección, *P. savastanoi* también puede regular los niveles de IAA libre mediante su transformación en un conjugado aminoacídico biológicamente menos activo, como la 3-indol-acetil- ϵ -L-lisina (IAA-Lys). Esta reacción es llevada a cabo por la enzima IAA-Lys sintasa, codificada en el gen *iaaL* (Glass and Kosuge, 1986; Hutzinger and Kosuge, 1968). Al igual que ocurre con los genes *iaaMH*, el número de copias y la ubicación del gen *iaaL* varía en *P. savastanoi*. Las cepas de Psv generalmente contienen dos parálogos del gen *iaaL* con ubicación cromosómica, mientras que las cepas de Psn generalmente codifican el gen *iaaL* en plásmidos (Matas et al., 2009). Además, se ha detectado IAA-Lys en el sobrenadante de aislados de Psn, mientras que este compuesto no se detectó en sobrenadantes de cultivos de cepas de Psv (Evidente et al., 1985). Trabajos recientes han demostrado la incapacidad de producir IAA-Lys de un mutante de Psn ESC23 en el gen *iaaL* (Tegli et al., 2020).

Las bacterias del complejo *P. syringae*, incluida *P. savastanoi*, codifican un transportador de expulsión de múltiples compuestos de la familia MATE (gen *matE*), generalmente localizado aguas arriba del gen *iaaL*. En *P. syringae* pv. tomato (Pto) DC3000 la transcripción de estos dos genes se produce de manera independiente o en forma de operón (Castillo-Lizardo et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado el papel de este transportador en la virulencia de Psn ESC23. El transportador MATE interviene en la expulsión de IAA al medio de cultivo, contribuyendo, junto a la IAA-Lys sintasa (gen *iaaL*), al correcto mantenimiento de los niveles intracelulares de IAA durante el proceso de infección (Tegli et al., 2020). La delección de cualquiera de los dos genes, resultó en una reducción de la virulencia de Pto DC3000 en plantas de tomate (Castillo-Lizardo et al., 2015). Sin embargo, el papel de estos genes en *P. savastanoi* parece depender de la cepa y de las condiciones experimentales utilizadas. Un mutante de Psn PB213 en el gen *iaaL* obtenido por inserción de un transposón

Tn5, mostró atenuada su virulencia en plantas de adelfa leñosas en comparación a la cepa silvestre (Glass and Kosuge, 1988). Por el contrario, la inactivación del gen *iaaL* en un aislado de Psn ESC23, tuvo como consecuencia una cepa hipervirulenta, provocando un aumento del tamaño de los tumores producidos, una mayor dispersión sistémica y un tamaño poblacional más grande que la cepa silvestre en plantas de adelfa micropropagadas (Cerboneschi et al., 2016). Por lo tanto, son necesarios más estudios para aclarar la funcionalidad y el papel del gen *iaaL* en la síntesis de IAA-Lys y en la virulencia de cepas de *P. savastanoi* aisladas de diferentes huéspedes. El análisis de la diversidad alélica y funcional del gen *iaaL* en *P. savastanoi* ha sido uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral (Capítulo 4).

Fitohormonas y su relación con otros factores de virulencia

Además de su capacidad para interferir en el desarrollo de la planta variando el balance de auxinas, el IAA también se ha descrito como una molécula de señalización capaz de interferir en la expresión génica (Spaepen et al., 2007). En multitud de bacterias fitopatógenas, se han descrito redes de interacción entre diferentes fitohormonas y otros factores de virulencia. En la bacteria formadora de tumores *P. agglomerans* la biosíntesis de IAA se lleva a cabo mediante dos rutas diferentes, la ruta de la IAM y el IPyA, las cuales contribuyen de manera diferencial a la formación de tumores y al estado epifítico, respectivamente (Chalupowicz et al., 2009; Manulis et al., 1998). La inactivación de la biosíntesis de CKs o IAA a través de la ruta de la IAM provocó la represión del T3SS y del sistema de QS, mientras que la inactivación de la producción de IAA a través de la ruta del IPyA provocó una regulación positiva de estos sistemas (Chalupowicz et al., 2009). De manera similar, un mutante *iaaM* de *Dickeya dadantii* presentó una represión de los genes del T3SS, del gen regulador global *gacA* y de los genes de la pectato liasa *peID*, *pell* y *peLL* (Yang et al., 2007). En *P. savastanoi* también se ha sugerido el rol del IAA como molécula de señalización bacteriana. Mediante la construcción de mutantes deficientes en la producción de IAA en cepas de Psn, se ha comprobado como estos mutantes exhibían una movilidad mejorada, sugiriendo que el IAA podría estar implicado en la motilidad de *P. savastanoi* (Soby et al., 1991).

Además del efecto endógeno del IAA, diversos estudios han demostrado que la aplicación de IAA de manera exógena también provoca cambios en la regulación de determinados genes bacterianos, entre los que se encuentran factores de virulencia. En *Rhizobium etli* se han identificado que la adición exógena de IAA modifica la expresión de cuatro genes implicados en el procesamiento de señales de la planta, en la motilidad o en la adhesión a las raíces de las plantas (Spaepen et al., 2009). De manera similar, la aplicación de IAA en *A. brasilense* provocó una amplia respuesta en el transcriptoma de esta bacteria, ya que alteró la expresión de multitud de factores de transcripción, proteínas transportadoras y proteínas de la superficie celular. Además, en esta bacteria también se identificó una sobreexpresión de los genes del sistema de secreción tipo VI (T6SS) en presencia de IAA (Van Puyvelde et al., 2011). En Psv NCPPB 3335, la adición exógena de IAA provocó la represión de los genes del T3SS *hrpL* y *hrpA*, mientras que activó la transcripción del gen *vgrG* del T6SS (Aragón et al., 2014). Estos resultados concuerdan con la represión del regulón *vir* identificado en *A. tumefaciens* en respuesta a IAA exógeno (Yuan et al., 2008), sugiriendo un efecto adicional del IAA durante la interacción de *P. savastanoi* con sus huéspedes. Por otro lado, un gen homólogo a *ptz*, o la producción de CKs, parece regular la expresión de diversos genes de virulencia en *A. tumefaciens* (Hwang et al., 2013). Por lo tanto, debido a que multitud de microorganismos beneficiosos y patógenos modulan el conjunto de fitohormonas que producen (Boivin et al., 2016), es posible que las auxinas y las citoquininas también contribuyan a la regulación del ciclo de vida de *P. savastanoi*. En esta Tesis Doctoral, se ha abordado el estudio del papel del IAA endógeno y exógeno como molécula señal en *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, prestando especial atención a la regulación transcripcional de otros genes de virulencia previamente descritos en este patógeno (Capítulo 3).

| OBJETIVOS |

1. Identificar genes específicos de los patovares de *P. savastanoi* de huéspedes leñosos, prestando especial atención a los genes de biosíntesis de fitohormonas.
2. Determinar la ruta de biosíntesis de IAA independiente de los genes *iaaM* e *iaaH* en *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.
3. Estudiar el papel del IAA en la regulación génica global de la transcripción en *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.
4. Analizar la variación alélica y funcional del gen *iaaL* en *P. savastanoi*.

| CAPÍTULO 1 |

Identificación mediante comparativa genómica de genes específicos de patovar en cepas de *Pseudomonas savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos.

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:

Moreno-Pérez, A.*, **Pintado, A.***, **Murillo, J.**, **Caballo-Ponce, E.**, **Tegli, S.**, **Moretti, C.**, **Rodríguez-Palenzuela, P.** and **Ramos, C.** (2020) Host Range Determinants of *Pseudomonas savastanoi* Pathovars of Woody Hosts Revealed by Comparative Genomics and Cross-Pathogenicity Tests. *Front. Plant Sci.* **11**, 1–19. *Estos autores han contribuido por igual a este trabajo.

Añorga, M., **Pintado, A.**, **Ramos, C.**, **De Diego, N.**, **Ugena, L.**, **Novák, O.** and **Murillo, J.** (2020) Genes *ptz* and *idi*, Coding for Cytokinin Biosynthesis Enzymes, Are Essential for Tumorigenesis and In Planta Growth by *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. *Front. Plant Sci.*, 1–14

INTRODUCCIÓN

La taxonomía del complejo *Pseudomonas syringae* se encuentra en constante cambio. Los avances en las tecnologías de secuenciación han permitido estudiar la evolución genómica de este complejo, incorporando así una mayor diversidad a los análisis comparativos y funcionales. Estos análisis basados en secuencias genómicas permitieron delimitar las especies filogenómicas, así como realizar análisis taxonómicos para clarificar la taxonomía del complejo (Gomila et al., 2017). Recientemente, mediante la comparativa genómica de cepas pertenecientes a este complejo, se ha subdividido la clasificación de los 13 filogrupos definidos hasta la fecha en filogrupos primarios y secundarios (Dillon et al., 2019b).

El complejo *P. syringae* esta formado por 65 patovares, los cuales se separan en base al huésped del cual se aisló, a su rango de huésped y a sus características patogénicas. Además, algunos de estos patovares se dividen en biovares, basados en su diversidad genética y en la producción de toxinas (Ferrante and Scortichini, 2014), o en razas, cuando existe especificidad por el genotipo del huésped (Joardar et al., 2005; Taylor et al., 1996). Muchos estudios genómicos se han centrado en vincular la presencia de genes de virulencia con determinadas enfermedades o con la especificidad de huésped (Baltrus et al., 2011; 2012; O'Brien et al., 2011). Por otro lado, se ha estudiado la evolución de la patogenicidad de diferentes cepas de *P. syringae* en un huésped común, encontrando diferencias en el repertorio de efectores y toxinas (Hulin et al., 2018). Además, se ha evaluado la especificidad o la amplitud del rango de huésped a diferentes cepas de *P. syringae*, estableciendo que el rango de huésped es variable entre cepas, incluso entre las pertenecientes a un mismo patovar (Morris et al., 2019). Sin embargo, la mayoría de los determinantes genéticos que contribuyen al rango de huésped no han sido estudiados en detalle.

Pseudomonas savastanoi pertenece al complejo *P. syringae* e incluye cinco patovares causantes de tumores o excrecencias en plantas leñosas. Estos son *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), pv. *nerii* (Psn), pv. *fraxini* (Psf), pv. *retacarpa* (Psr) y pv. *mandevillae* (Psm), que comprende aislados de olivo (*Olea europaea*), adelfa (*Nerium oleander*), fresno (*Fraxinus excelsior*), retama (*Retama sphaerocarpa*) y dipladenia (*Mandevilla* spp.), respectivamente. Los patovares de *P. savastanoi* han sido claramente diferenciados mediante ensayos de patogenicidad cruzada. Inoculaciones artificiales de cepas de Psv forman tumores en olivo y fresno, pero no en adelfa, mientras que cepas de Psn pueden infectar los tres huéspedes. Por otro lado, las cepas de Psf inducen síntomas tanto en fresno como olivo (Caballo-Ponce et al., 2017a; Iacobellis et al., 1998; Janse, 1982; 1991; Ramos et al., 2012). Los aislados de Psm inducen síntomas en olivo, fresno y dipladenia, mientras que las cepas de Psr restringen su rango de huésped únicamente a retama (Alvarez et al., 1998; Caballo-Ponce, 2017). Esta delimitación tan clara del rango de huésped en las cepas de *P. savastanoi*, apoya el uso de estos patosistemas como base para identificar elementos genéticos implicados en la especificidad de huésped en bacterias formadoras de tumores en plantas leñosas.

Durante la última década se ha obtenido la secuencia de un elevado número de genomas del complejo *P. syringae*, entre las que se encuentran secuencias de *P. savastanoi*. Inicialmente, se publicó el borrador del genoma de la especie Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela et al., 2010), así como la secuencia completa de sus tres plásmidos (Bardaji et al., 2011). Posteriormente, se obtuvieron los borradores genómicos de las cepas de Psv DAPP-PG722 (Moretti et al., 2014) y PseNe107 (Bartoli et al., 2015). Poco después, se hicieron públicas las secuencias genómicas de las cuatro cepas tipo de *P. savastanoi*, como son Psv ICMP 4352, Psn ICMP 16943 (CFBP 5067), Psr ICMP 16945 (CECT 4861) y Psf ICMP 7711 (CFPB 5062) (Nowell et al., 2016; Thakur et al., 2016).

Por último, y como parte de este trabajo se publicó en la base de datos GenBank la secuencia del borrador de la cepa de Psm Ph3 (datos no publicados), y se

publicaron 11 secuencias genómicas nuevas de cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos (Dillon et al., 2019b).

En este capítulo se ha llevado a cabo un análisis genómico comparativo de 21 cepas de *P. savastanoi* aisladas de olivo, adelfa, retama, fresno y dipladenia, pertenecientes a los cinco patovares de *P. savastanoi* que incluyen cepas aisladas de huéspedes leñosos, como son Psv (ocho genomas), Psn (cuatro genomas), Psr (tres genomas), Psf (cinco genomas) y Psm (1 genoma). Aunque inicialmente se incluyeron seis de las cepas aisladas de adelfa en el patovar Psn, análisis de patogenicidad cruzada llevados a cabo en olivo y adelfa determinaron su pertenencia al patovar Psv (Moreno-Pérez et al., 2020).

En el análisis llevado a cabo se determinó el conjunto común de genes de *P. savastanoi*, así como su pangenoma. Además, se realizaron análisis filogenéticos y se identificó el conjunto de genes exclusivos de cepa y de patovar, con el fin de encontrar elementos implicados en la especificidad de huésped y en la evolución de estas cepas en patovares. Finalmente, se analizaron los posibles genes de virulencia codificados por todas cepas incluidas en cada patovar, prestando especial atención a los genes de biosíntesis de las fitohormonas ácido indol-3-acético (IAA) y citoquininas (CKs).

En este capítulo se muestran exclusivamente los resultados obtenidos por Adrián Pintado, relacionados con el análisis filogenético y genómico del pangenoma de *P. savastanoi*, así como del conjunto de genes exclusivos de cepa y patovar. Estos resultados, se han incluido en una publicación reciente que también contiene los resultados de otros investigadores derivados de las inoculaciones cruzadas en diversos huéspedes de varias de las cepas analizadas, así como de la comparativa genómica del sistema de secreción tipo III (T3SS) y su repertorio de efectores (Moreno-Pérez et al., 2020), resultados que han sido excluidos de este Capítulo. En conjunto, todos los resultados obtenidos proporcionan nuevos conocimientos sobre las bases de la especificidad de huésped en patógenos bacterianos formadores de tumores en huéspedes

leñosos y la evolución de estos patógenos en patovares. Asimismo, los resultados aquí mostrados ofrecen una visión detallada de la distribución de genes de biosíntesis de IAA y CKs en la especie *P. savastanoi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se muestran en la Tabla 1. Las cepas de *P. savastanoi* se cultivaron a 28 °C en medio de cultivo lisogénico (LB) (Bertani, 1951).

Manipulación del DNA

Las técnicas moleculares de manipulación de DNA se realizaron siguiendo métodos estándar (Russell and Sambrook, 2001).

Secuenciación y ensamblaje del genoma

El DNA genómico de Psv NCPPB 3335, Psn ESC23, Psr CECT 4861 y Psv NCPPB 1006 se extrajo de células bacterianas cultivadas durante la noche en medio LB a 28 °C, usando un kit JETFLEX de purificación de DNA genómico (Genomed GmbH, Löhne, Alemania). Las muestras de DNA se purificaron adicionalmente mediante extracción con fenol-cloroformo, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en agua bidestilada.

La secuenciación del genoma y el ensamblaje del cromosoma de Psv NCPPB 3335 se realizó en BGI Tech Solutions Co., Ltd. (Hong Kong). Para la secuenciación, se generó una biblioteca de fragmentos de DNA fraccionado aleatoriamente en fragmentos de entre 0.5 y 2.0 kb, los cuales se sometieron a secuenciación Illumina GA II (Solexa). Todas las lecturas generadas (cobertura 200x) fueron evaluadas cualitativamente antes de ensamblarlas con el software “SOAP *de novo*” (Li et al., 2008). El ensamblaje del cromosoma de *P. savastanoi* NCPPB 3335 se realizó tras sustraer la secuencia completa de los tres plásmidos nativos de esta cepa (Bardaji et al., 2011), los cuales están disponibles en NCBI con los números de acceso Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) FR820585 (pPsv48A), FR820586 (pPsv48B) y FR820587 (pPsv48C). Posteriormente, mediante el diseño de cebadores y amplificación por PCR se secuenciaron los huecos restantes y se corrigieron las regiones mal

ensambladas a causa de secuencias repetidas. La secuencia cromosómica completa de *P. savastanoi* NCPPB 3335 se anotó automáticamente en NCBI y se depositó con el número de acceso de Genbank NZ_CP008742 (Tabla 1).

El borrador genómico de las cepas Psn ESC23, Psr CECT 4861, Psf NCPPB 1006 y Psm Ph3 se obtuvo utilizando la plataforma de secuenciación Illumina GA II (cobertura 250x) en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBIR), La Rioja, España. Los genomas se ensamblaron utilizando CLC Genomics Workbench, se anotaron automáticamente en NCBI y se depositaron con los números de acceso de Genbank NZ_NIAY00000000 (Psn ESC23), NZ_NBYW00000000 (Psr CECT 4861), NZ_NIAW00000000 (Psf NCPPB 1006) y NZ_NIAX00000000 (Psm Ph3). Las características generales de estos genomas se muestran en la Tabla 1.

Análisis del *core genome* y del pangenoma

Los análisis de los genes presentes en todos los genomas de las cepas analizadas (*core genome*) y del pangenoma se realizaron utilizando la herramienta de análisis genómico “*Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) tool BPGA v1.3*” (Chaudhari et al., 2016) con secuencias descargadas de NCBI. Para Psv NCPPB 3335, la secuencia del cromosoma y de sus tres plásmidos se concatenó en un solo archivo en el orden 5'-cromosoma-pPsv48A-pPsv48B-pPsv48C-3'. Los genes ortólogos se identificaron utilizando el algoritmo USEARCH (Edgar, 2010) con un umbral de 0.9 (90% de identidad en blastp). Se identificaron grupos de genes ortólogos exclusivos de un genoma específico (genes exclusivos) o codificados en 2 a 20 genomas (genes accesorios). Para los análisis del *core genome* y el pangenoma realizados a nivel de patovar, también se usó BPGA v1.3 con los genomas descargados de NCBI agrupados por patovar y usando los mismos parámetros descritos anteriormente. Para determinar la apertura del pangenoma de *P. savastanoi* y el de sus patovares, el valor de las medianas del número total de genes encontrados en los análisis del pangenoma, se ajustó al modelo descrito en la Ley de Heap (Tabla 2) (Tettelin et al., 2008).

El *core genome* y el pangenoma también se estimó utilizando Roary v3.12.0 (Page et al., 2015), con una identidad mínima (blastp) del 90% y utilizando los mismos genomas que con BPGA pero anotados con Prokka (Seemann, 2014), utilizando Galaxy v1.12.0 en el servidor <http://usegalaxy.org/> (Afgan et al., 2016).

Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas entre las cepas de *P. savastanoi* se analizaron utilizando un alineamiento de 3.4 Mb formado por la secuencia de nucleótidos concatenada de los 3540 genes presentes en el *core genome*, extraído en el análisis con Roary v3.12.0 (Page et al., 2015). La construcción del árbol se llevó a cabo utilizando MEGA7 (Kumar et al., 2016) con el método de máxima verosimilitud y 100 réplicas de *bootstrap* para evaluar la topología del árbol. El genoma de *P. syringae* pv. *ciccaronei* ICMP 5710 (ensamblaje LJPY01) se utilizó como grupo externo.

Identificación de genes específicos de patovar en *P. savastanoi*

El contenido de genes específicos de los patovares de *P. savastanoi* se analizó utilizando Roary v3.12.0 (Page et al., 2015) como se describió anteriormente. La matriz de presencia/ausencia generada se usó para obtener la lista de genes presentes en los genomas de todas las cepas que pertenecen a un patovar, pero ausentes en todos los demás genomas (genes exclusivos de patovar), así como los genes que están ausentes de manera exclusiva en todos los genomas incluidos en el mismo patovar (genes ausentes en patovar). La lista de genes identificados para cada patovar se clasificó primero mediante enriquecimiento funcional utilizando Sma3s.v2 (Casimiro-Soriguer et al., 2017) y, posteriormente, se curó manualmente mediante blastx, para asignar de forma más precisa sus funciones y para simplificar el número de categorías funcionales (Tabla 3, Tabla 4).

Predicción bioinformática de genes de virulencia

La predicción del repertorio de genes de virulencia presentes en los genomas de *P. savastanoi* se llevó a cabo utilizando PIFAR, una herramienta web de libre

acceso para la identificación de factores de interacción planta-bacteria (Martínez-García et al., 2016).

RESULTADOS

Características generales de los genomas de las cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos

Hasta la fecha, todas las cepas secuenciadas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos tenían disponible su secuencia genómica en forma de borrador. Por ello, pese a disponer del borrador de la cepa Psv NCPPB 3335, se obtuvo la secuencia completa del cromosoma, la cual se usó como referencia en los análisis genómicos junto a la secuencia de sus tres plásmidos nativos (Bardaji et al., 2011). La secuenciación se llevó a cabo utilizando la plataforma Illumina GA II, generando un único *conting* de un tamaño total de 6.17 Mb (58% G+C). Se identificaron 5916 genes y 5291 secuencias codificantes de proteínas. La secuencia anotada fue depositada en Genbank bajo el código de acceso NZ_CP008742. Además, con el fin de aumentar el número de representantes de los 5 patovares de *P. savastanoi* con su secuencia genómica disponible, se obtuvieron los borradores genómicos de cuatro cepas cuya patogenicidad en sus respectivos huéspedes había sido demostrada anteriormente: Psn ESC23 (Cerboneschi et al., 2016; Tegli et al., 2011), Psf NCPPB 1006 (Janse, 1981; 1991; Tegli et al., 2011), Psr CECT 4861 (Alvarez et al., 1998) y Psm Ph3 (Caballo-Ponce, 2017; Eltlbany et al., 2012). Los cuatro borradores se obtuvieron mediante secuenciación Illumina GA II y se ensamblaron entre 222 y 316 contings. El contenido de G+C de estos cuatro genomas fue idéntico (58.1%) y similar al del resto de genomas de *P. savastanoi* disponibles (57.9% - 58.3%), al igual que el número de genes y proteínas. Estos genomas se depositaron en Genbank con los números de acceso NZ_NIAY00000000 (Psn ESC2, 5.84 Mb), NZ_NBYW00000000 (Psr CECT 4861, 5.73 Mb), NZ_NIAW00000000 (Psf NCPPB 1006, 5.89 Mb) y NZ_NIAX00000000 (Psm Ph3, 5.87 Mb). La alta calidad de secuenciación obtenida para estos nuevos aislados ha permitido descartar la secuencia de Psr ICMP 16945 e incluir la de Psr CECT 4861 en los análisis, ya que ambos aislados se corresponden a la misma cepa procedente de dos colecciones diferentes. Las características generales de estos cuatro genomas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características genómicas generales de cepas de *Pseudomonas savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos.

Patovar/Cepa ^a	Tamaño del genoma (Mb)	Contenido G+C (%)	Número de genes	Secuencias codificantes	Contigs	Cobertura	Código de acceso ^d	Referencias
pv. fraxini								
NCPPB 1006	5.89	58.1	5584	5054	222	250x	NZ_NIAW000000000	Este trabajo
ICMP 7711 ^{PTb}	6.02	57.9	5784	5155	481	68x	NZ_LLJL000000000	(Thakur et al., 2016)
CFBP 5062 ^{PTb}	6.26	58.0	5828	5430	330	78x	NZ_LIIC000000000	(Nowell et al., 2016)
ICMP 9132	6.05	58.0	5766	5228	575	90.9x	NZ_RBSB000000000	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 7712	5.92	58.1	5583	5091	686	75.8x	NZ_RBSC000000000	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 9129	5.99	58.1	5692	5163	588	105.1x	NZ_RBSA000000000	(Dillon et al., 2019b)
pv. nerija								
ESC23	5.84	58.1	5568	5018	229	250x	NZ_NIAY000000000	Este trabajo
ICMP 16943 ^{PTb}	5.72	58.3	5465	4874	341	45.2x	NZ_LJQW000000000	(Thakur et al., 2016)
CFBP 5067 ^{PTb}	5.79	58.2	5602	4965	242	54x	NZ_LIHX000000000	(Nowell et al., 2016)
ICMP 13781	6.05	57.9	5658	5658	811	35.7x	RBTO000000000	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 16944	5.80	58.1	5479	4944	532	53.3x	NZ_RBUB000000000	(Dillon et al., 2019b)
pv. retacarpa								
CECT 4861 ^{PTb}	5.73	58.1	5516	4920	316	250x	NZ_NBYW000000000	Este trabajo
ICMP 16945 ^{PTb}	5.67	58.1	5457	4686	510	45.3x	NZ_LJRD000000000	(Thakur et al., 2016)
ICMP 16946	5.72	57.9	5373	5373	1103	30.6x	RBQM000000000	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 16947	5.79	58.1	5648	4972	564	46.5x	NZ_RBNM000000000	(Dillon et al., 2019b)
pv. savastanoi								
NCPPB 3335 ^c	6.17	58.0	5916	5291	4	200x	NZ_CP008742 FR820585 FR820586 FR820587	Este trabajo
ICMP 4352 ^{PT}	6.02	58.0	5773	5215	321	66.9x	NZ_LJRJ000000000	(Thakur et al., 2016)
DAPP-PG722	6.42	57.9	6309	5545	412	70x	NZ_JOJV000000000	(Moretti et al., 2014)
PseNe107	6.07	58.0	5793	5263	247	140x	NZ_JYHF000000000	(Bartoli et al., 2015)
ICMP 13519	6.26	57.9	6168	5507	426	90.6x	NZ_RBNW000000000	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 1411	5.80	58.1	5680	5058	383	49.7x	NZ_RBPF000000000	(Dillon et al., 2019b)
0485_9*	5.94	57.9	5946	5946	1918	36.2x	RBNY000000000	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 13786*	5.99	58.0	5719	5066	606	42.8x	NZ_RBTN000000000	(Dillon et al., 2019b)
pv. mandevillae								
Ph3	5.87	58.1	5655	5111	256	250x	NZ_NIAX000000000	Este trabajo

^aEn gris se indican cepas descartadas de los análisis bioinformáticos por disponerse de un genoma de mayor calidad de la misma cepa procedente de otra colección. PT: Cepa tipo.
^bICMP 7711 y CFBP 5062; ICMP 16943 y CFBP 5067; CECT 4861 y ICMP 16945 hacen referencia al mismo aislado obtenido de una colección diferente.
^cNCPPP 3335 incluye la secuencia de su cromosoma (NZ_CP008742) y de sus 3 plásmidos: pPsv48A (FR820585), pPsv48B (FR820586) y pPsv48C (FR820587).
^dNational Centre for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
 Los asteriscos indican cepas de adelfa incluidas en el patovar Psv.

El pangenoma y el *core genome* de *P. savastanoi*

Los análisis genómicos comparativos se llevaron a cabo utilizando la herramienta de análisis del pangenoma (BPGA) y las secuencias de los 21 genomas de *P. savastanoi* seleccionados entre los disponibles hasta la fecha. Estos genomas contenían un total de 136962 genes, los cuales se agruparon en un pangenoma de 7982 grupos de ortólogos (*hard pangenome*), de los cuales 3004 (38%) se encuentran en todas las cepas (*hard-core genome*), 3694 (46%) se clasificaron como accesorios (presentes en 2 - 20 genomas) y los 1300 restantes (16%) se clasificaron como específicos de cepa (Figura 1, Figura 2, Tabla 2). Estos resultados sugieren una composición divergente de cada uno de los 21 genomas. La Figura 2 muestra el número de genes accesorios (1871 a 2402) y genes específicos de cepa (12 a 238) encontrados para cada una de las 21 cepas. Además, también se determinó que únicamente 18 grupos de ortólogos adicionales son parte del *soft-core genome* de *P. savastanoi*, es decir, 3022 grupos presentes en al menos 20 de los 21 genomas (95%).

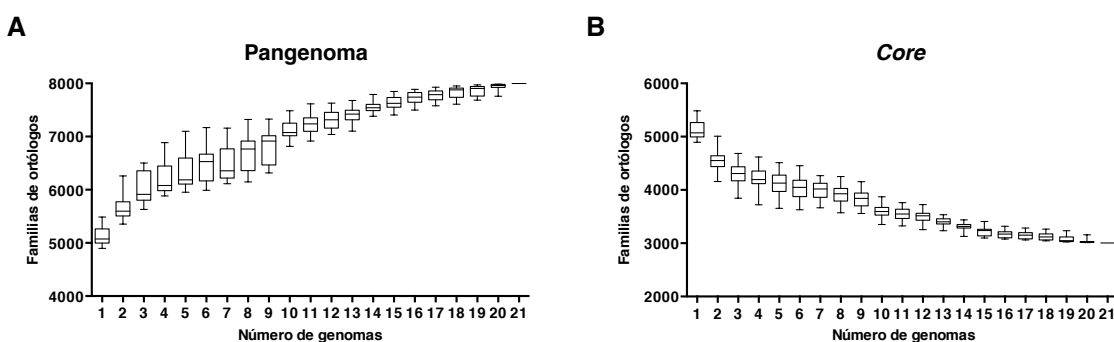


Figura 1. Análisis del *core genome* y el pangenoma de las cepas de *Pseudomonas savastanoi*. El número de grupos de ortólogos se calculó con el algoritmo USEARCH (Edgar, 2010) utilizando un umbral de 0.9 (90% de identidad de blastp). El número de nuevos grupos de ortólogos (**A**) y de grupos de genes presentes en los 21 genomas (**B**) se representa frente al número de genomas añadidos al análisis con BPGA. Los valores se calcularon utilizando 50 iteraciones con un reordenamiento genómico al azar. Las cajas indican los cambios en el número de grupos de ortólogos al aumentar secuencialmente el número de genomas añadidos, con los valores medios indicados con una línea negra horizontal y la desviación estándar con barras verticales.

Para evaluar si el pangenoma de *P. savastanoi* estaba abierto o cerrado, se estimó un parámetro de ajuste (γ) de 0.157 para los 21 genomas utilizando el modelo de la Ley de Heap (Tabla 2), un valor cercano al umbral de $\gamma = 0$ que distingue a un pangenoma abierto ($\gamma > 0$) de un pangenoma cerrado ($\gamma < 0$). Aunque el pangenoma de *P. savastanoi* no está completamente cerrado, las curvas de acumulación para el pangenoma y el *core genome* tienden hacia una asíntota (Figura 1). Por lo tanto, el muestreo de un número mayor de genomas de *P. savastanoi* no supondría, en principio, un aumento significativo del tamaño del pangenoma, ni una reducción sustancial del número de genes presentes en el *core genome* de estas cepas, aunque este aspecto se discutirá con más profundidad más adelante.

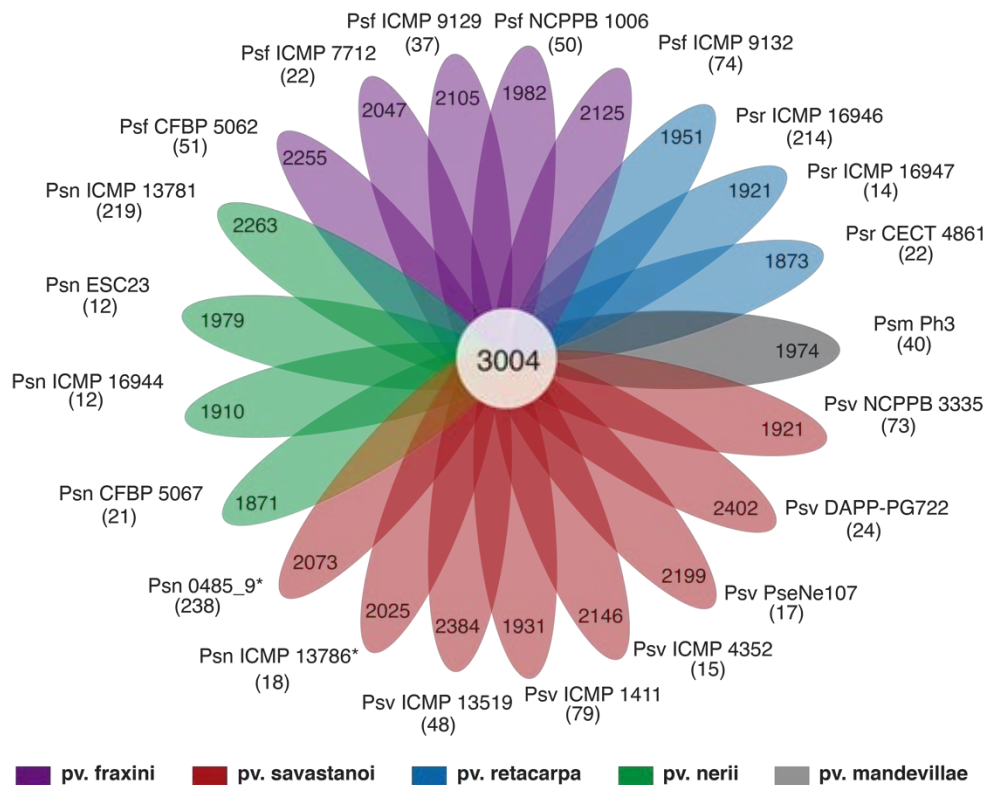


Figura 2. Genes específicos de cepas de *Pseudomonas savastanoi*. En el diagrama se representa el número de genes que forman el *core genome* (centro), los genes accesorios (pétalos) y los genes específicos de cepa (entre paréntesis). Los números se calcularon utilizando la herramienta BPGA, del inglés, *Bacterial Pan Genome Analysis* (Chaudhari et al., 2016). Psv, Psn, Psf, Psr y Psm, *P. savastanoi* pv. savastanoi, nerii, fraxini, retacarpa y mandevillae, respectivamente. Los asteriscos indican cepas aisladas de adelfa e incluidas en Psv.

Tabla 2. Comparación del *core genome* y del pangenoma de los patovares de *Pseudomonas savastanoi*^a

Patovar	Cepas	Hard-core	Soft-core	Hard pangenome	Soft pangenome	Genes presentes exclusivos	Genes ausentes exclusivos	Ley de Heap (γ)
Todas las cepas	21	3004	3022	7998	7982	-	-	0.1576
pv. fraxini	5	4652	4769	5738	5655	35	36	0.0652
pv. retacarpa	3	4282	4378	5846	5752	68	20	0.1395
pv. nerii	4	4107	4218	6201	6094	0	0	0.1431
pv. savastanoi	8	3804	3834	6766	6726	3	0	0.1200
pv. mandevillae	1	-	-	-	-	59	6	-
Asignación de patovar original^b								
pv. savastanoi	6	4309	4345	6166	6122	0	1	0.0937
pv. nerii	6	3689	3734	6720	6650	0	0	0.1512
Otros^c								
pv. mandevillae + pv. nerii	5	3753	3780	6497	6474	14	14	0.1267

^aHard core genome, genes presentes en el 100% de los genomas; Soft core genome, genes presentes en el 95% de los genomas.

^bAnálisis del pv. nerii y pv. savastanoi considerando a las cepas aisladas de adelfa (0485_9 e ICMP 13786) pertenecientes al pv. nerii, como fueron originalmente clasificadas. Los otros análisis se realizaron incluyendo estas dos cepas en el pv. savastanoi.

^cAnálisis del pv. nerii considerando a la cepa Psm Ph3 como miembro del pv. nerii.

Filogenia de los patovares de *P. savastanoi*

Mediante análisis MLSA, del inglés *MultiLocus Sequence Analysis*, el complejo *P. syringae* se separa en 13 filogrupos distintos (Berge et al., 2014; Gomila et al., 2017), los cuales han sido respaldados mediante análisis filogenéticos del *core genome* (Dillon et al., 2019b; Gomila et al., 2017; Nowell et al., 2014). En estos trabajos, los cuatro patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos se han clasificado dentro del filogrupo 3. Para profundizar en las relaciones filogenéticas entre las 21 cepas de *P. savastanoi* aisladas de estos huéspedes (Tabla 1), se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando un alineamiento de nucleótidos de la secuencia concatenada de los genes presentes en el *core genome* de estas cepas. La cepa *P. syringae* pv. *ciccaronei* ICMP 5710 se utilizó como grupo externo (Figura 3). El árbol filogenético permitió identificar cinco grupos bien definidos, dos de ellos con carácter monofilético, formados exclusivamente por cepas pertenecientes a P_{sr} (Grupo P_{sr}) y P_{sf} (Grupo P_{sf}). Por el contrario, el patovar P_{sv} parece no ser monofilético, ya que sus cepas se distribuyen en dos clados independientes. Las cepas P_{sv} NCPPB 3335 y P_{sv} ICMP 1411 forman un grupo (Grupo P_{sv}), próximo a las cepas de P_{sr} y bien diferenciado del resto de cepas de P_{sv}, las cuales se agruparon junto a los aislados de adelfa ICMP 13786 y 0485_9 (Grupo P_{sv}-P_{sn}). Este último grupo contenía también a la cepa tipo P_{sv} ICMP 4352. El resto de las cepas de P_{sn} se agrupó en un clado independiente junto a la cepa P_{sm} Ph3 (Grupo P_{sn}-P_{sm}). Este grupo se encuentra dividido en dos ramas, uno formado por la cepa tipo P_{sn} CFBP 5067 y otro formado por las cepas de P_{sn} y el aislado P_{sm} Ph3.

Identificación de genes específicos de patovar en *P. savastanoi*

El *core genome* y el pangenoma de las 21 cepas de *P. savastanoi* también se analizó a nivel de patovar utilizando la herramienta BPGA (Tabla 2). P_{sf} y P_{sr}, los únicos que forman grupos monofiléticos en el análisis filogenético, mostraron el número más elevado de genes presentes en su *soft-core genome* (presentes en al menos 20 de los 21 genomas), siendo el de P_{sf} el de mayor tamaño (4769 genes), pese a analizar cinco genomas de P_{sf} y solo tres genomas de P_{sr}. Además, usando la Ley de Heap, también se estimó un parámetro de ajuste más

bajo a nivel de patovar para Psf ($\gamma = 0.065$) que para Psr ($\gamma = 0.139$), indicando que su pangenoma se encuentra casi cerrado ($\gamma < 0$). Por otro lado, Psn mostró un *soft-core genome* de 4218 genes, mientras que Psv reducía su tamaño a 3834 genes, indicando una mayor variabilidad en la presencia de genes en las cepas que integran el patovar Psv. Sin embargo, ajustando los resultados del análisis al modelo de la Ley de Heap, Psn mostró un pangenoma más abierto ($\gamma = 0.1431$) que Psv ($\gamma = 0.120$), pese a analizar un mayor número de genomas. Estos resultados sugieren que el contenido génico de las cepas de Psf es más homogéneo que el de los otros cuatro patovares.

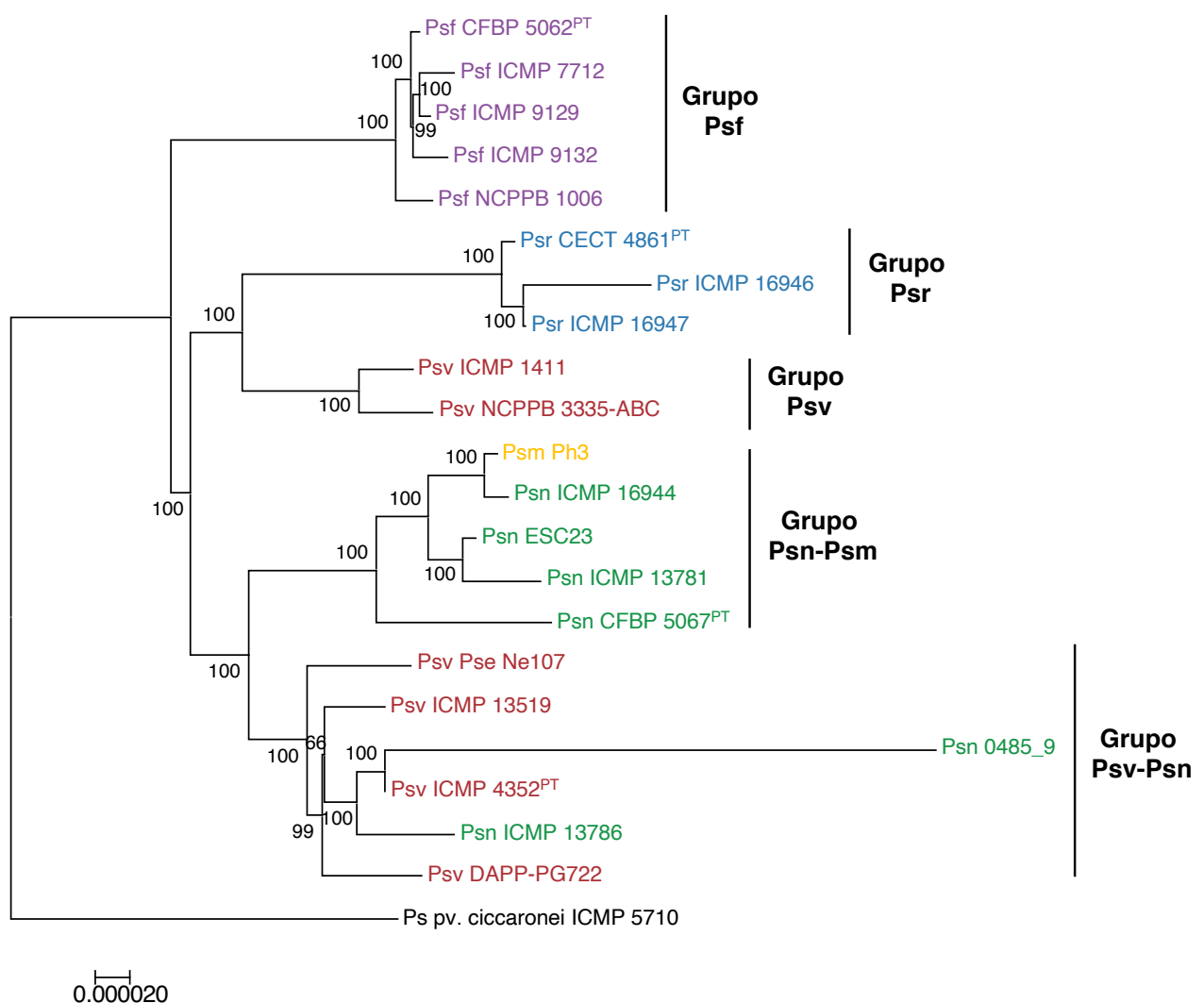


Figura 3. Análisis filogenético basado en el core genome de los patovares de *P. savastanoi*. El árbol se construyó utilizando MEGA7 (Kumar et al., 2016), con el método de máxima verosimilitud. Las secuencias se descargaron de NCBI y se utilizó como referencia la secuencia concatenada del cromosoma y de los tres plásmidos cerrados de Psv NCPPB 3335 (NCPPB 3335-pABC). *P. syringae* pv. ciccaronei ICMP 5710 se utilizó como grupo externo. Los valores en los nodos indican los porcentajes del *bootstrap*. Las abreviaturas de las cepas se indican en la Figura 2; PT, Cepa tipo.

Actualmente, no ha sido posible abordar el análisis del pangenoma del patovar Psm debido a la disponibilidad de un único aislado secuenciado. Por último, también realizamos el análisis considerando la asignación original de los aislados de adelfa 0485_9 e ICMP 13786 dentro del pv. nerii, que impidió la identificación de genes exclusivamente presentes en Psv (Tabla 2).

Las diferencias mostradas en el repertorio de genes entre los patovares de *P. savastanoi*, se analizó utilizando la herramienta de análisis genómico Roary (Page et al., 2015), mediante la cual se obtuvo la lista de genes presentes en los genomas de todas las cepas pertenecientes a cada patovar. De esta forma, se determinaron los genes presentes en todas las cepas de un patovar, pero ausentes en todos los demás genomas (genes exclusivos de patovar) y los genes ausentes en todos los genomas incluidos en el mismo patovar, pero presentes en todos los demás (genes ausentes de patovar). El análisis identificó 165 genes presentes exclusivos, así como 62 genes exclusivamente ausentes en un patovar. La mayoría de estos pertenecían a los patovares Psr, Psf y Psm, con un total de 88, 71 y 65 genes, respectivamente. Sin embargo, únicamente se identificaron 3 genes presentes exclusivamente en Psv, mientras que no se identificó ningún gen en Psn (Tabla 2). Los genes identificados para cada patovar se agruparon en categorías funcionales y luego se clasificaron manualmente en 8 categorías (Anexos 1 y 2). Dentro de estas categorías, las formadas por proteínas hipotéticas (HP) y los genes relacionados con el metabolismo eran las que incluían un mayor número de genes. Además, se encontraron genes involucrados en la replicación, recombinación, mutación y reparación del DNA, así como proteínas toxina/antitoxina implicadas en el mantenimiento de plásmidos (Bardaji et al., 2019), por lo que es probable que muchos de los genes exclusivos de patovar o ausentes de patovar sean transportados por plásmidos u otros elementos genéticos móviles. Entre los genes exclusivos de patovar se identificaron genes que codifican proteínas con un posible papel en la virulencia y/o especificidad de huésped, como 13 factores de transcripción, tres proteínas relacionadas con el metabolismo del di-GMP cíclico, dos proteínas relacionadas con quimiotaxis, 20 transportadores pertenecientes a ocho superfamilias

diferentes, cuatro efectores del T3SS exclusivos de P_{sr} y 11 genes relacionados con el sistema de secreción tipo IV (T4SS) exclusivos de P_{sm} (Tabla 3). Por otro lado, en todos los genomas de P_{sf} se identificó la ausencia de los genes implicados en la biosíntesis de la fitotoxina rizobitoxina (*rtxA* y *rtxC*), los genes *hxcU*, *hxcP* y *hxcV* del sistema de secreción tipo II (T2SS) y los genes ALO43_200111 y *gmr_8*, relacionados con la síntesis de una bacteriocina y con el metabolismo del di-GMP cíclico, respectivamente (Tabla 4). Todos estos genes están ausentes en P_{sf} y son compartidos por las cepas de los 4 patovares tumorigénicos de *P. savastanoi*, por lo que podrían ser esenciales para la inducción de tumores en diversos huéspedes de plantas.

En general, el número de genes exclusivos y ausentes de patovar identificados fue inversamente proporcional al número de genomas analizados, siendo P_{sr} (tres genomas) y P_{sm} (un genoma) los patovares donde encontramos un mayor número de genes exclusivos. Sin embargo, se identificaron 3 genes presentes exclusivamente en P_{sv} solo cuando las cepas aisladas de adelfa 0485_9 e ICMP 13786 se analizaron junto con las otras seis cepas de P_{sv} (Tabla 2, Anexo 1). Por lo tanto, las cepas 0485_9 e ICMP 13786 comparten más genes con las cepas de P_{sv} que con las de P_{sn} reforzando su asignación al patovar P_{sv}, que como se indicó en la Introducción de este Capítulo, también se apoya por el rango huésped que mostraron estos aislados en ensayos de patogenicidad cruzada (Moreno-Pérez et al., 2020).

Por último, teniendo en cuenta que la reorganización de las cepas 0485_9 e ICMP 13786 en P_{sv} permitió la identificación de genes exclusivos de P_{sv} debido a la proximidad filogenética la cepa P_{sm} Ph3 y las cuatro cepas de P_{sn}, se llevó a cabo el análisis genómico reasignando la cepa P_{sm} Ph3 como miembro del patovar P_{sn}, coincidiendo con el grupo P_{sn}-P_{sm} definido en el análisis filogenético (Figura 3). El análisis del *core genome* y del pangenoma del grupo P_{sn}-P_{sm}, mostró una disminución del tamaño del *soft-core genome* hasta los 3780 genes, debido al aumento del número de genomas en el análisis (Tabla 2). Además, ajustando los datos obtenidos en el análisis del pangenoma al modelo de la Ley de Heap se obtuvo un parámetro de ajuste similar ($\gamma = 0.1267$)

pero inferior al obtenido en ausencia de Psm Ph3 ($\gamma = 0.1431$).

Tabla 3. Genes presentes exclusivos de patovar.

Patovar	Gen	Descripción ^a
Regulación génica: Transducción de la señal		
Psf	<i>cph2</i>	Fitocromo
Psf	MDS_1714	Proteína quimiorreceptora MCP
Psf	-	Diguanilato ciclasa
Psm	<i>morA</i>	Diguanilato ciclasa - fosfodiesterasa
Psr	<i>csrA</i>	Regulador de almacenamiento de carbono
Psr	<i>cheY</i>	Transducción de señales al motor flagelar
Psr	<i>gmr</i>	Diguanilato ciclasa
Regulación génica: Regulador transcripcional		
Psf	<i>cysL</i>	Regulador transcripcional de tipo HTH
Psf	<i>lysR</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR
Psf	<i>nicS</i>	Represor transcripcional de tipo HTH
Psf	<i>prtR-2</i>	Regulador transcripcional
Psf	<i>luxR</i>	Regulador transcripcional
Psm	<i>araC</i>	Regulador transcripcional de la familia AraC
Psm	<i>gntR</i>	Regulador transcripcional de tipo HTH
Psm	<i>lacI</i>	Regulador transcripcional de la familia LacI
Psm	<i>trfB</i>	Represor transcripcional
Psr	ALO83_200107	Nucleotidiltransferasa
Psr	K788_0009225	Regulador transcripcional de la familia Xre
Psr	<i>murR</i>	Regulador transcripcional de tipo HTH
Psr	PSTA9_01826	Regulador transcripcional de tipo HTH
Sistemas de secreción		
Psf	<i>traX</i>	Acetilación de pilina F
Psm	<i>mpr</i>	Metaloproteinasa de zinc
Psm	<i>rhsB</i>	Proteína del T4SS
Psm	<i>taxB</i>	Proteína del T4SS
Psm	<i>trbL</i>	Proteína del T4SS
Psm	<i>virB11</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB4</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB5</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB6</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB8</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB9</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virD2</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virD4</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>vgrG1</i>	Proteína del T6SS
Psr	IL1374	Posible efector del T3SS
Psr	-	Posible efector del T3SS
Psr	<i>shcF-1</i>	Chaperona del T3SS
Psr	<i>avrRps4</i>	Efector del T3SS
Psr	<i>hopZ5</i>	Efector del T3SS
Psr	<i>hopF1</i>	Efector del T3SS
Psr	JCM19235_169	Proteína del T6SS
Toxinas - Antitoxinas		
Psm	<i>hth</i>	Proteína con módulo antitoxina
Psm	<i>relE</i>	Toxina bacteriana
Psr	AL052_07095	Sistema toxina-antitoxina
Psr	ALO40_200213	Sistema toxina-antitoxina

^aT3SS: Sistema de secreción tipo 3; T4SS: Sistema de secreción tipo 4; T6SS: Sistema de secreción tipo 6. MCP: del inglés, *Methyl-accepting chemotaxis protein*; HTH: hélice-giro-hélice.

Tabla 4. Genes ausentes exclusivos de patovar identificados.

Patovar	Gen	Descripción ^a
Regulación génica: Transducción de la señal		
Psf	<i>cheY</i>	Transducción de señales al motor flagelar
Psf	<i>gmr_8</i>	Proteína fosfodiesterasa
Psf	<i>cph2</i>	Proteína con dominio HK/GAF
Psm	ebA163	Fosfodiesterasa con dominio PAS
Psr	ALO93_100394	Proteína con dominio PAS
Regulación génica: Regulador transcripcional		
Psf	<i>prtR-1</i>	Regulador transcripcional
Psm	<i>rsuA</i>	Pseudouridina sintasa
Psm	<i>cscR</i>	Regulador transcripcional
Psr	<i>csoR</i>	Regulador transcripcional
Sistemas de secreción		
Psf	<i>hxcP</i>	Proteína del T2SS
Psf	<i>hxcV</i>	Proteína del T2SS
Psf	<i>hxcU</i>	Proteína del T2SS
Psf	<i>tssM2</i>	Proteína del T6SS
Psr	ORF2	Posible efector del T3SS
Psr	<i>cagZ</i>	Proteína del T4SS
Toxinas - Antitoxinas		
Psf	<i>rtxA</i>	O-acetilhomoserina aminocarboxipropiltransferasa
Psf	<i>rtxC</i>	Dihidrorhizobitoxina desaturasa
Psf	ALO43_200111	Bacteriocina

^aT2SS: Sistema de secreción tipo II; T3SS: Sistema de secreción tipo III; T4SS: Sistema de secreción tipo IV; T6SS: Sistema de secreción tipo VI. MCP: del inglés, *Methyl-accepting chemotaxis protein*; HTH: hélice-giro-hélice; HK: histidina quinasa; GAF: dominio GAF presente en GMP-fosfodiesterasas, adeniliclasas y FhIA.

Por otro lado, la inclusión de la cepa Psm Ph3 dentro del pv. *nerii* provocó cambios en el repertorio de genes exclusivos de patovar, ya que permitió la identificación de un total de 14 genes exclusivos presentes, así como 14 genes exclusivos ausentes.

Los genes identificados se clasificaron y ordenaron siguiendo las categorías descritas anteriormente (Tabla 5). Siguiendo la tendencia anterior, las categorías formadas por HP (nueve genes) y los genes relacionados con el metabolismo (seis genes) fueron las mayoritarias. En el grupo Psn-Psm, también se identificaron elementos con un posible papel en la virulencia y/o especificidad de huésped, como la presencia exclusiva del factor de transcripción *dksA* y la chaperona ShcF-2 del T3SS. Además, se identificó la ausencia en Psm y los

cuatro genomas de Psn del factor de transcripción *gstR* y del gen *hsvC*, requerido para la biosíntesis de la fitotoxina fevamina A (O'Neill et al., 2018).

Tabla 5. Genes presentes y ausentes relacionados con virulencia y/o especificidad de huésped identificados exclusivamente en el grupo Psn-Psm.

Patovar	Gen	Descripción ^a
Replicación, recombinación, mutación y reparación del DNA		
Ausente	<i>parD</i>	Determinante de estabilidad del DNA
Presente	ALO37_02080	Integrasa
Presente	<i>xerC</i>	Recombinasa
Presente	ALO81_200031	Proteína de unión a DNA de una cadena
Regulación		
Ausente	<i>gstR</i>	Regulador transcripcional
Presente	<i>dkSA</i>	Factor de transcripción de unión a RNA-pol
Metabolismo		
Ausente	<i>guaB1</i>	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa
Presente	ALO63_04253	Inosina/uridina nucleosido hidrolasa
Presente	<i>amnD</i>	2-aminomuconato desaminasa
Presente	<i>bbsF</i>	Degradación de tolueno
Presente	<i>entA</i>	3-oxoacil reductasa
Presente	<i>gabD</i>	Succinato-semialdehído deshidrogenasa
Sistemas de secreción		
Ausente	orf215	Ruta de translocación de arginina
Presente	<i>shcF-2</i>	Chaperona del T3SS
Toxinas-Antitoxinas		
Ausente	<i>hsvC</i>	Biosíntesis de fevamina A
Ausente	<i>dinJ</i>	Proteína con módulo antitoxina
Ausente	<i>fusC</i>	Resistencia a ácido fusárico
Otros		
Presente	<i>inaZ</i>	Proteína de nucleación

^aT3SS: Sistema de secreción tipo 3.

Por lo tanto, las cepas Psm Ph3 y los cuatro representantes de Psn analizados en este trabajo presentan un contenido génico similar, ya que la formación del grupo Psn-Psm provoca la aparición de 28 genes exclusivos presentes y ausentes en estas cepas, permitiendo la identificación de una serie de genes posiblemente relacionados con virulencia y/o especificidad de huésped, los cuales pueden ser esenciales para el desarrollo de síntomas en adelfa.

Identificación de factores de virulencia mediante PIFAR

Finalmente, se realizó una predicción bioinformática del repertorio de genes de virulencia presentes en las 21 cepas de *P. savastanoi* utilizando PIFAR (Figura 4) (Martínez-García et al., 2016), prestando especial atención a los genes de biosíntesis de las fitohormonas IAA y CKs. De acuerdo con los datos publicados previamente, el operón *iaaMH*, requerido para la biosíntesis de IAA y la formación de tumores tanto en cepas de Psn como de Psv (Aragón et al., 2014; Cerboneschi et al., 2016), se identificó en todos los patovares, excepto Psf. Sin embargo, todas las cepas de *P. savastanoi* codifican el gen *iaaL*, requerido en cepas de Psn para la biosíntesis del conjugado aminoacídico 3-indol-acetil- ϵ -L-lisina (Glass and Kosuge, 1986). Las cepas de Psf tampoco codifican los genes *ptz* e *idi* (Iacobellis et al., 1998), implicados en la biosíntesis de CKs y necesarios para la correcta formación de tumores en Psv y Psn (Iacobellis et al., 1994). Además, tampoco se encontró el gen *ptz* en la cepa Psn ICMP 13781 ni en los aislados de adelfa 0485_9 e ICMP 13786. Trabajos anteriores, han demostrado la ausencia del gen *ptz* en algunas cepas de Psn, lo que podría estar relacionado con la codificación plasmídica de este gen en la mayoría de las cepas de Psn (Caponero et al., 1995; Perez-Martinez et al., 2008).

Entre los factores de adhesión analizados por PIFAR, encontramos que los genes necesarios para la biosíntesis de celulosa están ausentes en todas las cepas de Psf y que las proteínas que contienen un dominio de hemaglutinación solo están codificadas en las tres cepas de Psr, Psf NCPPB 1006 y Psv ICMP 1411. El gen *xadM*, que codifica una adhesina requerida para una correcta adhesión, formación de biopelículas y virulencia en *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Pradhan et al., 2012), también se encontró en casi todos los genomas de *P. savastanoi*. La región WHOP, implicada en el metabolismo de compuestos aromáticos, se encontró completa en todas las cepas de *P. savastanoi* (Figura 4).

Patovar	Cepa	<i>iaaM</i>	<i>iaaH</i>	<i>iaaL</i>	<i>ptz</i>	<i>idi</i>	<i>efe</i>	ACR	SMR	MATE	OEP	<i>attC</i>	<i>attG</i>	<i>xadM</i>	Celulosa	Hema	Usher	Fimbrial	WHOP
pv. fraxini	NCPBP 1006			■				13	2	4	16					■			
	CFBP 5062			■				14	2	4	14								
	ICMP 9132			■				13	2	4	16			■					
	ICMP 9129			■				13	2	4	16			■					
	ICMP 7712			■				15	2	4	14								
pv. retacarpa	CECT 4861	■	■	■		*		12	2	4	13								
	ICMP 16946	■	■	■				22	2	4	14								
	ICMP 16947	■	■	■				13	2	4	14								
pv. savastanoi	NCPBP 3335	■	■	■				11	2	5	11								
	ICMP 1411	■	■	■		*		13	2	5	11					■			
	DAPP-PG722	■	■	■				12	2	5	16								
	PseNe107	■	■	■				12	1	6	15								
	ICMP 4352	■	■	■				12	2	5	16								
	ICMP 13519	■	■	■				12	2	5	15								
	0485_9	*		*				19	2	5	13			■					
	ICMP 13786	■	■	■				12	2	4	15								
pv. nerii	ESC23	■	■	■	▨			11	2	5	13								
	CFBP 5067	■	■	■				12	2	4	13								
	ICMP 16944	■	■	■				12	2	4	13								
	ICMP 13781	■	■	■				13	2	4	16								
pv. mandevillae	Ph3	■	■	■				12	2	5	13								

Fitohormonas

MDR

Adhesión

Figura 4. Predicción bioinformática del repertorio de genes de virulencia presentes en cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos. Los cuadros negros y los cuadros blancos indican la presencia o ausencia del gen o conjunto de genes indicado, respectivamente; el asterisco muestra genes no encontrados en el genoma correspondiente pero identificados por PCR; los cuadros rayados muestran genes que no se encuentran en el borrador del genoma correspondiente, pero que se encuentran en las lecturas no ensambladas. *iaaM*, *iaaH* e *iaaL*; genes relacionados con el ácido indol-3-acético (IAA); *ptz* e *idi*, genes relacionados con citoquininas; *efe*, gen de la enzima productora de etileno. MDR, transportador de resistencia a múltiples fármacos; ACR; transportador de tipo acridina de la familia resistencia/nodulación/división celular (RND); SMR, familia de pequeños transportadores multidrogas; MATE, familia de transportadores de compuestos tóxicos y multidrogas; OEP, transportador de salida de membrana externa (familia RND); *attC* y *attG*, homólogos de genes de unión (*Agrobacterium tumefaciens*); *xadM*, homólogo del gen de adhesión (*Xanthomonas oryzae*); Celulosa, celulosa sintasa; Hema, proteína de repetición de hemaglutinina; Usher, proteína usher de membrana externa; Fimbrial, proteína fimbrial. Los factores de virulencia se identificaron utilizando la herramienta web PIFAR (Martínez-García et al., 2016).

DISCUSIÓN

Los métodos basados en genómica han ofrecido una resolución sin precedentes para el análisis de la diversidad y las relaciones evolutivas dentro del complejo *P. syringae*, además de permitir la identificación de genes candidatos involucrados en la patogenicidad y la definición del rango del huésped (Baltrus et al., 2011; 2017; Bartoli et al., 2015; Dillon et al., 2019a; 2019b; Lindeberg et al., 2009; Monteil et al., 2016). Con estos antecedentes, en este capítulo se ha llevado a cabo la secuenciación de cuatro nuevas cepas de *P. savastanoi*: Psn ESC23, Psr CECT 4861, Psf NCPPB 1006 y Psm Ph3 y se ha realizado un análisis genómico comparativo de 21 cepas representantes de los cinco patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos. Este análisis ha permitido la identificación de genes potencialmente implicados en la determinación del rango de huésped y, junto al análisis filogenético, ha apoyado la correcta clasificación de dos cepas aisladas de adelfa al patovar Psv.

El pangenoma de *P. savastanoi* y sus patovares

El pangenoma de *P. savastanoi* (21 cepas) calculado en este trabajo es aproximadamente 10 veces más pequeño que el obtenido en el análisis de las cepas pertenecientes al complejo *P. syringae* (391 genomas) y 3.5 veces menor que el obtenido en el análisis de todas las cepas pertenecientes al filogrupo 3 (143 genomas) (Dillon et al., 2019b). Además, mientras que el pangenoma del complejo *P. syringae* ($\gamma = 0.425$) y de las cepas del filogrupo 3 ($\gamma = 0.527$) se encuentra abierto (Dillon et al., 2019b), el de *P. savastanoi* está casi cerrado ($\gamma = 0.157$) (Tabla 2). La gran homogeneidad de los genomas de *P. savastanoi* resulta en un bajo contenido en genes específicos de cepa y patovar (16% de genes específicos de cepa *versus* aproximadamente el 60% en el complejo *P. syringae*), lo que probablemente refleja relaciones filogenéticas cercanas, un gran repertorio de genes específicos de nicho compartidos y, tal vez, una incapacidad natural para adquirir DNA exógeno (Pérez-Martínez et al., 2007). Sin embargo, también es posible que los genomas analizados no representen la verdadera diversidad de la especie y sus cuatro patovares de huéspedes

leñosos. Por lo tanto, el análisis de genomas adicionales de *P. savastanoi* procedentes de cepas aisladas del huésped leñosos, así como de la superficie de plantas herbáceas o de plantas no huésped y de ambientes no agrícolas, podría añadir diversidad genética a este patógeno, lo que resultaría en pangenomas de *P. savastanoi* y de sus patovares más abiertos, así como en un número más reducido de determinantes de rango de huésped que los identificados en este estudio. De hecho, otros autores han publicado la existencia de una mayor variabilidad genotípica y fenotípica entre cepas de *P. savastanoi*, como por ejemplo la capacidad de producir levano o rangos huésped atípicos (Cinelli et al., 2014; Marchi et al., 2005; Moretti et al., 2016; Morris et al., 2019; Sisto et al., 2007).

Si se compara el tamaño del *core genome* de *P. savastanoi* con el obtenido en otras bacterias patógenas, observamos que el *core genome* de *Erwinia amylovora* tiene tamaño similar (3414), representando más del 80% del tamaño total de su pangenoma, lo cual contrasta con el obtenido para *P. savastanoi* (38%) (Mann et al., 2013). Estos datos sugieren una mayor diversidad genética en la especie *P. savastanoi*, quizás debida a la adaptación a diversos huéspedes, o bien, al análisis genómico de cepas muy similares en *E. amylovora*. Por el contrario, *Pseudomonas aeruginosa* presenta un *core genome* de 2503 genes, que representan solo el 15% del tamaño total del pangenoma. Además, el 54% de sus genes están presentes en más de un genoma, dato similar al obtenido para *P. savastanoi* (46%), y presentaban una amplia variedad de funciones, como genes de resistencia a antibióticos, sistemas de secreción de toxinas o proteínas efectoras (Mosquera-Rendón et al., 2016).

Filogenia y rango de huésped de *P. savastanoi*.

La filogenia derivada del alineamiento del *core genome* de *P. savastanoi* presenta una distribución similar a la obtenida en el análisis filogenético anteriormente realizado con 40 genes esenciales (Moreno-Pérez et al., 2020). Además, las cepas de Psf, Psn, Psr, Psv y Psm se agruparon en una rama independiente y estrechamente relacionadas con cepas no tumorigénicas, de

acuerdo con lo indicado en trabajos anteriores (Dillon et al., 2019b; Gomila et al., 2017). Esto sugiere que las cepas de Psf, Psn, Psr, Psv y Psm se originaron de un ancestro común, que probablemente adquirió la capacidad de inducir tumores en plantas.

Estos patovares también se corresponden con linajes genéticos bien definidos, que indican la presencia de distintos eventos evolutivos que llevarían a su especificidad de huésped. En el análisis filogenético del *core genome* de *P. savastanoi* realizado en este trabajo, se han identificado grupos formados por cepas exclusivas de un patovar (Grupo Psf y Grupo Psr). Por otro lado, Psr también forma un grupo monofilético independiente. Estudios anteriores realizados mediante MLSA de cuatro genes esenciales, no incluyeron la cepa Psr DAPP-PG769 en el mismo clado que Psv, Psn y Psf, sino que la agrupó junto a *P. syringae* pv. *ribicola*, sugiriendo que Psr tal vez no debería ser considerado miembro del grupo *P. savastanoi* (Moretti et al., 2016). Sin embargo, análisis posteriores utilizando un mayor número de genes esenciales (Moreno-Pérez et al., 2020), así como la filogenia genómica realizada en este trabajo, respaldan la clasificación de los aislados de Psr dentro de la especie *P. savastanoi*.

Por otro lado, el análisis filogenético del *core genome* demostró que las cepas de Psv, Psn y Psm agrupaban entre sí, contrastando con el carácter monofilético de las cepas de Psf y Psr. Las cepas de Psv se distribuyen en dos clados separados, agrupados con Psr o Psn (Figura 3). Sin embargo, la aparición de diferentes linajes genéticos para un patovar no es nueva (Gironde and Manceau, 2012; Hulin et al., 2018; Martín-Sanz et al., 2012; 2013), ya que los patovares son definidos por su capacidad de inducir síntomas y no necesariamente por su relación filogenética (Young et al., 1992). Además, también es posible que los dos linajes genéticos de Psv muestren diferencias en su rango de huésped, ya que en ensayos de patogenicidad en 15 hospedadores herbáceos y leñosos se identificó un rango de huésped más amplio en Psv PseNe107 (Grupo Psv-Psn) que en Psv NCPPB 3335 (Grupo Psv) (Morris et al., 2019).

Las cepas de Psv también agruparon con dos aislados de adelfa (Grupo Psv-Psn), supuestamente pertenecientes al pv. nerii (Figura 3). La reubicación de las cepas 0485_9 e ICMP 13786 formando parte de Psv, provoca la aparición de genes exclusivos no identificados anteriormente, indicando una mayor similitud de estos aislados con las cepas de Psv que con las cepas de Psn (Tabla 2). Además, los aislados 0485_9 e ICMP 13786, junto al resto de cepas de Psv, codifican una secuencia DNA (datos no mostrados) específica del patovar savastanoi (Tegli et al., 2010), mientras que dicha secuencia no se encontró en el resto de los genomas de Psn. Por último, ensayos de inoculación cruzada entre cepas de Psv y Psn no incluidos en este trabajo han demostrado que todas las cepas incluidas en el patovar Psv en este análisis son capaces de producir síntomas en olivo pero no en adelfa (Moreno-Pérez et al., 2020). Por tanto, los resultados aquí obtenidos también apoyan la inclusión de las cepas 0485_9 e ICMP 13786 en el patovar Psv.

Por último, el análisis filogenético también mostró una clara asociación evolutiva entre las cepas de Psn y Psm (Figura 3). La reasignación de Psm dentro de Psn (Grupo Psn-Psm) provocó cambios en el pangenoma de estas cepas y evidenció la alta proximidad evolutiva entre ellas.

Los análisis genómicos realizados en este trabajo no han descrito la presencia de genes exclusivos de Psn, sin embargo, se han identificado 28 genes cuya presencia o ausencia es exclusiva del grupo Psn-Psm, reforzando la teoría de una emergencia de las cepas de Psm a partir de cepas de Psn (Eltlbany et al., 2012). Además, inoculaciones artificiales de cepas de *P. savastanoi* han demostrado que solo las cepas de Psn y Psm son capaces de inducir síntomas en dipladenia (Caballo-Ponce, 2017), aunque el rango de huésped de ambos patovares no es idéntico. Por otro lado, también se han identificado genes exclusivos de Psm en este trabajo que podrían ser relevantes en la especificidad de huésped, apoyando la asignación de Psm como un patovar independiente de *P. savastanoi*.

Genes específicos de patovar

Utilizando dos estrategias complementarias (Roary y PIFAR), en ese trabajo se ha identificado un repertorio de genes específicos de patovar potencialmente implicados en especificidad de huésped (Tabla 2, Figura 4, Anexo 1). La mayoría de los genes presentes o ausentes han sido identificados en los genomas de cepas pertenecientes a los dos grupos monofiléticos (Psr o Psf). El análisis de su posible función nos ha permitido identificar determinados genes asociados con virulencia, que podrían estar directamente implicados en las diferencias en el rango de huésped de estas cepas.

En Psr se han identificado tres efectores del T3SS presentes de manera exclusiva (*avrRps4*, *hopZ5*, *hopF1*). El T3SS ha sido identificado como un elemento clave en virulencia (Cunnac et al., 2009; Mansfield, 2009), ya que permite la translocación de proteínas efectoras de la bacteria al citoplasma de la célula vegetal, donde actúan suprimiendo las respuestas de defensa de la planta a diferentes niveles (Zhou and Chai, 2008). Además, el repertorio de efectores de bacterias fitopatógenas ha sido identificado como uno de los determinantes más relevantes del rango de huésped en el complejo *P. syringae* (Baltrus et al., 2011). Por lo tanto, los tres efectores identificados exclusivamente en Psr podrían jugar un papel importante en la supresión de la respuesta inmune de la planta y estar relacionados con la interacción específica Psr-retama.

El T4SS también constituye un sistema de translocación de proteínas al citoplasma de células vegetales que se ha relacionado con los sistemas de conjugación bacteriana y con la virulencia de bacterias fitopatógenas (Christie and Cascales, 2005; Kang et al., 2002). Psv NCPPB 3335 contiene un sistema de secreción tipo IV-A completo y un tipo IV-B incompleto (Perez-Martinez et al., 2008), y nuestros resultados sugieren la presencia en Psm de un conjunto de genes *virB/virD4* (tipo IV-A) diferente al de Psv NCPPB 3335, no presentes en ninguna otra cepa de *P. savastanoi*. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el diferente rango de huésped de las cepas de Psn y Psm (Caballo-Ponce, 2017).

Las cepas de Psf son las únicas que no codifican el operón *iaaMH* (Figura 4) ni los genes *rtxA* y *rtxC*, implicados en la biosíntesis de la fitotoxina rizobitoxina (Sugawara et al., 2006). La producción de fitotoxinas se ha relacionado con la especialización de cepas de *P. syringae* en un huésped común, así como con su patogenicidad. Cepas de *P. syringae* pv. morsprunorum y *P. syringae* pv. syringae productoras de coronatina, syringomicina, syringolina o syringopeptina infectan cerezo, mientras que cepas carentes de estas toxinas no lo hacen (Hulin et al., 2018). De acuerdo con nuestros resultados, en *Bradyrhizobium japonicum* se ha descrito una correlación entre la producción de rizobitoxina y producción de IAA (Minamisawa and Fukai, 1991). Además, en *Xanthomonas oryzae* se ha descrito la presencia los genes *rtxAC* entre dos secuencias de inserción, formando una estructura de transposón (Sugawara et al., 2006), lo que podría estar relacionado con la ganancia de estos genes mediante transferencia horizontal.

El gen *ptz*, involucrado en la producción de CKs, no se encontró en las cepas de Psf, ni en los genomas de Psn ICMP 13781, ni en las cepas de adelfa reasignadas en Psv (0485_9 e ICMP 13786) (Figura 5). Aunque este gen es de codificación plasmídica en la mayoría de las cepas de Psn, algunas de ellas no lo contienen (Caponero et al., 1995; Perez-Martinez et al., 2008). Las CKs se han correlacionado con los síntomas inducidos por *P. savastanoi* en olivo y en adelfa (Surico et al., 1985), aunque la cepa Psn ICMP 13781 no contiene *ptz* pero induce tumores en plantas de olivo tan grandes como los producidos por otras cepas de Psn que lo codifican (Moreno-Pérez et al., 2020). Por tanto, al igual que ocurre en Psv, la inducción de síntomas completos por Psn en olivo también depende probablemente de otros determinantes de virulencia (Caballo-Ponce et al., 2017a).

El gen *hsvC*, implicado en la biosíntesis de fevamina, se localizó en todos los patovares excepto en Psn y Psm (Grupo Psn-Psm). Esta molécula, compuesta de una espermidina, L-Fenilalanina y L-Valina modificadas, promueve el crecimiento bacteriano suprimiendo la respuesta inmune de la planta. La

implicación en virulencia de esta fitotoxina ha sido demostrada en *E. amylovora* (OH et al., 2005) y, recientemente, en *P. syringae* pv. tomato, donde se demostró que contribuye a la virulencia en *Arabidopsis*, suprimiendo la respuesta inmune inducida por flagelina (O'Neill et al., 2018).

Por último, una gran cantidad de genes específicos identificados en este trabajo han sido anotados como proteínas hipotéticas, proteínas que representan una colección diversa de genes específicos de patovar que pueden ser clave en la de *P. savastanoi* con sus huéspedes. Sin embargo, conviene recordar que la asignación de alguno de los genes identificados como ausentes en algunos patovares puede deberse a errores de secuenciación o ensamblaje de los genomas, así como a la exigencia en el análisis mediante Roary de cubrirse al menos el 90% de identidad. Por tanto, la curación manual gen a gen resulta adecuada para la identificación exacta de genes específicos de patovar.

En conclusión, además de los genes del T3SS, cuyo papel en la especificidad de huésped ya se ha demostrado en el complejo *P. syringae*, nuestros resultados sugieren la existencia en *P. savastanoi* de otros factores de virulencia que también podrían contribuir a la definición del rango del huésped, como las proteínas secretadas por los diferentes sistemas de secreción, genes involucrados en la biosíntesis de las fitotoxinas rizobitoxina y fevamina A, una gran cantidad de reguladores transcripcionales, proteínas involucradas en el metabolismo de di-GMP cíclico, proteínas implicadas en la transducción de señales, una colección de transportadores, así como diferencias metabólicas.

ANEXO 1 - Genes presentes exclusivos de patovar

Patovar	Gen	Descripción ^a
Replicación, recombinación, mutación y reparación del DNA		
Psf	ALO65_19095	Helicasa con caja DEAD/DEAH
Psf	ALO40_02245	Resolvasa
Psf	ALO58_00980	Integrasa
Psf	<i>rlgA-1</i>	Integrasa
Psf	<i>rlgA-2</i>	Integrasa
Psf	<i>rulA</i>	Proteína de resistencia a ultravioleta
Psf	<i>rulB</i>	DNA polimerasa
Psm	ALO43_200551	Relaxasa
Psm	GDI0028	Transposasa
Psm	<i>mobC</i>	Relaxasa
Psm	<i>orfA</i>	Transposasa
Psm	<i>repA</i>	Proteína de replicación plasmídica RepA
Psm	<i>res</i>	Resolvasa
Psm	<i>tnpR</i>	Resolvasa
Psm	<i>parA</i>	Proteína de partición ParA
Psm	<i>parB</i>	Proteína de partición ParB
Psm	TO66_31695	DNA primasa
Psn-Psm	ALO37_02080	Integrasa
Psn-Psm	<i>xerC</i>	Tirosina recombinasa XerC
Psn-Psm	ALO81_200031	Proteína de unión a DNA monocatenario
Psr	<i>repA</i>	Proteína de replicación plasmídica RepA
Psr	ALO53_01572	DNA methylasa
Psr	ALO58_00980	Integrasa
Psr	<i>comM</i>	Proteína de iniciación de la replicación
Psr	<i>mobB</i>	Relaxasa
Psr	<i>orf268</i>	Proteína de alivio de la restricción
Psr	PLA106_27901	Proteína de segregación cromosómica SMC
Psr	PSPPH_4558	Proteína con dominio MutT
Psr	Rmet_6256	Proteína de circularización del DNA
Psr	<i>tniB</i>	Transposasa
Psr	<i>umuC</i>	DNA polimerasa V
Psr	-	Fago integrasa
Regulación génica: Transducción de la señal		
Psf	<i>cph2</i>	Fitocromo
Psf	MDS_1714	Proteína quimiorreceptora MCP
Psf	-	Diguanilato ciclasa
Psm	<i>morA</i>	Diguanilato ciclasa - fosfodiesterasa
Psr	<i>csrA</i>	Regulador de almacenamiento de carbono
Psr	<i>cheY</i>	Transducción de señales al motor flagelar
Psr	<i>gmr</i>	Diguanilato ciclasa
Regulación génica: Regulador transcripcional		
Psf	<i>cysL</i>	Regulador transcripcional de tipo HTH
Psf	<i>lysR</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR
Psf	<i>nicS</i>	Represor transcripcional de tipo HTH
Psf	<i>prtR-2</i>	Regulador transcripcional
Psf	<i>luxR</i>	Regulador transcripcional
Psm	<i>araC</i>	Regulador transcripcional de la familia AraC
Psm	<i>gntR</i>	Regulador transcripcional de tipo HTH
Psm	<i>lacI</i>	Regulador transcripcional de la familia LacI
Psm	<i>trfB</i>	Represor transcripcional
Psn-Psm	<i>dksA</i>	Factor de transcripción de unión a RNA-pol
Psr	ALO83_200107	Nucleotidil transferasa
Psr	K788_0009225	Regulador transcripcional de la familia Xre

Patovar	Gen	Descripción ^a
Psr	<i>murR</i>	Regulador transcripcional de tipo HTH
Psr	PSTA9_01826	Regulador transcripcional de tipo HTH
Metabolismo		
Psf	<i>glf</i>	UDP-galactopiranososa mutasa
Psf	<i>lly</i>	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa
Psf	<i>nicB</i>	6-hidroxi-3-succinoilpiridina 3-monooxigenasa HspA
Psf	<i>nirB</i>	Nitrito reductasa
Psf	<i>parA</i>	Ácido covirínico sintasa
Psm	<i>arnB</i>	UDP-4-amino-4-deoxi-L-arabinosa-oxoglutarato aminotransferasa
Psm	<i>bauA</i>	Piruvato aminotransferasa
Psm	<i>fdhA</i>	Treonina dehidrogenasa Zn-dependiente
Psm	<i>gph</i>	Fosfoglicolato fosfatasa
Psm	HEAR0070	Flavoproteína oxidoreductasa
Psm	<i>purM</i>	Fosforibosilformilglicinamida ligase
Psm	<i>mltC</i>	Transglicosilasa C
Psn-Psm	ALO63_04253	Nucleósido hidrolasa
Psn-Psm	<i>amnD</i>	2-aminomuconato deaminasa
Psn-Psm	<i>bbsF</i>	Succinil-CoA:(R)-benzilsuccinato CoA-transferasa
Psn-Psm	<i>entA</i>	3-oxoacil reductasa FabG
Psn-Psm	<i>gabD</i>	Succinato-semialdehído dehidrogenasa
Psr	AC504_3245	3-oxoacil sintasa III
Psr	ALO61_200120	Acetiltransferasa
Psr	AN403_4723	Dioxigenasa
Psr	<i>hutI</i>	Amidohidrolasa
Psr	<i>kamA</i>	Lisina 2,3-aminomutasa
Psr	<i>lgrC</i>	Péptido sintasa
Psr	<i>mshD</i>	Micotiol acetiltransferasa
Psr	<i>nasA</i>	Nitrato reductasa
Psr	<i>wbaZ</i>	Glicosil transferasa
Psr	<i>yhdN</i>	Aldo-ceto reductasa
Psr	-	Carbamoil-fosfato sintasa
Sistemas de secreción		
Psf	<i>traX</i>	Acetilación de pilina F
Psm	<i>mpr</i>	Metaloproteínasa de zinc
Psm	<i>rhsB</i>	Proteína del T4SS
Psm	<i>taxB</i>	Proteína del T4SS
Psm	<i>trbL</i>	Proteína del T4SS
Psm	<i>virB11</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB4</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB5</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB6</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB8</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virB9</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virD2</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>virD4</i>	Proteína del T4SS tipo A
Psm	<i>vgrG1</i>	Proteína del T6SS
Psr	IL1374	Posible efector del T3SS
Psr	-	Posible efector del T3SS
Psr	<i>shcF-1</i>	Chaperona del T3SS
Psr	<i>avrRps4</i>	Efector del T3SS
Psr	<i>hopZ5</i>	Efector del T3SS
Psr	<i>hopF1</i>	Efector del T3SS
Psr	JCM19235_169	Proteína del T6SS
Psn-Psm	<i>shcF-2</i>	Chaperona del T3SS

Patovar	Gen	Descripción ^a	
Toxinas - Antitoxinas			
Psm	<i>hth</i>	Proteína con módulo antitoxina	
Psm	<i>relE</i>	Toxina bacteriana	
Psr	ALO52_07095	Sistema toxina-antitoxina	
Psr	ALO40_200213	Sistema toxina-antitoxina	
Transporte			
Psf	ALO44_200151	Transportador LrgA, Mureina hidrolasa	
Psf	<i>exuT</i>	Transportador MFS	
Psf	<i>mglA2</i>	Transportador ABC – galactosa/metil galactosida	
Psf	<i>nasA</i>	Transportador MFS	
Psf	<i>nhaP</i>	Antiporter monovalente catión/protón	
Psf	Pgy4_28675	Transportador aminoacídico LysE	
Psf	<i>proW</i>	Transportador ABC	
Psf	<i>yddO</i>	Transportador ABC	
Psf	<i>yiiY</i>	Porina específica de oligogalacturonato	
Psm	<i>proV</i>	Transportador ABC	
Psm	<i>tonB</i>	Proteína con dominio TonB	
Psr	DM41_6341	Transportador MFS	
Psr	<i>emrY</i>	Transportador MFS	
Psr	<i>imeA</i>	Transportador MFS	
Psr	<i>mglB</i>	Transportador ABC	
Psr	<i>setC</i>	Transportador MFS	
Psr	<i>tauA</i>	Sulfonate/nitrate/taurine transport system substrate-binding protein	
Psr	<i>triC</i>	Bomba de flujo catión/multidroga (Transportador RND)	
Psr	<i>yijE</i>	Transportador de membrana interna yijE	
Psr	<i>ytbD</i>	Transportador MFS	
Otros			
Psm	<i>htrC</i>	Proteína C de estrés térmico	
Psm	<i>luxA</i>	Luciferasa	
Psn-Psm	<i>inaZ</i>	Proteína de nucleación	
Psr	<i>pupB</i>	Receptor específico de siferóforos	
Proteínas hipotéticas			
Psf	5	Psr	19
Psm	18	Psv	3
Psn	0	Psn-Psm	3

ANEXO 2 - Genes ausentes exclusivos de patovar

Patovar	Gen	Descripción ^a
Replicación, recombinación, mutación y reparación del DNA		
Psf	<i>umuD</i>	DNA polimerasa V
Psf	LT42_00900	Profago, dominio nucleasa tipo ParB
Psf	AL065_07845	Helicasa
Psn-Psm	<i>parD</i>	Determinante de estabilidad del DNA
Psr	ALO37_100605	Transposasa
Psr	AC504_2402	Proteína de unión a DNA
Psr	<i>repA</i>	Proteína de replicación plasmídica RepA
Psr	<i>tnpS</i>	Proteína S de cointegración
Psv	ALO74_101392	Transposasa
Regulación génica: Transducción de la señal		
Psf	<i>cheY</i>	Transducción de señales al motor flagelar
Psf	<i>gmr_8</i>	Proteína fosfodiesterasa
Psf	<i>cph2</i>	Proteína con dominio HK/GAF
Psm	ebA163	Proteína fosfodiesterasa con dominio PAS
Psr	ALO93_100394	Proteína con dominio PAS
Regulación génica: Regulador transcripcional		
Psf	<i>prtR-1</i>	Regulador transcripcional
Psm	<i>rsuA</i>	Pseudouridina sintasa
Psm	<i>cscR</i>	Regulador transcripcional
Psn-Psm	<i>gstR</i>	Regulador transcripcional
Psr	<i>csor</i>	Regulador transcripcional
Metabolismo		
Psf	PSPPH_1510	Polisacárido liasa
Psf	ALO61_200159	O-acetilhomoserina aminocarboxipropiltransferasa
Psf	PSPSV_C0023	Metiltransferasa
Psf	<i>glnA</i>	Glutamina sintasa GlnA
Psf	<i>pelP</i>	Pectato liase
Psf	<i>puuD</i>	Gamma-glutamyl-gamma-aminobutirato hidrolasa
Psf	<i>metA</i>	Homoserina O-succiniltransferasa
Psf	<i>phnW</i>	2-aminoetilfosfonato--piruvato transaminasa
Psf	AL058_24755	Propionil-CoA carboxilasa
Psm	<i>phaG</i>	Polihidroxialcanoato sintasa
Psn-Psm	<i>guaB1</i>	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa
Psr	<i>hutI</i>	Amidohidrolasa relacionada con amidazolonepropionasa
Psr	<i>hcaD</i>	Piridina nucleótido-disulfito oxidoreductasa
Psr	<i>csgA</i>	Glucosa/ribitol dehidrogenasa
Psr	Psyr_1434	Monooxigenasa relacionada con la biosíntesis de antibióticos
Psr	<i>mshD</i>	Micotiol acetiltransferasa
Sistemas de secreción		
Psn-Psm	orf215	Ruta de translocación de la arginina gemela
Psr	ORF2	Efactor putativo del T3SS
Psf	<i>hxcP</i>	Proteína del T2SS
Psf	<i>hxcV</i>	Proteína del T2SS
Psf	<i>hxcU</i>	Proteína del T2SS
Psr	<i>cagZ</i>	Proteína del T4SS
Psf	<i>tssM2</i>	Proteína del T6SS

Patovar	Gen	Descripción ^a
Toxinas - Antitoxinas		
Psf	<i>rtxA</i>	O-acetilhomoserina aminocarboxipropiltransferasa
Psf	<i>rtxC</i>	Dihidrorhizobitoxina desaturasa
Psf	ALO43_200111	Bacteriocina
Psn-Psm	<i>hsvC</i>	Biosíntesis de fevamina A
Psn-Psm	<i>dinJ</i>	Proteína con módulo antitoxina
Psn-Psm	<i>fusC</i>	Resistencia a ácido fusárico
Transporte		
Psf	<i>rhtB</i>	Proteína de salida de homoserina/homoserina lactona
Psf	<i>proW</i>	Transportador ABC
Psm	<i>rcnA</i>	Sistema de expulsión de níquel/cobalto
Psr	<i>potC</i>	Transportador ABC
Psr	<i>mgIB</i>	Transportador ABC de azúcares
Psr	<i>yeaN</i>	Transportador de cianato
Otros		
Psf	<i>algY</i>	Proteína de unión a calcio
Psf	<i>tfpO</i>	Glicosiltransferasa putativa del pili (Type IV pili)
Psf	ALO39_100267	Lipoproteína
Psn-Psm	<i>inaZ</i>	Proteína de nucleación
Proteínas hipotéticas		
Psf	7	Psr 4
Psm	1	Psv 0
Psn	0	Psn-Psm 6

| CAPÍTULO 2 |

Identificación de nuevas rutas de biosíntesis de ácido indol-3-acético en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias fitopatógenas han desarrollado una amplia variedad de estrategias para garantizar una interacción planta-patógeno satisfactoria. Entre estos mecanismos encontramos la translocación de proteínas efectoras directamente a la célula vegetal a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) o la producción de fitohormonas. Estas estrategias son importantes para suprimir las defensas de la planta o para modular la fisiología de ésta, promoviendo la colonización y el desarrollo de la enfermedad (Jones and Dangl, 2006; Xin and He, 2013). Muchas bacterias fitopatógenas asociadas a plantas tienen la capacidad de sintetizar ácido indol-3-acético (IAA), estando su producción implicada en la virulencia del patógeno, ya que altera el equilibrio de auxinas de la planta, interfiriendo en una amplia gama de procesos de crecimiento, desarrollo y de respuesta a estímulos ambientales (Patten et al., 2013; Spaepen and Vanderleyden, 2011; Zhao, 2010). La producción de IAA por parte de bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens* (Kobayashi et al., 1995), *Pantoea agglomerans* (Manulis et al., 1998) o *Pseudomonas savastanoi* (Aragón et al., 2014), promueve la proliferación celular durante el desarrollo de los tumores inducidos en planta. Sin embargo, el IAA también es sintetizado por muchas bacterias no patógenas asociadas a plantas presentes en la rizosfera (Patten et al., 1996). En las bacterias promotoras del crecimiento *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas putida* se ha demostrado que la producción de IAA participa en el desarrollo del sistema radicular, estimulando su crecimiento (Dobbelaere et al., 1999; Patten and Glick, 2002).

En bacterias, se han caracterizado cinco rutas de biosíntesis de IAA utilizando el aminoácido triptófano (Trp) como precursor (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Spaepen et al., 2007). Entre estas rutas encontramos la ruta de la indol-3-acetamida (IAM), indol-3-piruvato (IPyA), la triptamina (TAM), el indol-3-acetonitrilo (IAN) y la ruta de la cadena lateral de oxidación del triptófano (TSO) (Introducción general, Figura 4) (Howden et al., 2009; Patten et al., 2013; Spaepen et al., 2007). Recientemente se ha identificado en *P. syringae* pv.

tomato DC3000 una ruta de biosíntesis de IAA no caracterizada hasta la fecha, en la que participa una indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (McClerklin et al., 2018).

P. savastanoi produce IAA a través de la ruta de la indol-3-acetamida, la mejor caracterizada en bacterias fitopatógenas. En esta ruta intervienen los genes *iaaM* e *iaaH*, los cuales no están presentes en cepas aisladas de fresno (Psf), ni se encuentran ampliamente distribuidos en el complejo *Pseudomonas syringae*. En *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335, los genes *iaaM* e *iaaH* se encuentran por duplicado en el cromosoma bacteriano y organizados en forma de operón (operones *iaaMH1* e *iaaMH2*) (Gaffney et al., 1990; Palm et al., 1989; Perez-Martinez et al., 2008; Rodríguez-Palenzuela et al., 2010). La construcción de un mutante de Psv NCPPB 3335 en el operón *iaaMH1* provoca una disminución de los niveles de IAA sintetizados y de su sintomatología en plantas de olivo. Por el contrario, un mutante en el operón *iaaMH2* produce una cantidad de IAA similar a la cepa silvestre y no muestra su virulencia atenuada (Figura 1A). Esto es debido a la presencia de un codón de parada prematuro en el gen *iaaM* de dicho operón, sugiriendo que podría tratarse de un pseudogen (Ramos et al., 2012). Además, la construcción de un mutante en Psv NCPPB 3335 en ambos operones ($\Delta iaaMH1-2$) reduce drásticamente los niveles de IAA producidos, aunque en el sobrenadante de cultivos de esta cepa aún se detecta una cantidad basal de IAA (Figura 1B) (Aragón et al., 2014). La presencia de una cantidad basal de IAA en los mutantes de Psv $\Delta iaaMH1-2$, similar a la presente en cultivos de cepas de Psf y de *P. syringae* carentes de estos genes, sugiere la presencia de una ruta de biosíntesis de IAA alternativa en estas cepas.

Para abordar la identificación de estas vías alternativas de producción de IAA, en este capítulo se ha analizado la presencia de metabolitos con carácter indólico producidos en Psv NCPPB 3335, prestando especial atención a los producidos en la cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$ en presencia de Trp.

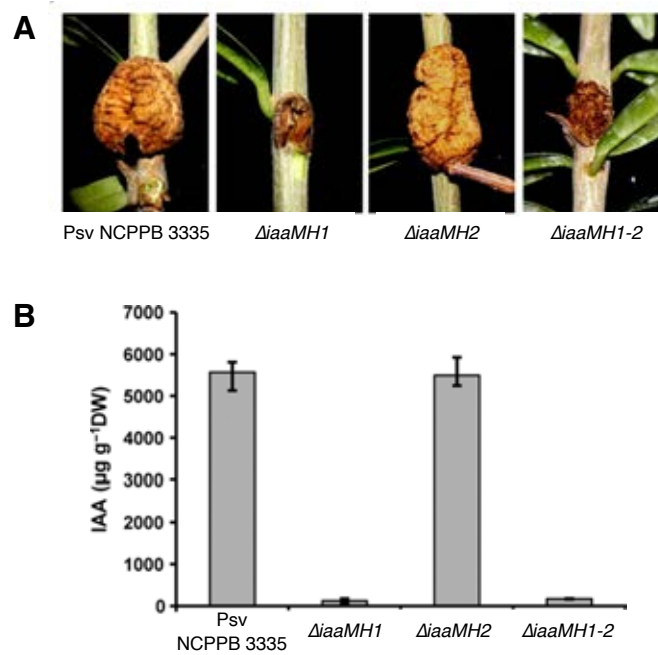


Figura 1. (A) Ensayo de virulencia de los mutantes *iaaMH* de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 en plantas de olivo lignificadas. Los tumores se analizaron 90 días después de la inoculación. **(B)** Cuantificación de los niveles de IAA mediante HPLC. Los datos se representan en μg de IAA por peso seco (*dry weight*, DW) de células bacterianas. Adaptado de Aragón et al., (2014).

El análisis metabolómico identificó un conjunto de posibles compuestos intermediarios implicados en la producción de IAA en estas cepas. Además, mediante un abordaje genómico se determinó la presencia de genes implicados en rutas de producción de IAA a partir del Trp ya descritas en otras bacterias. Por último, y mediante análisis transcriptómico, se identificaron potenciales genes que aumentaban su expresión en presencia de Trp, pudiendo jugar un papel relevante en la biosíntesis de IAA en Psv.

MATERIAL Y MÉTODOS

Abreviaturas

IAA: Indol-3-acético

IAAld: Indol-3-acetaldehído

IAM: Indol-3-acetamida

IPyA: Indol-3-piruvato

IAN: Indol-3-acetonitrilo

TAM: Triptamina

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas se cultivaron a 28 °C (cepas de *P. savastanoi*) o 37 °C (cepas de *Escherichia coli*) en medio de cultivo lisogénico (LB) (Bertani, 1951) o medio de cultivo súper óptimo (SOB) (Hanahan, 1983). Además, las cepas de *P. savastanoi* se cultivaron en medio mínimo manitol-glutamato (MG) suplementado con citrato férrico (10 g/L de manitol, 2 g/L de ácido L-glutámico, 0.5 g/L de KH_2PO_4 , 0.2 g/L de NaCl, 0.2 g/L de MgSO_4 , pH 7) (Bronstein et al., 2008). Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se indican en la Tabla 1. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con las concentraciones de antibióticos adecuadas (Tabla 2).

Construcción de cepas bacterianas y plásmidos

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se indican en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Para la generación de las cepas mutantes de Psv NCPPB 3335 se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1 kb de las regiones flanqueantes del gen u operón a eliminar, las cuales se fusionaron mediante tres reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) independientes, utilizando DNA genómico de Psv NCPPB 3335 y la polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, Hitchin, UK). Los productos resultantes se clonaron en pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) utilizando las enzimas de restricción incluidas en los oligonucleótidos (pAP1, pAP2, pAP4) o mediante clonación T/A (pAP3, pAP5), como ha sido descrito en Matas et al., (2014). La ligación de los fragmentos de DNA se realizó utilizando la enzima T4 DNA ligase (Takara Biotech Cor.; Kaohsiung, Taiwán), manteniendo una proporción 1:3 de vector e inserto. Una vez comprobada la ausencia de mutaciones en la secuencia, se extrajo el casete de resistencia a Km de los plásmidos pGEM-T-KmFRT-BamHI

y pGEM-T-KmFRT-HindIII y se clonó en los vectores construidos anteriormente utilizando las enzimas de restricción BamHI (pAP1-Km, pAP2-Km, pAP4-Km, pAP5-Km) o HindIII (pAP3-Km).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>		
NCPPB 3335	Cepa silvestre	(Pérez-Martínez et al., 2007)
$\Delta aldA$	Mutante por delección de <i>aldA</i> de la cepa NCPPB 3335 (PSA3335_RS26890) (Km ^R)	Este trabajo
$\Delta aldB$	Mutante por delección de <i>aldB</i> de la cepa NCPPB 3335 (PSA3335_RS17745) (Km ^R)	Este trabajo
$\Delta aldD$	Mutante por delección de <i>aldD</i> de la cepa NCPPB 3335 (PSA3335_RS12170) (Km ^R)	Este trabajo
$\Delta iaaMH1-2$	Doble mutante por delección de los dos operones $\Delta iaaMH1-2$	(Aragón et al., 2014)
$\Delta iaaMH1-2 \Delta aldA$	Mutante por delección de <i>aldA</i> de la cepa $\Delta iaaMH1-2$ (PSA3335_RS26890) (Km ^R)	Este trabajo
$\Delta iaaMH1-2 \Delta aldB$	Mutante por delección de <i>aldB</i> de la cepa $\Delta iaaMH1-2$ (PSA3335_RS17745) (Km ^R)	Este trabajo
$\Delta iaaMH1-2 \Delta aldC$	Mutante por delección de <i>aldC</i> de la cepa $\Delta iaaMH1-2$ (PSA3335_RS12925) (Km ^R)	Este trabajo
$\Delta iaaMH1-2 \Delta aldD$	Mutante por delección de <i>aldD</i> de la cepa $\Delta iaaMH1-2$ (PSA3335_RS12170) (Km ^R)	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , $\phi 80d lacZ \Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	(Hanahan, 1983)
GM2929	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 thi-1 tonA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 glnV44 hisG4 rpsL136, xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9 dcm-6 mcrB1 hsdR2 mcrA recF143</i> . (Str ^R Cm ^R)	(Palmer and Marinus, 1994)

Tabla 2. Concentración de antibióticos utilizada en los medios de cultivo.

Antibiótico	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>
Kanamicina (Km)	10 μ g/ml	50 μ g/ml
Ampicilina (Ap)	-	100 μ g/ml
Nitrofurantoína (Nf)	20 μ g/ml	-

Los plásmidos generados para la construcción de mutantes en Psv NCPPB 3335 fueron vectores suicidas no replicativos. Los plásmidos pAP1-Km, pAP2-Km, pAP3-Km, pAP4-Km y pAP5-Km se utilizaron para la construcción de los mutantes *aldA*, *aldB*, *aldC*, *aldD*, respectivamente. Los plásmidos se transfirieron a Psv NCPPB 3335 mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron en medio LB-Km (Pérez-Martínez et al., 2007). Posteriormente, se seleccionó el intercambio alélico (doble recombinación) y se descartó la integración del plásmido (recombinación única) mediante la réplica de colonias individuales en medio LB-Ap, donde se descartaron las colonias Ap^R. Finalmente, se realizaron análisis de Southern *blot* para verificar la integración correcta del casete de Km en el genoma de Psv NCPPB 3335 (Russell and Sambrook, 2001). La sonda utilizada en la hibridación se marcó mediante PCR con dNTPs marcados con digoxigenina, utilizando el kit *Dig-Labeling Mix* (Roche; Mannheim, Alemania) y los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4.

Análisis metabolómico

A partir de un cultivo en medio MG de las cepas Psv NCPPB 3335 y del mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ cultivadas durante toda la noche, se incubaron tres cultivos independientes de estas cepas en medio MG en presencia y en ausencia de L-Trp durante 20h hasta alcanzar una fase exponencial ($OD_{600nm} = 0.5$). Para analizar la acumulación de compuestos con carácter indólico presentes en el sobrenadante de estos cultivos, se realizó una extracción con acetato de etilo. El sobrenadante se mezcló con el mismo volumen de acetato de etilo y se incubó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la fracción de acetato de etilo extraída se evaporó a temperatura ambiente y el liofilizado obtenido se resuspendió en 1 ml de MeOH/H₂O (10:90 v/v). El perfil metabólico completo se obtuvo utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Acquity (UPLC, del inglés Ultra-Performance Liquid Chromatography; Waters, Milford, MA, EEUU), acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo (Q-TOF, del inglés *Quadrupole Time-Of-Flight*; Q-TOF MS Premier). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna analítica Kinetex C18, con un tamaño de partícula de 1.7

μm , 50 mm \times 2.1 mm (Phenomenex). Para la elución de las muestras se aplicó un gradiente de MeOH y agua con 0.01% de HCOOH y un flujo de 0.3 ml/min. El espectrómetro de masas se utilizó en modo “full scan” y la ionización por electroespray (ESI) se usó en modo ionización positiva y negativa. Para la correcta identificación de los compuestos, se utilizaron las colecciones, así como los parámetros de Q-TOF MS descritos en Gamir et al., (2014).

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características relevantes	Referencia
pGEM-T easy	Vector de clonación <i>oriF1</i> , <i>lacZ</i> (Ap ^R)	(Promega, Madison, WI, USA)
pGEM-T-KmFRT-BamHI	Vector que contiene el casete Km ^R de pKD4 flanqueado por sitios BamHI (Ap ^R Km ^R)	(Ortiz-Martin et al., 2010b)
pGEM-T-KmFRT-HindIII	Vector que contiene el casete Km ^R de pKD4 flanqueado por sitios HindIII (Ap ^R Km ^R)	(Aragón et al., 2014)
pAP1	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldA</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pAP1-Km	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldA</i> interrumpidas por el gen <i>nptII</i> (Ap ^R Km ^R)	Este trabajo
pAP2	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldB</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pAP2-Km	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldB</i> interrumpidas por el gen <i>nptII</i> (Ap ^R Km ^R)	Este trabajo
pAP3	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldC</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pAP3-Km	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldC</i> interrumpidas por el gen <i>nptII</i> (Ap ^R Km ^R)	Este trabajo
pAP4	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldD</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pAP4-Km	Vector derivado de pGEM-T que contiene 1kb de las regiones flanqueantes del gen <i>aldD</i> interrumpidas por el gen <i>nptII</i> (Ap ^R Km ^R)	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' – 3') ^a	Enzima de restricción
Construcción de cepas mutantes		
AldA_TA-F	TAAATGAATTCGCAAACAACAAAACCCGTCG	EcoRI
AldA_TA-R	GGATCCGACTCACTATAGGGCAGGGTGGTCATTTGCATGT	BamHI
AldA_TD-F	CCCTATAGTGAGTCGGATCCTGCCTTCGACAAATACACCG	BamHI
AldA_TD-R	TAAATAAAGCTTCTTTACCCAGCACGAAGAC	HindIII
AldB_TA-F	TAAATGAATTCAGAAGACTGGCTGCCGAAAAG	EcoRI
AldB_TA-R	GGATCCGACTCACTATAGGGCTTGATCGAGTTGTGGGCAG	BamHI
AldB_TD-F	CCCTATAGTGAGTCGGATCCGAAGTCATGGCGTCATTCCC	BamHI
AldB_TD-R	TAAATCTGCAGCAGGGTGAACAGCTGAACAA	PstI
AldC_TA-F	CCCTCTCGGTACACCTCAA	-
AldC_TA-R	AAGCTTACTCACTATAGGGGCTGTTCAAGGACTGTGAGG	HindIII
AldC_TD-F	CCCTATAGTGAGTCAAGCTTCCGGACAAGTGCATCTGAAC	HindIII
AldC_TD-R	CAATGTCATGCCTTACACGC	-
AldD_TA-F	TAAATAAAGCTTGATTTTGTGGTTCAGCGCG	HindIII
AldD_TA-R	GGATCCGACTCACTATAGGGGCAACACAGAGCCTCTACAG	BamHI
AldD_TD-F	CCCTATAGTGAGTCGGATCCATGGACGCTCTGCCTATTCA	BamHI
AldD_TD-R	TAAATGAATTCAGCTCACTCCTACGGCATAG	EcoRI
Southern blot		
SondaAldA-F	GGTGGCAAAGCCCGAATAT	-
SondaAldA-R	TCTGGAGATATTGGCGGTCC	-
SondaAldB-F	AGCCTTACCCGCTTTCAGAT	-
SondaAldB-R	TGTTCCGATGGCTTTAGGAC	-
SondaAldC-F	ATCACCGAACATTCTGCTGC	-
SondaAldC-R	CAAGATCCTGCCCTGTACA	-
SondaAldD-F	AGAAGTTCACCAAAGCGCTG	-
SondaAldD-R	GTTTCGACCCAGACGCTTTT	-
RT-qPCR		
iaaM_F293	TACCAAAGTGACCAGCGACT	-
iaaM_R501	AACAAACGCGGTCCCTTAAC	-
trpD_F465	ATGTTGCGCCAGTCTCATCA	-
trpD_R595	TAACGCCTGATTGAACACGC	-
gyrA-F	GACGAGCTGAAGCAGTCCTACC	-
gyrA-R	TTCCAGTCGTTACCCAGCTCG	-

^aEl subrayado indica la secuencia reconocida por la enzima de restricción.

Detección de compuestos indólicos

La cantidad de IAA producida por las cepas bacterianas se cuantificó siguiendo el método colorimétrico de detección de compuestos indólicos Salkowski (Ehmann, 1977) y mediante cromatografía. Para la detección de los compuestos con carácter indólico se utilizó un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Acquity (UPLC, del inglés Ultra-Performance Liquid Chromatography; Waters, Mildford, MA, EEUU), acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TQD, del inglés Triple Quadrupole Detector; Waters, Manchester, Reino Unido). Las muestras se diluyeron siguiendo la misma proporción en 1 ml MeOH/H₂O (10:90 v/v) tras añadir los estándares internos a una concentración final de 100 ng/ml. La columna usada en la separación cromatográfica fue la misma que la indicada anteriormente y se siguieron los parámetros descritos en Gamir et al., (2014).

Análisis de datos metabolómicos

Los datos sin procesar se transformaron en archivos .cdf utilizando el paquete Data-Bridge proporcionado por *Masslynx* 4.1. Las señales derivadas de ESI (+) y ESI (-) se procesaron por separado. La corrección, agrupación y señalización de los picos se procesaron con el software estadístico R, utilizando el paquete XCMS para la cuantificación relativa (Smith et al., 2006). La agrupación de los compuestos y la construcción de los mapas de calor se realizaron con *MetaboAnalyst* 3.0 (Xia et al., 2015), y para la identificación de los compuestos se utilizó el paquete de software Marvis (Kaeffer et al., 2015). Los compuestos detectados por Marvis se verificaron mediante la comparación de los picos cromatográficos, así como de los espectros de fragmentación obtenidos, con una colección de estándares previamente preparada.

Análisis genómico de las rutas de biosíntesis de IAA

La presencia de los genes implicados en las diferentes rutas de biosíntesis de IAA a partir de Trp en Psv NCPPB 3335 se analizó mediante blastn, utilizando el software Geneious v7.1.13 (<http://www.geneious.com>) junto a la secuencia de nucleótidos correspondientes a dichos genes.

RNAseq

A partir de un cultivo de *Psv ΔiaaMH1-2* en medio MG incubado durante toda la noche, se obtuvieron 2 cultivos independientes que se incubaron en medio MG en presencia y en ausencia de L-Trp durante 20h hasta alcanzar una fase exponencial ($OD_{600nm} = 0.5$). El RNA total de cada muestra se extrajo utilizando el kit de purificación de RNA “RNeasy® Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se eliminó el DNA de las muestras con el kit TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA ribosómico se eliminó de las muestras de RNA total utilizando el kit Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion para bacterias, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Illumina; California, EEUU). Por último, las genotecas de cDNA se obtuvieron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina; California, EEUU). La secuenciación de las genotecas se realizó en los servicios de ultrasecuenciación (<http://www.scbi.uma.es/site/omics/ultraseq>) de la Universidad de Málaga (España), utilizando un equipo Illumina NextSeq550 (Illumina; California, EEUU) obteniendo lecturas pareadas de 75pb de longitud. La secuenciación produjo un total de 400 millones de lecturas, y utilizando el software SeqTrimNext (<http://www.scbi.uma.es/seqtrimnext>) se eliminaron las lecturas con homología a RNA ribosomales. Posteriormente, las lecturas se procesaron con SeqTrim para eliminar adaptadores, secuencias de baja calidad o ambiguas. Las secuencias inferiores a 25 pb también fueron eliminadas. Las lecturas resultantes se alinearon frente al genoma cerrado de *Psv* NCPPB 3335 (NZ_CP008742) y frente a la secuencia de sus tres plásmidos (pPsv48A, FR820585.2; pPsv48B, FR820586.1 y pPsv48C, FR820587.2) utilizando BWA (Burrows-Wheeler Aligner) (Li and Durbin, 2009). Las lecturas alineadas de forma exclusiva se utilizaron para calcular el número de lecturas de cada gen, mientras que las lecturas con alineamientos ambiguos fueron rechazadas. Los genes expresados diferencialmente entre dos muestras se analizaron utilizando DEgenes Hunter (Gayte et al., 2017).

RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se llevó a cabo utilizando 1 μ g de RNA por muestra y oligonucleótidos inespecíficos incluidos en el kit iScript de síntesis de cDNA (BioRad, Hercules, CA, EEUU). El diseño de los oligonucleótidos para RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), así como las pruebas de eficiencia y especificidad, se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Thornton and Basu, (2011) y Vargas et al., (2011). La abundancia relativa de transcritos se calculó utilizando el método de $\Delta\Delta$ *cycle-threshold* (Ct) (Livak and Schmittgen, 2001). Los datos transcripcionales se normalizaron a la expresión del gen *gyrA*. La expresión relativa se calculó como la diferencia entre los Ct del gen a analizar y los del gen *gyrA* (Δ Ct = Ct_{gen de interés} – Ct_{*gyrA*}). Un ciclo de RT-qPCR representa una diferencia de dos veces con respecto a la abundancia en la muestra, por lo que la tasa de variación se calculó como $2^{-\Delta\Delta$ Ct (Pfaffl, 2001). La RT-qPCR se realizó por triplicado. Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 4.

RESULTADOS

La producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2* es dependiente de Trp

Muchas cepas de *P. syringae* son capaces de producir IAA en cultivo, especialmente cuando son suplementadas con Trp. En Psv, cuyo precursor para la biosíntesis de IAA es el Trp, se ha demostrado un aumento de la producción de IAA en cultivo tras suplementar con Trp (Glickmann et al., 1998). Para determinar la procedencia del IAA producido en el doble mutante *ΔiaaMH1-2* de Psv NCPPB 3335 (Psv *ΔiaaMH1-2*), carente de la ruta principal de biosíntesis de IAA, se comprobó si los niveles de IAA producidos también aumentaban en presencia de Trp en el medio. Para ello, se comparó la producción de IAA en medio de cultivo MG con la obtenida tras suplementar con Trp (concentración final 2.5 mM). Inicialmente, se utilizó el reactivo de Salkowski para llevar a cabo una detección colorimétrica de los compuestos indólicos presentes en el sobrenadante de ambos cultivos, tras incubarlos en agitación a 28 °C durante 20h. En ausencia de Trp, no se detectaron compuestos de carácter indólicos en el sobrenadante, mientras que en presencia de Trp se obtuvieron 43,58 $\mu\text{gr}/\text{mg}$ de peso seco (PS) (Figura 2). Debido a las limitaciones de la detección colorimétrica con el reactivo de Salkowski, y con el fin de obtener una medida más precisa de los niveles de IAA, se llevó a cabo una cuantificación de los niveles de IAA en el sobrenadante de estos cultivos mediante UPLC-TQD. Cuando la cepa mutante se cultivó en ausencia de Trp se detectaron 0,024 μgr de IAA por mg de PS, mientras que tras suplementar con Trp se obtuvieron 7,97 μgr de IAA por mg de PS (Figura 2). Por lo tanto, la cepa Psv *ΔiaaMH1-2* muestra un comportamiento similar a la cepa silvestre de Psv NCPPB 3335 y a otras cepas del complejo *P. syringae*, produciendo una cantidad significativamente mayor de IAA (≈ 300 veces más) en medio suplementado con Trp.

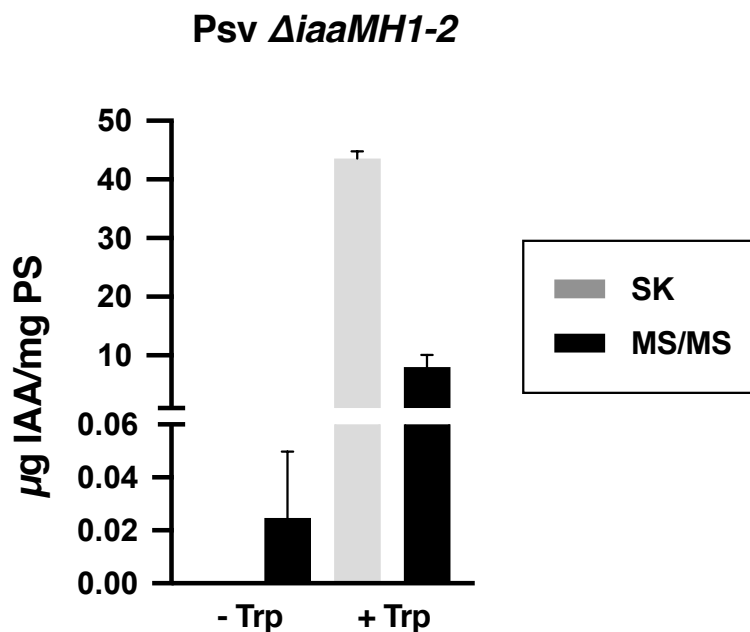


Figura 2. Cuantificación de los niveles de IAA producidos por Psv $\Delta iaaMH1-2$ en ausencia o presencia de triptófano (Trp). La cuantificación se llevó a cabo mediante el reactivo de Salkowski (gris, SK) y cromatografía líquida de ultra-rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo (UPLC-TQD) (negro, MS/MS). Los datos se representan como μg de IAA por mg del peso seco (PS) bacteriano. Cada barra es la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar.

Análisis global de la producción de IAA en Psv NCPPB 3335.

El aumento de los niveles de IAA detectados en el sobrenadante de un cultivo de Psv $\Delta iaaMH1-2$ tras suplementar el medio con Trp, sugiere la existencia de una ruta de producción de IAA con el Trp como precursor e independiente de la ruta de la indol-3-acetamida. Con el fin de identificar metabolitos acumulados de manera diferencial que podrían participar como intermediarios o estar relacionados con esta ruta, se llevó a cabo un análisis metabolómico utilizando UPLC acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF. Para obtener una visión global de estos metabolitos, se compararon los perfiles metabólicos de los sobrenadantes de cultivos de la cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$ tras 20h de incubación en medio MG y en medio MG suplementado con Trp. El análisis de componentes principales (PCA) muestra el comportamiento global de las diferentes muestras en modo de ionización (ESI) positiva y negativa (Figura 3A). En ambos modos, el comportamiento observado fue similar, ya que los dos componentes

principales explicaron el 77.2% (PC1 = 71.5% y PC2 = 5.7%) y el 79.9% (PC1 = 74.9% y PC2 = 5%) de la variabilidad total en modo ESI positivo y negativo, respectivamente. La presencia de Trp en el medio modificó la acumulación de metabolitos, provocando la separación de ambas condiciones en el análisis por PCA. Utilizando el *software Marvis cluster* se llevó a cabo la agrupación algorítmica de los compuestos acumulados en ambas condiciones, identificándose más de 800 compuestos acumulados en mayor cantidad en presencia de Trp, mientras que en medio sin suplementar únicamente se identificaron 200 compuestos (Figura 3B). Tras la agrupación de los compuestos, se seleccionaron los grupos con una mayor acumulación en presencia de Trp, y utilizando el programa *Marvis pathway* se identificaron las rutas metabólicas en las que podrían participar estos compuestos (Figura 3C). Entre las rutas identificadas se encuentran las rutas de degradación de compuestos aromáticos, compuestos relacionados con el metabolismo del Trp, arginina y prolina o de ácidos oxocarboxílicos. Además, se identificaron compuestos relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y con transportadores ABC. No se obtuvieron grandes diferencias en el número de compuestos identificados entre ambos modos de ionización. Para identificar posibles metabolitos intermediarios implicados en la producción de IAA, se analizaron los 21 compuestos identificados y relacionados con el metabolismo del Trp (Tabla 5). Mediante la comparación de los espectros de fragmentación de estos compuestos con colecciones de estándares previamente construidas, o con los espectros de fragmentación obtenidos de bases de datos (<https://massbank.eu/MassBank/>), se identificaron 6 compuestos con carácter indólico acumulados en mayor proporción en presencia de Trp (Figura 3D). Entre ellos encontramos, además de IAA, IAM e indol-3-acetaldehído (IAAId), dos compuestos intermediarios relacionados previamente con la producción de IAA. Además, también se identificó indol-3-lactato, indol-3-etanol e indol, todos ellos precursores o derivados de la molécula del IAA.

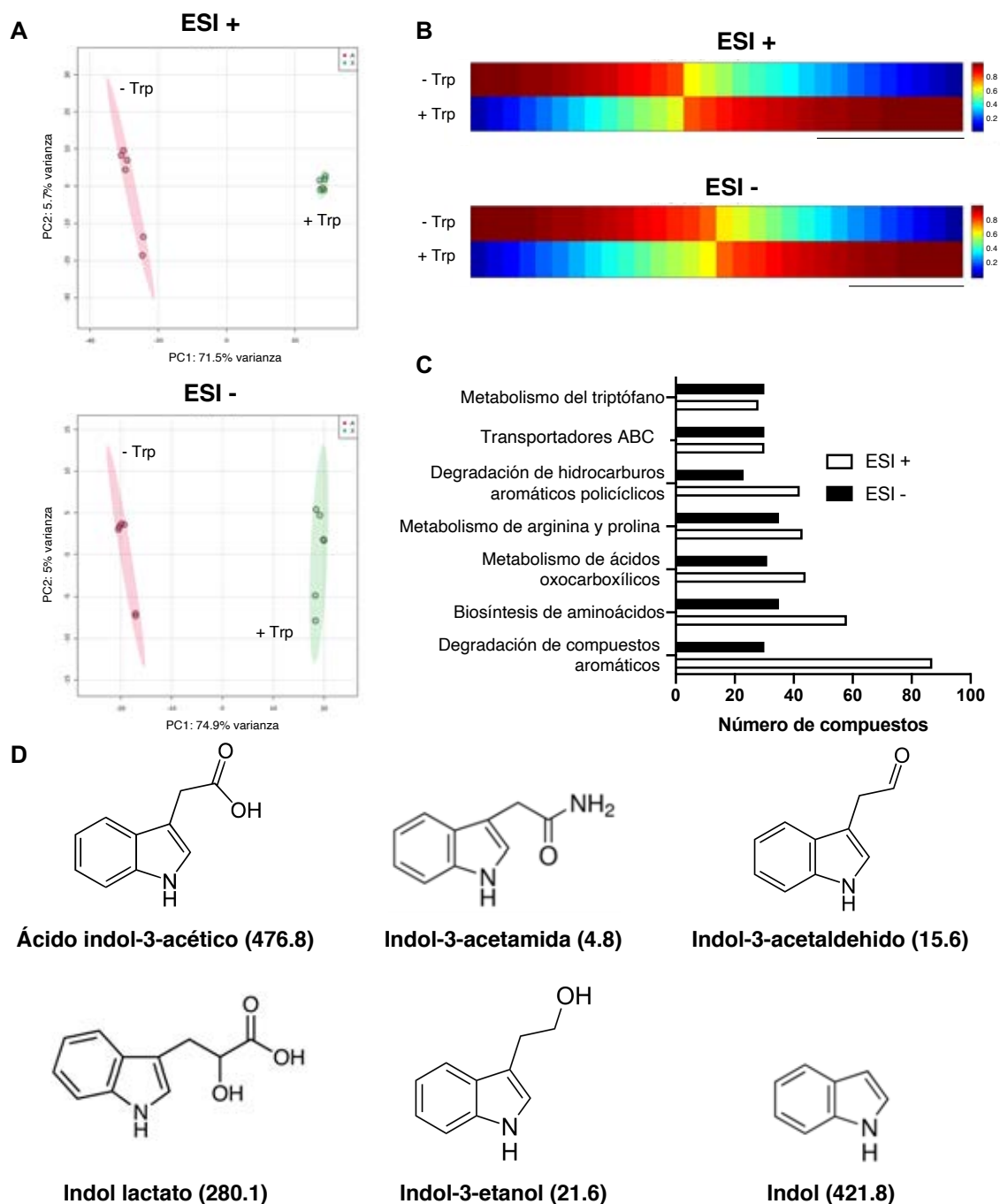


Figura 3. (A) Análisis de componentes principales (PCA) y (B) agrupación de los principales metabolitos identificados en sobrenadantes de cultivos de *Psv ΔiaaMH1-2* en presencia (+ Trp) o ausencia (- Trp) de triptófano, obtenidos en los modos de ionización (ESI) + y - mediante análisis no dirigido UPLC-QTOF. Los colores del mapa de calor representan valores de acumulación promedio en cada grupo de metabolitos. La línea negra inferior indica los grupos seleccionados para el análisis. (C) Rutas metabólicas identificadas con el *software* Marvis en las que participan los compuestos acumulados en mayor proporción en presencia de Trp. (D) Compuestos con carácter indólico acumulados en mayor proporción en presencia de Trp. Entre paréntesis se indica el número de veces de aumento.

Tabla 5. Compuestos identificados en el análisis metabolómico y relacionados con el metabolismo del Trp.

Compuesto ^a	ESI ^b	m/z	Ratio + Trp / - Trp
Indol-3-acético (IAA)	+	176.068	978.9
Indol-3-acético (IAA)	-	174.057	476.8
Indol	-	116.054	421.7
Indol Lactato	+	206.080	280.1
Ácido 4-Hidroxi-2-quinolina carboxílico	+	190.049	93.8
2-Aminomuconato	-	156.048	58.4
2-Aminomuconato	+	158.088	22.9
Indol-3-etanol	-	160.042	21.6
(Z)-5-Oxohex-2-enediolato	+	159.064	19.7
5-(2'-Carboxietil)-4;6-dihidroxipicolinato	-	226.053	18.2
Ácido 4-Hidroxi-2-quinolina carboxílico	-	188.038	17.4
3-Metildioxindol	-	162.058	17.3
Indol-3-acetaldehído (IAAld)	+	160.074	15.6
Indoxil	+	134.059	13.1
5-Hidroxiindol acetato	-	190.052	12.5
4-(2-Aminofenil)-2;4-dioxobutanoato	-	206.047	9.6
7;8-Dihidroxi-Kinurenina	-	220.063	6.8
L-Triptófano	+	205.085	6.7
5-Hidroxi-N-formil-L-kinurenina	-	251.057	6.0
Indol-3-acetamida (IAM)	+	175.135	4.8
5-(3'-Carboxi-3'-oxopropil)-4;6-dihidroxipicolinato	+	256.085	4.1

^aEn gris se indican los compuestos verificados mediante comparación con colecciones de estándares o bases de datos online.

^bESI: Modo de ionización.

La presencia de IAM e IAAld en los cultivos de Psv *ΔiaaMH1-2* en presencia de Trp, sugiere la participación de estos compuestos en rutas alternativas de producción de IAA en esta cepa. Además, la detección de IAM, pese a la ausencia de los genes *iaaM* e *iaaH* en estos cultivos, sugiere la existencia de vías alternativas de producción de este intermediario en Psv. Con el fin de determinar las concentraciones de estos compuestos, se cuantificó mediante UPLC-TQD su producción en cultivos de Psv NCPPB 3335 y Psv *ΔiaaMH1-2* en medio MG y en medio MG suplementado con Trp. Además, se incluyeron en el análisis los principales intermediarios de las rutas de producción de IAA descritos previamente (Tabla 6). En ausencia de Trp, se identificó la acumulación de IAA e IAN en ambas cepas. Además, únicamente se detectó IAM en Psv NCPPB 3335. La presencia de Trp en el medio provocó una mayor acumulación de IAA en ambas cepas de Psv, tal y como se ha descrito previamente. Sin embargo,

los niveles de IAN no se vieron modificados, sugiriendo que su biosíntesis podría ser independiente del Trp o no ser un intermediario de la ruta alternativa de biosíntesis de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*. Por último, únicamente se detectó IAM en Psv *ΔiaaMH1-2* tras suplementar el medio con Trp. En este ensayo, no se detectó acumulación de TAM o IPyA. Sin embargo, los experimentos de medida de IPyA no fueron concluyentes debido a la inestabilidad del IPyA en solución (Bentley et al., 1956). Para el IAAlD no se pudo obtener una medida cuantitativa mediante TQD, aunque se detectó su presencia mediante Q-TOF (datos no mostrados).

El análisis metabólico realizado ha permitido identificar la producción de los compuestos intermediarios IAM, IAN e IAAlD por la cepa mutante Psv *ΔiaaMH1-2*. Sin embargo, no se han descrito genes implicados en la producción de estos compuestos en Psv NCPPB 3335. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis genómico con el fin de identificar la presencia en Psv NCPPB 3335 de enzimas implicadas en rutas de biosíntesis de IAA a partir de Trp descritas previamente en otras bacterias (Tabla 7).

Tabla 6. Análisis mediante UPLC-TQD de los compuestos intermediarios implicados en la producción de IAA en Psv NCPPB 3335.

Compuesto	Transición	ESI ^a	RT (min)	Concentración (ng/mg PS) ^b			
				Psv NCPPB 3335		Psv <i>ΔiaaMH1-2</i>	
				- Trp	+ Trp	- Trp	+ Trp
IAM	173.2>129.9	-	2.17	21.9 ± 2.1	21347 ± 8887	0	31.8 ± 0.4
IPyA	202.1>202.1	-	ND	ND	ND	ND	ND
IAN	154.9>154.9	-	2.68	67 ± 4.9	116.5 ± 34.9	70.3 ± 5.1	68.4 ± 4.3
TAM	160.9>144.1	+	-	0	0	0	0
IAA	176>130	+	2.71	10468 ± 568.9	836190 ± 16533	18.8 ± 1.1	22490 ± 7560

^aESI: Modo de ionización.

^bPS: Peso seco; Trp: Triptófano; ND: Compuesto no detectado.

Tabla 7. Enzimas relacionadas con rutas de biosíntesis de IAA identificadas en Psv NCPPB 3335.

Ruta	Enzima ^a	Cobertura	Identidad ^b
IAM	Trp 2-Monooxigenasa (PSA3335_RS05390)	100%	+ (100%)
	Indol-3-acetamida hidrolasa (PSA3335_RS05385)	100%	+ (100%)
IPyA	Trp aminotransferasa (D9621_08530)	-	-
	Indol-3-piruvato descarboxilasa (DCC84_05270)	-	-
	Aldehído deshidrogenasa (PSPTO_0092) ^c	100%	+ (87%)
IAN	Acetaldoxima deshidratasa (P syr_0006)	-	-
	Nitrilasa (P syr_0007)	-	-
TAM	Trp descarboxilasa (PP_2552)	-	-
	Amida oxidasa (PSYR_RS02355)	100%	+ (96%)
	Aldehído deshidrogenasa (PSPTO_0092) ^c	100%	+ (87%)
TSO	Aldehído deshidrogenasa (PSPTO_0092) ^c	100%	+ (87%)

^aTrp: Triptófano. Entre paréntesis se indica el código de acceso del gen.

^b+, secuencia identificada; -, secuencia no identificada. Entre paréntesis se indica el porcentaje de identidad obtenido mediante blastn.

^cAldehído deshidrogenasa común a las rutas IPyA, TAM y TSO.

Mediante blastn se identificaron en Psv NCPPB 3335 los genes *iaaM* e *iaaH* implicados en la ruta IAM, tal y como se ha descrito anteriormente (Aragón et al., 2014). Además, se encontraron genes homólogos al gen PSYR_RS02355, que codifica una enzima con actividad amida oxidasa implicada en la ruta TAM en *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Por otro lado, también se encontraron genes homólogos al gen *aldA* (PSPTO_0092), que codifica una aldehído deshidrogenasa cuyo papel en la biosíntesis de IAA ha sido recientemente descrita en *P. syringae* pv. *tomato* (McClerkin et al., 2018). Además, esta enzima podría participar en múltiples rutas, ya que se ha descrito su participación en las rutas IPyA, TAM y TSO. Por el contrario, no se identificaron en Psv NCPPB 3335 genes homólogos a los implicados en las rutas IPyA o IAN en otras bacterias. Asimismo, tampoco se encontraron genes que completasen la ruta TAM, identificándose únicamente 2 de los 3 genes que forman esta ruta y sugiriendo la existencia de ésta de manera incompleta en Psv NCPPB 3335.

En resumen, los análisis genómicos y metabolómicos han permitido identificar la presencia de los compuestos intermediarios IAN, IAM e IAAlD en *Psv ΔiaaMH1-2*, así como la presencia de genes relacionados con la ruta de la TAM y de una aldehído deshidrogenasa implicada en múltiples rutas (Figura 4). Además, la detección de IAAlD junto a la presencia de genes homólogos cuya relación con la biosíntesis de IAA ha sido descrita previamente, sugiere que *Psv ΔiaaMH1-2* podría producir IAA mediante una o más rutas donde estarían implicadas proteínas con actividad aldehído deshidrogenasa.

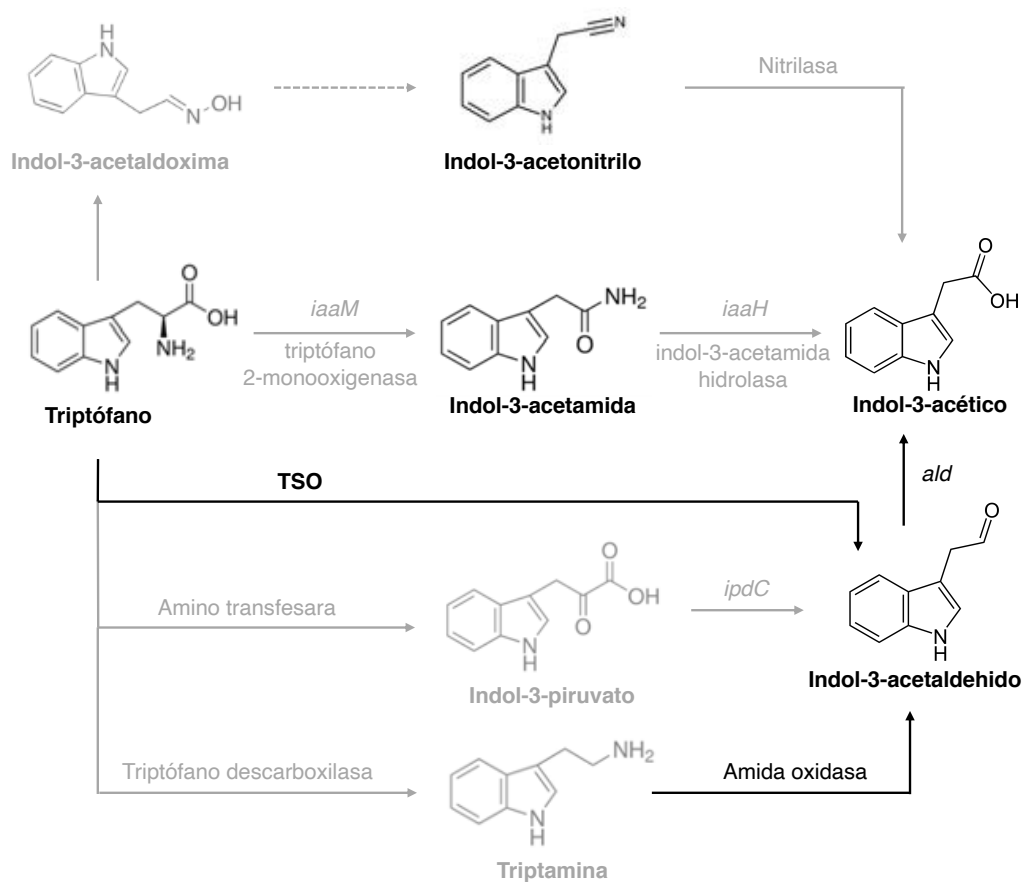


Figura 4. Resumen esquemático de las diferentes rutas de biosíntesis de IAA propuestas en *Psv ΔiaaMH1-2*. En negro se indican los genes presentes en el genoma o los compuestos identificados en sobrenadante de *Psv ΔiaaMH1-2*. En gris se indican genes y compuestos no identificados. Encima de las flechas se indica el gen implicado en cada paso de la ruta de biosíntesis o, en su ausencia, la actividad enzimática. *iaaM*: triptófano monooxigenasa; *iaaH*: indol-3-acetamida hidrolasa; *ald*: aldehído deshidrogenasa; *ipdC*: indol-3-piruvato descarboxilasa TSO: cadena lateral de oxidación del triptófano; AO: amida oxidasa. Adaptado de Spaepen et al., (2007).

Los genes *ald* participan en la producción de IAA en Psv $\Delta iaaMH1-2$

Recientemente, se ha descrito en Pto DC3000 la presencia de genes con actividad aldehído deshidrogenasa, implicados en la producción de IAA (McClerklin et al., 2018). Utilizando los genes *aldA* (PSPTO_0092), *aldB* (PSPTO_2673) y *aldC* (PSPTO_3644) descritos en Pto, se llevó a cabo la identificación de potenciales genes codificantes de aldehído deshidrogenasas en Psv NCPPB 3335 mediante *blastn*, identificándose los genes PSA3335_RS26890 (86.9%), PSA3335_RS17745 (88.6%) y PSA3335_RS12925 (85.5%), respectivamente. Además, utilizando el gen AY850388 de *A. brasilense*, cuya implicación en la producción de IAA ha sido demostrada previamente mediante la construcción de mutantes, se identificó el gen PSA3335_RS12170 (*aldD*) (Xie et al., 2005).

Con el fin de comprobar la implicación de estos genes en la producción de IAA, se construyeron mutantes por reemplazamiento génico de cada uno de los cuatro genes *ald* en la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 y en el mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$. La pérdida de los genes, así como la correcta integración del casete de Km en el genoma de estas cepas, fue verificada mediante Southern *blot* utilizando sondas específicas marcadas con digoxigenina. Las cepas mutantes se incubaron en medio MG suplementado con Trp (2.5 mM) durante 20h y se cuantificaron los niveles de IAA en el sobrenadante de estos cultivos mediante UPLC-TQD. En ambas cepas, los mutantes *ald* mostraron una reducción en la producción de IAA. En los cultivos de los mutantes *ald* de la cepa silvestre se redujo aproximadamente un 50% la acumulación de IAA, no encontrándose diferencias significativas entre ellos (Figura 5A). En el fondo genético de Psv $\Delta iaaMH1-2$, los mutantes *aldA* y *aldB*, mostraron una reducción de aproximadamente el 30%, mientras que en los mutantes *aldC* y *aldD* se observó una reducción del 68%. Las diferencias de acumulación entre los mutantes *aldA* y *aldB*, así como entre *aldC* y *aldD*, no fueron significativas (Figura 5B). Estos resultados sugieren un papel importante de los genes *ald* en la síntesis de IAA en Psv, tanto en la cepa silvestre con la ruta IAM activa, como en la cepa mutante

afectada en esta ruta. Además, en la producción de IAA están implicados múltiples genes con actividad aldehído deshidrogenasa.

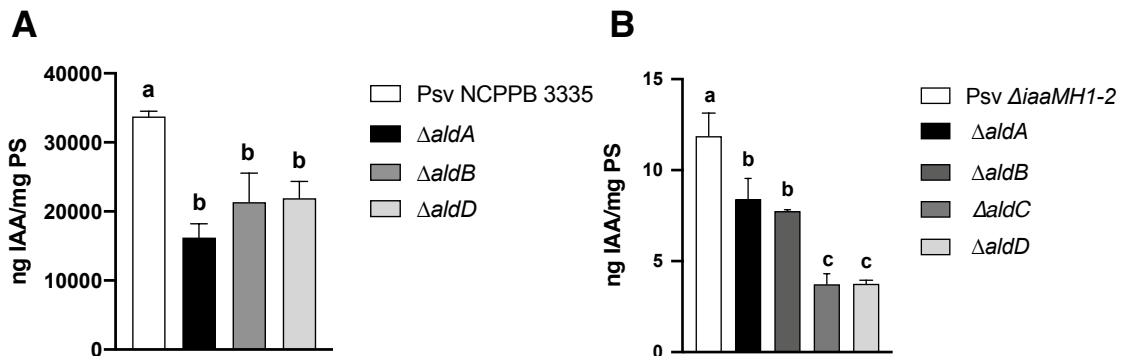


Figura 5. Cuantificación de los niveles de IAA producidos en los mutantes *ald* de Psv NCPPB 3335 (A) y Psv *ΔiaaMH1-2* (B). La acumulación de IAA se cuantificó en sobrenadantes de cultivos de la cepa silvestre, el mutante Psv *ΔiaaMH1-2* y de sus mutantes *aldA*, *aldB*, *aldC* y *aldD* tras 20 h de incubación en medio MG. Los datos se representan como ng de IAA por mg del peso seco bacteriano. Cada barra representa la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.01$).

Psv NCPPB 3335 codifica múltiples genes potencialmente implicados en la síntesis de IAA

Anteriormente, se ha demostrado mediante la construcción de cepas mutantes la implicación de los genes *aldA*, *aldB*, *aldC* y *aldD* en la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*. Sin embargo, pese a obtener una reducción de más del 60%, no se consiguió eliminar por completo la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*. Por lo tanto, la síntesis de IAA en esta cepa podría producirse exclusivamente mediante la acción combinada de estas cuatro enzimas, o bien, con la contribución de más genes *ald* no identificados, o mediante la acción de otros genes que participen en rutas diferentes, quizás incompletas, que complementarían la ruta principal (IAM) de Psv NCPPB 3335.

El análisis de secuencia de las proteínas codificadas por los genes *aldA*, *aldB*, *aldC* y *aldD* utilizando Pfam (Finn et al., 2016) reveló la presencia de un dominio Pfam con actividad aldehído deshidrogenasa (PF00171) completamente conservado en estas proteínas. Por lo tanto, se analizó el genoma de Psv

NCPPB 3335 con el fin de identificar la presencia de más proteínas con este dominio conservado (Tabla 8).

Tabla 8. Proteínas con dominio Pfam PF00171 (aldehído deshidrogenasa) identificados en el genoma de Psv NCPPB 3335.

ID	Producto	aa	Identidad (%)			
			AldA	AldB	AldC	AldD
WP_002551517	Aldehído deshidrogenasa (AldA)	497	100	41.7	38.1	36.9
WP_002553607	Carnitina dehidratasa (AldB)	493	41.9	100	38.5	45
WP_002554234	Aldehído deshidrogenasa (AldC)	486	37.9	38.5	100	35.9
WP_002554375	Aldehído deshidrogenasa (AldD)	505	40.8	44.1	36	100
WP_002555618	Aldehído deshidrogenasa	490	39	44	38.2	35.7
WP_002555554	Aldehído deshidrogenasa	506	39.4	40.4	37	37.5
WP_002555506	Metilmalonato-aldehído deshidrogenasa	497	34.1	30.5	33.9	27.7
WP_002554365	Aldehído deshidrogenasa	496	29.1	30.9	28.4	29.5
WP_002554087	Metilmalonato-aldehído deshidrogenasa	500	30.1	30.4	34.4	30
WP_002553972	Ketoglutarato semialdehído deshidrogenasa	529	26	26.6	36.7	24.1
WP_002553455	Salicilaldehído deshidrogenasa	482	33.3	34.7	34.2	34.9
WP_002553448	Benzaldehído deshidrogenasa	493	33.9	33.5	34.3	36.6
WP_002553613	Sucinato-semialdehído deshidrogenasa	476	32.3	32.9	36.1	34.3
WP_002553596	Sucinato deshidrogenasa	463	30	34.1	34.6	31.5
WP_002551958	Metilmalonato-aldehído deshidrogenasa	508	30	28.8	35.1	29.5
WP_002555339	Gamma-glutamil-fosfato reductasa	421	29.1	0	0	0

En total, se identificaron 16 proteínas con dominio Pfam PF00171, entre las cuales también se encontraban las 4 proteínas ALD analizadas en este trabajo. La mayoría de las proteínas identificadas estaban anotadas como aldehído deshidrogenasa y su tamaño fue similar (421 – 529 aa). Además, se analizó la homología de las diferentes proteínas identificadas con la secuencia de las proteínas AldA, AldB, AldC y AldD. Los valores de identidad obtenidos fueron inferiores al 45% en todos los casos. Sin embargo, las 4 proteínas ALD analizadas en este trabajo también mostraron un valor máximo de identidad entre ellas del 45%. Por lo tanto, las 12 proteínas, junto a las proteínas AldA, AldB, AldC y AldD, podrían estar potencialmente implicadas en la biosíntesis de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*.

Efecto global de la adición de Trp sobre la transcripción en Psv *ΔiaaMH1-2*

Para profundizar en la identificación de genes que podrían estar implicados en la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*, y teniendo en cuenta la mayor acumulación de IAA que se da en los cultivos de esta cepa en medio con Trp (Figura 1), se realizó un análisis transcriptómico comparativo mediante RNAseq

de la cepa Psv *ΔiaaMH1-2* en medio MG suplementado y sin suplementar con Trp. Psv *ΔiaaMH1-2* se incubó en estos medios durante 20h y la extracción del RNA se realizó como se describe en material y métodos.

Para comprobar si las condiciones utilizadas garantizan la inducción de la transcripción de genes implicados en el metabolismo del Trp, antes de proceder a la secuenciación del RNA se analizó mediante RT-qPCR la expresión de los genes *trpD* e *iaaM* en ambos medios, cuya variación de expresión en presencia de Trp ha sido descrita previamente. El gen *trpD*, el cual forma parte del operón de biosíntesis de Trp, se utilizó como control positivo de la inducción por Trp, ya que se ha demostrado su represión en presencia de éste en múltiples organismos como, como por ejemplo, *P. aeruginosa* (Merino et al., 2008). Como control negativo, se utilizó el gen *iaaM*, debido a su ausencia en la cepa Psv *ΔiaaMH1-2*. La expresión del gen *trpD* en Psv *ΔiaaMH1-2* en medio MG suplementado con Trp fue 4.6 veces menor que en el medio sin suplementar, y no se detectó expresión del gen *iaaM* en ninguna de las condiciones analizadas. Tras la verificación de las condiciones de cultivo utilizadas, se secuenciaron dos muestras independientes de RNA por cada condición como se describe en material y métodos. En la Tabla 9 se indica el número total de lecturas obtenidas en la secuenciación para cada muestra (entrada), así como el total de lecturas utilizadas en el análisis (salida), estas últimas obtenidas tras eliminar las lecturas correspondientes a los adaptadores, a las secuencias de baja calidad, y a las secuencias ambiguas o de tamaño inferior a 25 pb.

Tabla 9. Número de las lecturas obtenidas en la secuenciación RNAseq

Muestra	Entrada	Salida	Eliminadas	% Eliminadas
Psv <i>ΔiaaMH1-2</i> MG1	45,897,058	42,956,306	1,778,582	3.88
Psv <i>ΔiaaMH1-2</i> MG2	50,074,880	46,648,122	2,065,875	4.13
Psv <i>ΔiaaMH1-2</i> MGTrp 1	52,247,420	48,803,308	2,185,233	4.18
Psv <i>ΔiaaMH1-2</i> MGTrp 2	50,661,538	47,352,040	2,026,945	4.00

La varianza observada entre las diferentes muestras se analizó mediante un análisis de PCA, el cual permitió determinar la varianza entre las diferentes réplicas y condiciones (Figura 6A). Como era de esperar, la mayor varianza (PC1 = 93%) se obtuvo para la comparación de las dos condiciones analizadas (MG vs. MGTrp), mientras que la varianza entre las diferentes réplicas biológicas de la misma condición fue menor (PC2 = 5%). Además, la variabilidad entre las muestras también se analizó mediante la agrupación jerárquica de éstas y el cálculo de distancias siguiendo la correlación de Pearson (Figura 6B), permitiendo un control adicional de la calidad de las diferentes réplicas biológicas. Las réplicas pertenecientes a la misma condición agruparon juntas y fueron muy similares entre sí, lo cual, de nuevo, es indicativo de una muy baja variabilidad.

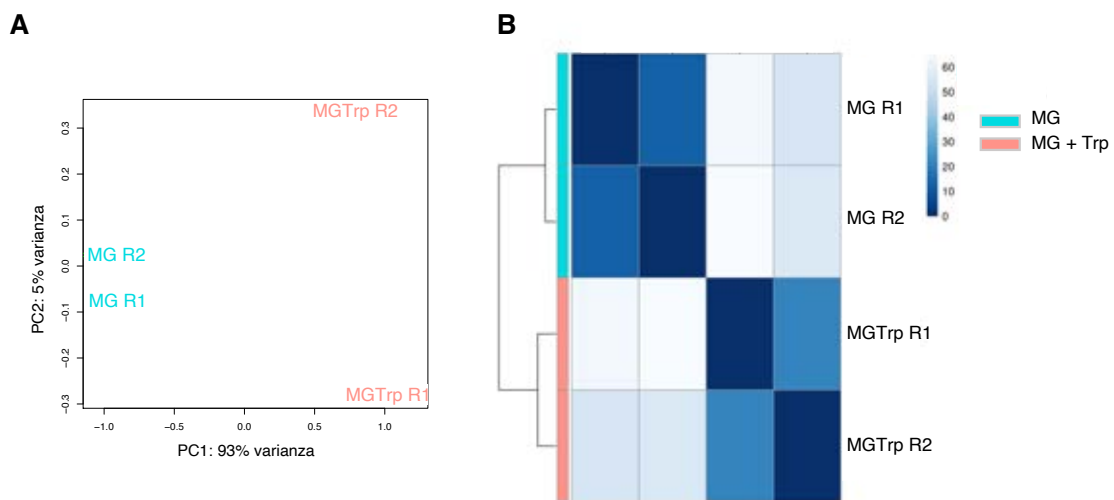


Figura 6. (A) Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras incluidas en el ensayo de RNAseq. El nombre de cada muestra representa el transcriptoma de réplicas biológicas independientes. MG, muestra de Psv *ΔiaaMH1-2* en medio MG sin Trp; MGTrp, muestra de Psv *ΔiaaMH1-2* en medio MG suplementado con Trp. **(B)** Agrupación jerárquica de muestras y cuantificación de la similitud de los perfiles de expresión obtenidos en ausencia (azul) o presencia (naranja) mediante la correlación de Pearson.

Tras procesar las lecturas como se describe en material y métodos, se seleccionaron como genes diferencialmente expresados aquellos con un \log_2 (tasa de variación) superior a 1 e inferior a -1, es decir, aquellos que mostraban una sobreexpresión o represión de 2 veces, respectivamente, en presencia de Trp (Figura 7A). El análisis transcriptómico comparativo identificó un total de

1023 genes diferencialmente expresados entre ambas condiciones, con 611 genes sobreexpresados y 412 genes reprimidos en presencia de Trp en el medio (Figura 7B). Con el fin de conocer la función principal de los genes diferencialmente expresados se realizó una asignación de términos GO (del inglés, *Gene Ontology*) utilizando el software Sma3s.v2 (Casimiro-Soriguer et al., 2017). Posteriormente, se realizó un enriquecimiento funcional utilizando el paquete de R topGO (Alexa and Rahnenfuhrer, 2020), seleccionando las categorías que mostraron una probabilidad (*p-value*) inferior a 0.05 (Figura 7C). Además, se analizó específicamente la expresión de los genes presentes en *Psv ΔiaaMH1-2* e implicados en las rutas de biosíntesis de IAA descritas hasta la fecha (Tabla 7), no encontrando diferencias en la expresión de ninguno de estos genes (datos no mostrados).

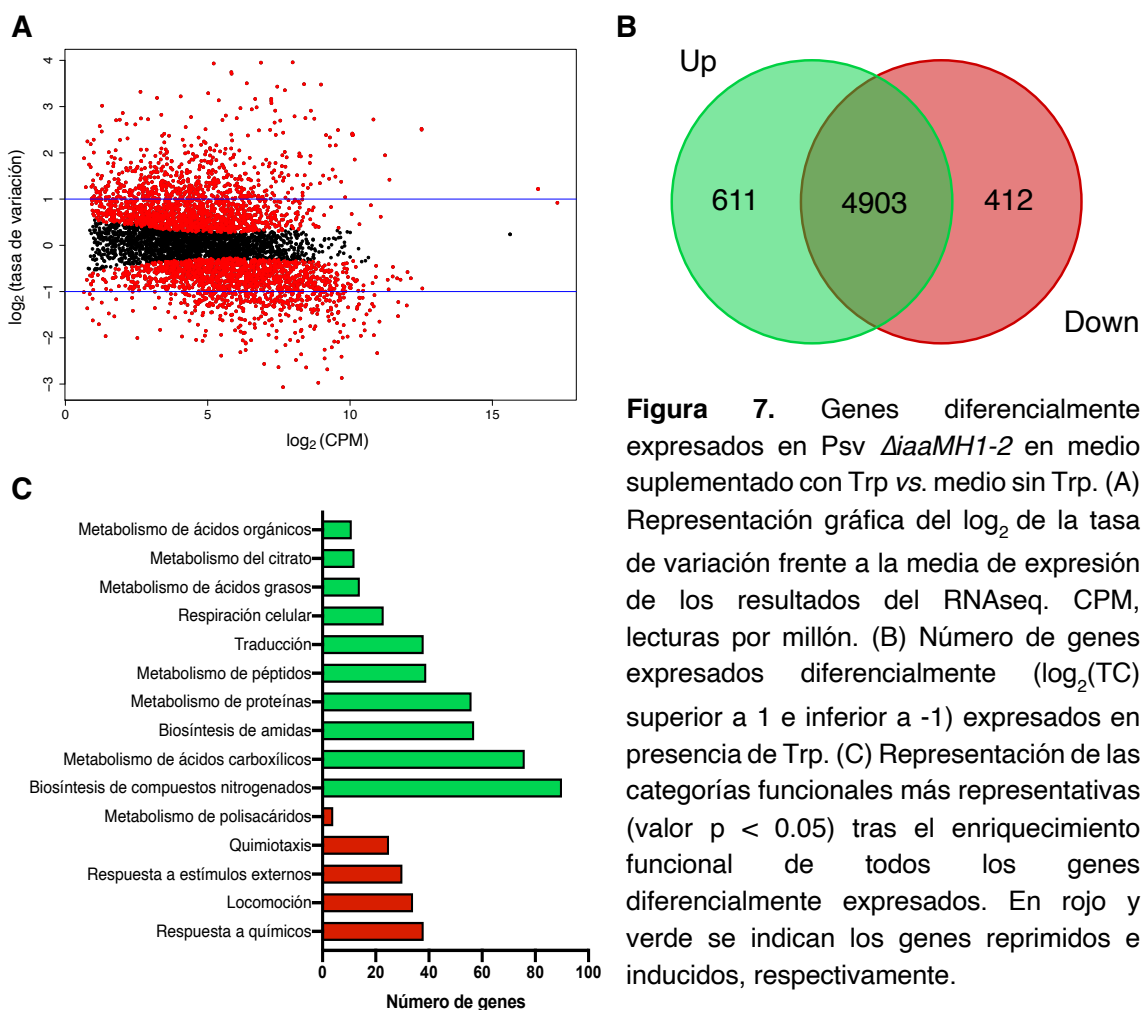


Figura 7. Genes diferencialmente expresados en *Psv ΔiaaMH1-2* en medio suplementado con Trp vs. medio sin Trp. (A) Representación gráfica del log₂ de la tasa de variación frente a la media de expresión de los resultados del RNAseq. CPM, lecturas por millón. (B) Número de genes expresados diferencialmente (log₂(TC) superior a 1 e inferior a -1) expresados en presencia de Trp. (C) Representación de las categorías funcionales más representativas (valor p < 0.05) tras el enriquecimiento funcional de todos los genes diferencialmente expresados. En rojo y verde se indican los genes reprimidos e inducidos, respectivamente.

Sin embargo, el análisis por RNAseq permitió la identificación de una serie de genes, sobreexpresados en presencia de Trp y anotados con actividad deshidrogenasa, que podrían estar implicados en la producción de IAA (Tabla 10). Entre los genes identificados, se encontraron genes implicados en el metabolismo de D-aminoácidos y dos genes que codifican una aspartato-semialdehído deshidrogenasa, la cual participa en el metabolismo de los aminoácidos glicina, serina y treonina, así como en la biosíntesis de lisina. Además, también se identificaron genes relacionados con el metabolismo de monosacáridos (glucosa, manosa y sorbosa) y relacionados con el metabolismo energético. Por último, también se identificó un gen que codifica una proteína con actividad aldehído deshidrogenasa.

Tabla 10. Genes anotados con actividad deshidrogenasa y sobreexpresados en *Psv ΔiaaMH1-2* en presencia de Trp.

ID	Producto	log ₂ (TC) ^a	Tamaño (aa)	Dominio Pfam ^b
PSA3335_RS07235	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	2.20	113	-
PSA3335_RS16205	UDP-glucosa/GDP-manosa deshidrogenasa	2.08	464	PF03721; PF00984; PF03720
PSA3335_RS17105	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	1.91	1015	PF02913; PF01565; PF13183
PSA3335_RS10130	Aldehído deshidrogenasa	1.79	159	DUF2383
PSA3335_RS23405	L-sorbosa deshidrogenasa	1.20	442	PF07995
PSA3335_RS15460	Acil-CoA deshidrogenasa	1.13	337	PF02770
PSA3335_RS21420	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	1.06	336	PF01118
PSA3335_RS09900	Glicina deshidrogenasa	1.03	954	PF02347
PSA3335_RS27845	L-iditol deshidrogenasa	1.01	257	PF13561
PSA3335_RS20985	L-sorbosa deshidrogenasa	1.00	430	PF07995
PSA3335_RS26835	D-Aminoácido deshidrogenasa	0.99	433	PF01266

^a TC, Tasa de cambio

Además, utilizando Pfam se analizó la secuencia de las proteínas codificadas en los genes identificados en el análisis por RNAseq, con el fin de determinar la presencia de dominios funcionales en estas proteínas. Sin embargo, no se identificó ninguna proteína con un dominio funcional característico de las proteínas aldehído deshidrogenasa (PF00171), presente en las proteínas AldA, AldB, AldC y AldD analizadas en este trabajo.

En resumen, en este trabajo se ha demostrado que 4 proteínas con actividad aldehído deshidrogenasa (AldA, AldB, AldC y AldD) están individualmente implicadas en la producción de IAA en *Psv ΔiaaMH1-2*. Sin embargo, la producción remanente de IAA observada en los cultivos de todos los mutantes sugiere que la acción combinada de estas 4 enzimas ALD podría ser responsable de la síntesis de IAA en *Psv ΔiaaMH1-2*, o bien, que existan enzimas adicionales que contribuyan a la síntesis de IAA en esta cepa. *Psv* NCPPB 3335 codifica en su genoma hasta 16 proteínas con dominios funcionales aldehído deshidrogenasa, alguna de las cuales podría intervenir en la síntesis de IAA. Además, el análisis transcriptómico RNAseq realizado en este trabajo ha permitido identificar 11 genes con actividad deshidrogenasa cuyos niveles de expresión aumentan en presencia de Trp. Sin embargo, la presencia de intermediarios de otras rutas de biosíntesis de IAA en *Psv ΔiaaMH1-2*, como IAN o IAM, sugiere que la producción de IAA también podría llevarse a cabo mediante la acción combinada de dos o más rutas.

DISCUSIÓN

La capacidad de producir de IAA es un proceso ampliamente distribuido entre las bacterias fitopatógenas pertenecientes al complejo *P. syringae*, proceso que la mayoría de las bacterias realizan a partir de Trp, utilizando al menos cinco rutas diferentes (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Spaepen et al., 2007). En bacterias tumorigénicas, como *P. savastanoi*, *A. tumefaciens* y *P. agglomerans* la producción de IAA es un elemento fundamental para el desarrollo de síntomas hiperplásticos y ocurre principalmente a través de la ruta de la IAM. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de múltiples rutas en una misma bacteria (Duca et al., 2014b; Patten et al., 2013). En *A. tumefaciens* y *P. agglomerans* se ha demostrado que la producción de IAA se produce también a través de las rutas IAN e IPyA, respectivamente. En *P. agglomerans* la expresión de las rutas ocurre de manera diferencial, predominando la producción de IAA a través de la ruta IPyA durante el proceso de colonización epifítica y la ruta IAM durante el proceso de infección (Kobayashi et al., 1995; Manulis et al., 1998).

Sin embargo, dentro del complejo *P. syringae* también existen otras cepas productoras de IAA donde no se ha descrito la presencia de genes relacionados con su biosíntesis. La construcción de un mutante en la ruta principal de biosíntesis en Psv NCPPB 3335 (Psv $\Delta iaaMH1-2$), demostró una reducción significativa de los niveles de IAA producidos por dicho mutante. Sin embargo, continuaba detectándose una producción basal de IAA en cultivos de esta cepa en medio rico LB (Aragón et al., 2014). En este trabajo, se ha demostrado que este mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ muestra una inducción de la producción de IAA en presencia de Trp similar a la descrita para el resto de cepas del complejo *P. syringae* (Figura 2). Este comportamiento también se ha observado en múltiples patovares de *P. syringae*, entre los que destaca Pto DC3000, carente de los genes *iaaM* e *iaaH* y que aumentan sus niveles de IAA en presencia de Trp, produciendo concentraciones similares de IAA (Glickmann et al., 1998) que el mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ (Figura 2). Este hecho, sugirió la posibilidad de que

exista una ruta de producción de IAA independiente de la ruta IAM y compartida entre diversas cepas del complejo *P. syringae*.

En este trabajo, se ha identificado en Psv NCPPB 3335 la presencia de cuatro genes con actividad aldehído deshidrogenasa e implicados en la producción de IAA. En las condiciones probadas y en el fondo genético de la cepa mutante Psv *ΔiaaMH1-2*, la eliminación individual de los genes *aldC* y *aldD* reduce la producción de IAA en mayor medida que *aldA* y *aldB*. Sin embargo, en la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 todos los mutantes mostraron una reducción similar de la acumulación de IAA (Figura 4AB). La reducción de los niveles de IAA en todas las cepas mutantes indica que la actividad aldehído deshidrogenasa responsable de la síntesis de IAA se encuentra distribuida entre múltiples enzimas presentes en el genoma de Psv. Por lo tanto, la presencia de IAA en los cultivos de todos los mutantes de los genes *ald*, sugiere la necesidad de llevar a cabo la construcción de mutantes múltiples en estos genes, para analizar si el efecto sobre la producción de IAA es acumulativo. Sin embargo, un doble mutante en genes *ald* en Pto DC3000 no redujo de manera significativa los niveles de IAA producidos por esta cepa (McClerklin et al., 2018), lo que sugiere que para lograr un cese completo de la producción de IAA podría ser necesaria la pérdida de función de otros genes *ald* o con otras actividades. A diferencia de Pto DC3000, todos los mutantes *ald* en Psv *ΔiaaMH1-2* redujeron de manera significativa los niveles de IAA producidos. Además, la mutación del gen *aldD*, no analizado en Pto DC3000, también confirmó su contribución a la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que la construcción de dobles o triples mutantes en genes *ald* provoque una mayor disminución de la cantidad de IAA producido en Psv *ΔiaaMH1-2* y en Pto DC3000.

Con el fin de identificar otras proteínas potencialmente implicadas en la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*, los análisis genómicos realizados en este trabajo identificaron 12 proteínas ALD con dominios funcionales con actividad aldehído deshidrogenasa (Tabla 7). Los valores de identidad obtenidos entre las proteínas ALD analizadas en este trabajo y las diferentes proteínas identificadas

fueron inferiores al 45%. Sin embargo, las proteínas AldA, AldB, AldC y AldD, las cuales contribuyen la producción de IAA en en Psv *ΔiaaMH1-2*, también muestran un valor de identidad del 45% entre ellas. De manera similar, las proteínas ALD descritas en Pto DC3000 también muestran entre ellas una identidad de aproximadamente el 40% (McClerklin et al., 2018). Recientemente, se ha definido la estructura tridimensional de la proteína AldA y AldC de Pto DC3000, que, junto a análisis bioquímicos, ha revelado sus características clave para la síntesis de IAA, incluida la base molecular de la especificidad por su sustrato (IAAld). Además, también se ha determinado que algunas de las enzimas ALD de esta cepa podrían tener afinidad por diferentes sustratos, teniendo mayor preferencia por otro tipo de sustratos de tipo aldehído y derivados del naftaleno en lugar de por IAAld (Lee et al., 2020; McClerklin et al., 2018)

Por lo tanto, teniendo en cuenta: 1) la baja identidad de secuencia entre las diferentes proteínas ALD identificadas en Psv NCPPB 3335 y en Pto DC3000, 2) las diferencias de actividad y afinidad por IAAld que muestran las proteínas ALD de Pto DC3000 y, 3) la preferencia de algunas de estas enzimas ALD por otro tipo de sustrato tipo aldehído, es posible que la producción de IAA a través de esta ruta no sea el proceso principal en el que estas enzimas participan preferentemente, contribuyendo de manera indirecta a la producción de IAA a partir de IAAld. Además, también cabe la posibilidad de que la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2* esté mediada por enzimas diferentes, sin actividad aldehído deshidrogenasa y no identificadas hasta la fecha.

Para profundizar en el estudio de la producción de IAA en la cepa mutante Psv *ΔiaaMH1-2*, se realizó también un análisis transcriptómico RNAseq en presencia y ausencia de Trp. La adición de Trp al medio provocó una variación en la expresión de aproximadamente el 20% de los genes del genoma de Psv *ΔiaaMH1-2* (Figura 7). El análisis de los genes sobreexpresados bajo estas condiciones, ha permitido la identificación de un gen anotado como aldehído deshidrogenasa, aunque carece del dominio funcional característico de estas

proteínas (Tabla 10). Además, también se han identificado otras proteínas con actividad deshidrogenasa, relacionadas directamente con el metabolismo de otros aminoácidos, monosacáridos o con el metabolismo energético, muchas de las cuales, posiblemente no estén implicadas en la biosíntesis de IAA. Trabajos anteriores en los que se han realizado análisis transcriptómicos utilizando *microarrays*, han revelado que algunas rutas metabólicas de producción de aminoácidos, como la arginina, son sensibles a cambios en las concentraciones de Trp en el medio (Khodursky et al., 2000). Aunque la anotación de estos genes no se corresponde con proteínas ALD, la actividad deshidrogenasa presentes en estas rutas sugiere que podrían estar contribuyendo de manera indirecta a la producción de IAA a partir de IAAld, pese a que su función principal sea independiente de esta. En este trabajo, se ha demostrado mediante mutagénesis dirigida, que nuevos genes no descritos anteriormente (*aldD*) también contribuyen a la producción de IAA en Psv NCPPB 3335. Por lo tanto, la identificación y mutación de otros genes potencialmente implicados en la biosíntesis de IAA es esencial para determinar su contribución a la producción de IAA en Psv Δ *iaaMH1-2* y otras cepas del complejo *P. syringae* que puedan compartirlos.

En el análisis transcriptómico, no se encontró una correlación entre el aumento de la producción de IAA y un aumento en la expresión de ninguno de los genes implicados en las rutas de producción de IAA descritas anteriormente, incluidos los genes *ald* descritos en este trabajo (Tabla 7). No obstante, esto no es sorprendente, ya que en Psv, el gen *iaaM*, implicado en la ruta principal de biosíntesis de IAA en esta bacteria, tampoco modifica sus niveles de expresión al suplementar con Trp. Este gen, únicamente se encuentra regulado por el acceso limitante al Trp y mediante un bucle de regulación negativa provocado por su producto (Hutchesong y Kosuge, 1985). Por lo tanto, los genes *ald* podrían tener un comportamiento similar, condicionando su capacidad de producción de IAA a la disponibilidad de Trp. La adición de Trp al medio de cultivo provocaría un aumento notable de los niveles de IAA producidos por estas proteínas, sin afectar a su actividad o a sus niveles de expresión.

En los sobrenadantes de Psv *ΔiaaMH1-2* cultivada en medio MG suplementado con Trp, se identificó mediante espectrometría de masas, la acumulación de IAM, IAN e IAAld, compuestos intermediarios de otras rutas de biosíntesis de IAA (Tabla 6). Además, análisis genómicos revelaron la existencia de un gen posiblemente implicado en la ruta TAM en Psv (Tabla 7). Conjuntamente, estos datos sugieren que la producción remanente de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*, así como en otras cepas del complejo *P. syringae*, también podría deberse a nuevas rutas biosintéticas no caracterizadas donde estos compuestos participarían como intermediarios.

Recientemente, se ha demostrado que en aproximadamente la mitad de las bacterias cuya secuencia genómica se encuentra disponible en NCBI, existe una coexistencia de genes implicados en diferentes rutas de biosíntesis de IAA, siendo las rutas TAM e IPyA las más representadas. En bacterias asociadas a plantas, las rutas TAM e IAM fueron las predominantes. Sin embargo, muchas de estas bacterias, pese a contener enzimas implicadas en estas rutas de biosíntesis, no codifican las enzimas requeridas para completar las rutas (Zhang et al., 2019). En Psv *ΔiaaMH1-2*, se ha identificado una amida oxidasa, cuya actividad esta relacionada con la producción de IAA a través de la ruta TAM. Además, la ausencia de genes implicados en pasos anteriores, junto con la ausencia de TAM en los cultivos de esta cepa, en las condiciones ensayadas, sugieren que posiblemente esta ruta no participe en la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*. Por lo tanto, la presencia en un genoma de un gen esencial para la producción de IAA a través de una determinada ruta, no capacita necesariamente para producir IAA a través de ella.

En Psv, no hemos identificado genes implicados en la ruta del IAN, descrita principalmente en *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Sin embargo, la ausencia de los genes encargados de la conversión del Trp en IAN no es sorprendente, ya que trabajos anteriores han descrito la pérdida de estos genes en múltiples cepas de *P. syringae* procedentes de cultivos agrícola (Howden et al., 2009).

Asimismo, no se detectó acumulación de indol-3-acetaldoxima (IAOx) en el sobrenadante de cepas de Psv. En plantas, la IAOx se produce a partir de Trp y, posteriormente, es transformado en IAA a través de la IAM o el IAN. Sin embargo, en plantas de arroz y maíz, análisis dirigidos a la producción de IAA a través de esta ruta no detectaron IAOx (Sugawara et al., 2009). Del mismo modo, en Psv desconocemos si la producción de IAN o IAM podría proceder de IAOx, ya que el gen descrito como implicado en este proceso no se ha identificado. Por otro lado, la adición de Trp no supuso un aumento de la acumulación de IAN, ni en las cepas Psv silvestre ni en Psv $\Delta iaaMH1-2$ (Tabla 6). En plantas, se ha sugerido la presencia de rutas de biosíntesis de IAA independientes del Trp (Bartling et al., 1994; Normanly et al., 1993), por lo que el IAN identificado en Psv podría proceder de rutas independientes del Trp. Trabajos recientes, han relacionado la producción de IAA a través de estas rutas con procesos de regulación del desarrollo en plantas. Además, se ha propuesto que la producción de IAA a través de esta ruta independiente de Trp podría producirse a partir de metabolitos con carácter indólico, como el indol, y a través de enzimas no identificadas hasta la fecha (Nonhebel, 2015; Wang et al., 2015).

Por último, la presencia de IAM en la cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$, carente de la ruta principal de producción de IAM, sugiere la presencia de una vía de producción de IAM independiente del gen *iaaM* y no descrita en *P. savastanoi* hasta la fecha. En plantas, se ha sugerido que la producción de IAM podría derivarse del IAOx, el cual se transformaría en IAA, sin embargo, no se han identificado en Psv los genes implicados en su biosíntesis (Sugawara et al., 2009). En *A. tumefaciens* y *Rhizobium spp.* se han identificado genes con actividad nitrilo hidrolasa y amidasa, implicadas en la conversión de IAN en IAA, a través de IAM, aunque no se identificaron genes homólogos en Psv (Kobayashi et al., 1995). Además, se ha sugerido la presencia de una potencial ruta de transformación del IAM en IAAlD (Krause et al., 2015).

En conclusión, en este trabajo se ha demostrado la implicación de proteínas aldehído deshidrogenasa en la producción de IAA en Psv. Además, y debido a la ausencia en Psv de genes implicados en las rutas descritas hasta la fecha, se

ha planteado que la síntesis de IAA podría realizarse a través de una vía que implica la conversión del Trp a IAAlD a través de una actividad TSO. Sin embargo, la detección de IAM e IAN en la cepa mutante de *Psv ΔiaaMH1-2* abre las puertas a la identificación de otras rutas no identificadas hasta la fecha y sugiere que la producción de IAA estaría mediada por la acción combinada de múltiples rutas con estos compuestos intermediarios como protagonistas (Figura 8). Por lo tanto, sigue siendo necesario realizar un estudio más detallado del metabolismo del IAA en las cepas del complejo *P. syringae* productoras de esta fitohormona.

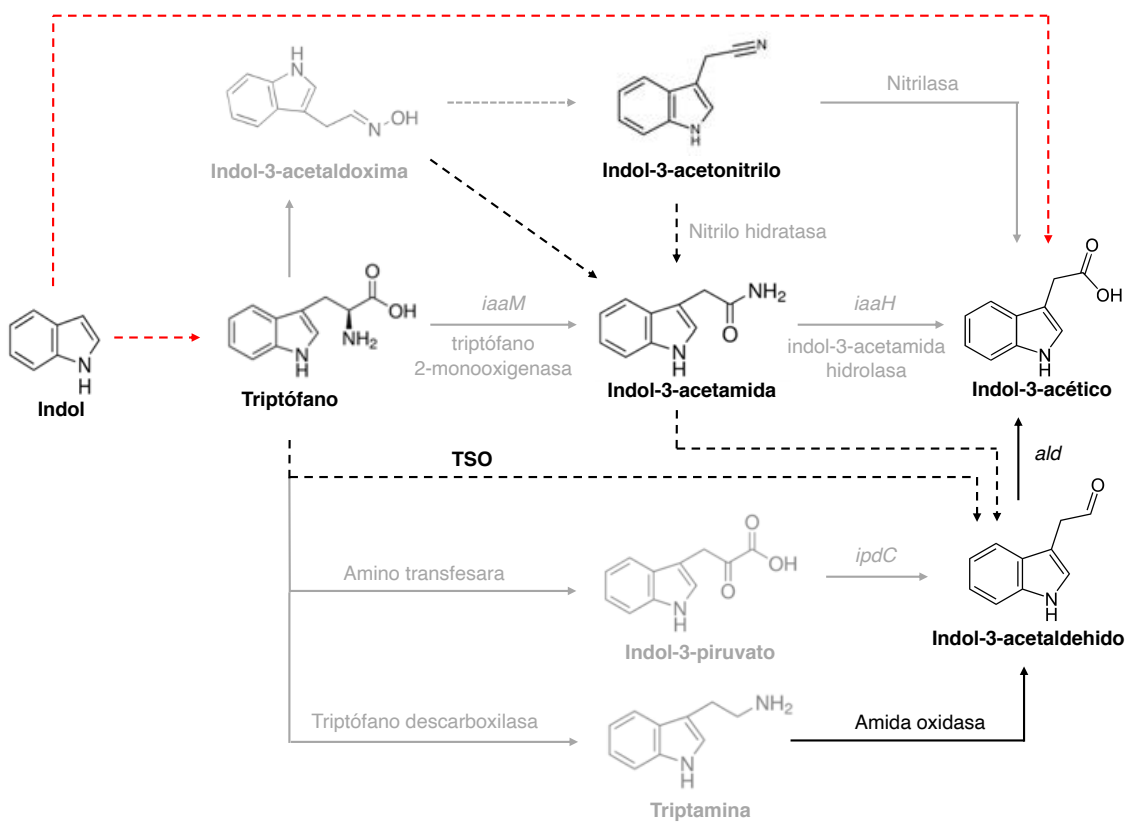


Figura 8. Resumen esquemático de las diferentes rutas de biosíntesis de IAA descritas y propuestas en *Psv ΔiaaMH1-2* en este trabajo. En negro se indican los genes presentes en el genoma o los compuestos identificados en *Psv ΔiaaMH1-2*. En gris se indican genes y compuestos no identificados. Mediante una línea negra punteada, se indican posibles rutas de biosíntesis de IAA en *Psv ΔiaaMH1-2* no descritas hasta la fecha. En rojo se indican potenciales rutas alternativas e independientes del Trp en esta bacteria. Encima de las flechas se indica el gen implicado en cada paso de las rutas de biosíntesis o, en caso de conocerse el gen, la actividad enzimática. *iaaM*: triptófano monooxigenasa; *iaaH*: indol-3-acetamida hidrolasa; *ald*: aldehído deshidrogenasa; *ipdC*: indol-3-piruvato descarboxilasa TSO: cadena lateral de oxidación del triptófano; AO: amida oxidasa. Adaptado de Spaepen et al., (2007).

| CAPÍTULO 3 |

Regulación transcripcional global por IAA endógeno y exógeno en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335

INTRODUCCIÓN

El ácido indol-3-acético (IAA) es una auxina que desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo celular de las plantas. En plantas, las auxinas regulan la expresión génica a nivel transcripcional de manera eficiente y selectiva, actuando mediante regulación positiva y negativa (Paponov et al., 2008; Teale et al., 2006). En bacterias fitopatógenas, la producción de IAA se ha definido como un factor de patogenicidad o virulencia, cuya acción induce modificaciones en la fisiología del huésped que facilitan el proceso de infección (Patten et al., 2013; Van Puyvelde et al., 2011). En *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), la producción de IAA es un factor de patogenicidad esencial durante el proceso de formación del tumor en plantas de olivo. En la cepa modelo de Psv utilizada en esta Tesis Doctoral, NCPPB 3335, más del 90% del IAA producido se sintetiza a través de la ruta de la indol-3-acetamida (IAM), a través de la cual, el Triptófano (Trp) es convertido en IAM, para posteriormente transformarse en IAA mediante la intervención de los genes *iaaM* e *iaaH*, respectivamente (Aragón et al., 2014). En el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral, se ha sugerido que en Psv NCPPB 3335 el IAA no producido a través de la ruta de la IAM podría sintetizarse gracias a la transformación de indol-3-acetaldehído (IAAld) en IAA, mediante la acción de proteínas con actividad aldehído deshidrogenasa, al igual que ocurre en otras bacterias del complejo *P. syringae* carentes de los genes *iaaM* e *iaaH* (McClerklin et al., 2018). En otras bacterias asociadas a plantas que sintetizan IAA a través de la ruta del indol-3-piruvato (IPyA), como la bacteria fijadora de nitrógeno *Azospirillum brasilense*, el IPyA se transforma en IAAld mediante la acción del gen *ipdC*.

En Psv, la transcripción del gen *iaaM* esta regulada negativamente por su producto final, el IAA (Hutcheson and Kosuge, 1985). Por el contrario, en *A. brasilense*, el IAA regula positivamente de la transcripción del gen *ipdC* (Vande Broek et al., 1999). Estos resultados, sugieren la existencia de elementos reguladores capaces de responder a la auxina y que actúen en la región promotora de los genes *iaaM* e *ipdC*. En plantas, los factores de respuesta a auxinas (ARFs, del inglés, *auxin response factors*) son reguladores

transcripcionales positivos o negativos que, en respuesta a concentraciones de IAA, se unen a los promotores que contienen la secuencia TGTCTC, denominada elementos de respuesta a auxinas (AuxRE, *auxin response element*). Este mecanismo de regulación es responsable de las alteraciones rápidas y específicas que se producen por IAA a nivel transcripcional (Hagen and Guilfoyle, 2002).

En bacterias, se ha demostrado la existencia de un AuxRE en el promotor del gen *ipdC* de *A. brasilense*, elemento que resulta esencial para la regulación de este gen por IAA (Lambrecht et al., 1999; Vande Broek et al., 1999; 2005). Además, en *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) ESC23, se han identificado recientemente cajas AuxRE en el promotor del gen *iaaL*, implicado en la producción del conjugado IAA-Lisina, y en el del operón formado por los genes *iaaM* e *iaaH* (Cerboneschi et al., 2016). Estos resultados sugieren que, en bacterias productoras de IAA, podría existir una regulación transcripcional mediada por una forma ancestral procariota del elemento AuxRE, responsable de modificar la expresión génica por IAA, lo que refuerza el papel de esta hormona como molécula de señalización también en bacterias, incluida *P. savastanoi*.

La regulación por IAA de otros factores de virulencia es un proceso descrito en multitud de bacterias fitopatógenas. En la bacteria formadora de tumores *Pantoea agglomerans*, la biosíntesis de IAA se lleva a cabo mediante dos rutas diferentes, la ruta de la IAM y del IPyA, las cuales contribuyen de manera diferencial a la formación de tumores y al estado epifítico, respectivamente (Chalupowicz et al., 2009; Manulis et al., 1998). La inactivación de la biosíntesis de IAA a través de la ruta de la IAM provoca la represión del sistema de secreción tipo III (T3SS) y del sistema de regulación *quorum sensing* (QS), mientras que la inactivación de la producción de IAA a través de la ruta del IPyA induce estos sistemas (Chalupowicz et al., 2009). De manera similar, un mutante *iaaM* de *Dickeya dadantii* muestra una represión de los genes del T3SS, del gen

regulador global *gacA* y de los genes de la pectato liasa *pelD*, *pell* y *pelL* (Yang et al., 2007).

Además del efecto endógeno del IAA en la regulación génica, diversos estudios han demostrado que la aplicación de IAA de manera exógena también provoca cambios en la transcripción de determinados genes bacterianos, entre los que se encuentran genes codificadores de factores de virulencia. En Psv NCPPB 3335, la adición exógena de IAA provoca la represión de los genes del T3SS *hrpL* y *hrpA*, y la activación de gen *vgrG* del sistema de secreción tipo VI (T6SS) (Aragón et al., 2014). De manera similar, *Agrobacterium tumefaciens* muestra una represión del regulón *vir* del sistema de secreción tipo IV (T4SS) en respuesta a IAA exógeno (Yuan et al., 2008), sugiriendo un efecto adicional del IAA sobre otros genes no estudiados durante la interacción de *P. savastanoi* con sus huéspedes.

Hasta la fecha, la regulación transcripcional por IAA endógeno y exógeno en bacterias se ha analizado a nivel global, utilizando *microarrays* o RNAseq, en *Escherichia coli* (Bianco et al., 2006a; Bianco et al., 2006b), *D. dadantii* (Yang et al., 2007), *A. tumefaciens* (Yuan et al., 2008), *Sinorhizobium meliloti* (Imperlini et al., 2009), *A. brasilense* (Van Puyvelde et al., 2011) y *Bradyrhizobium japonicum* (Donati et al., 2013). En este capítulo, nos hemos centrado en el papel del IAA como molécula de señalización en Psv NCPPB 3335, estudiando los cambios transcriptómicos provocados como resultado de la síntesis y adición exógena de esta fitohormona. Más específicamente, hemos analizado los cambios transcripcionales provocados por el IAA en genes codificantes de factores de virulencia previamente descritos en esta bacteria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas de *P. savastanoi* se cultivaron a 28 °C en medio de cultivo lisogénico (LB) (Bertani, 1951) o en medio mínimo manitol-glutamato (MG) suplementado con citrato férrico (10 g/L de manitol, 2 g/L de ácido L-glutámico, 0.5 g/L de KH₂PO₄, 0.2 g/L de NaCl, 0.2 g/L de MgSO₄, pH 7) (Bronstein et al., 2008). Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>		
NCPPB 3335	Cepa silvestre	(Pérez-Martínez et al., 2007)
<i>ΔiaaMH1-2</i>	Doble mutante por deleción de los dos operones <i>ΔiaaMH1-2</i>	(Aragón et al., 2014)

RNAseq

A partir de un cultivo de Psv NCPPB 3335 y del mutante Psv *ΔiaaMH1-2* en medio MG incubado durante toda la noche, se obtuvieron 2 cultivos independientes en medio MG que se incubaron durante 20h hasta alcanzar la fase exponencial (OD_{600nm} = 0.5). Por otro lado, a partir de un cultivo de Psv NCPPB 3335 incubado en medio LB durante toda la noche, también se inocularon 4 cultivos independientes en medio LB y se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial (OD_{600nm} = 0.5). Posteriormente, 2 de los cultivos de LB resultantes, se transfirieron a medio de inducción HRP (Huynh et al., 1989), y los otros dos se transfirieron a medio de inducción HRP suplementado con 1 mM de IAA, donde se incubaron durante 6h.

El RNA total de cada muestra se extrajo utilizando el kit de purificación de RNA “RNeasy® Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se eliminó el DNA de las muestras con el kit TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA ribosómico se eliminó de las muestras de RNA total utilizando el kit Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion para bacterias,

siguiendo las recomendaciones del fabricante (Illumina; California, EEUU). Por último, las genotecas de cDNA se obtuvieron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina; California, EEUU). La secuenciación de las genotecas se realizó en los servicios de ultrasecuenciación (<http://www.scbi.uma.es/site/omics/ultraseq>) de la Universidad de Málaga (España), utilizando un equipo Illumina NextSeq550 (Illumina; California, EEUU) y obteniéndose lecturas pareadas de 75 pb de longitud. La secuenciación produjo un total de 400 millones de lecturas, y utilizando el software SeqTrimNext (<http://www.scbi.uma.es/seqtrimnext>) se eliminaron las lecturas homólogas a RNA ribosomales. Posteriormente, las lecturas se procesaron con SeqTrim para eliminar adaptadores, secuencias de baja calidad o ambiguas. Las secuencias inferiores a 25 pb también fueron eliminadas. Las lecturas resultantes se alinearon frente al genoma cerrado de Psv NCPPB 3335 (NZ_CP008742) y frente a la secuencia de sus tres plásmidos (pPsv48A, FR820585.2; pPsv48B, FR820586.1 y pPsv48C, FR820587.2) utilizando BWA (Burrows-Wheeler Aligner) (Li and Durbin, 2009). Las lecturas alineadas de forma exclusiva se utilizaron para calcular el número de lecturas de cada gen, mientras que las lecturas con alineamientos ambiguos fueron rechazadas. Los genes expresados diferencialmente entre dos muestras se analizaron utilizando DEgenes Hunter (Gayte et al., 2017).

Análisis bioinformático

La predicción de los posibles RNA mensajeros (mRNA) diana regulados por pequeños RNA (sRNA) identificados en este trabajo se llevó a cabo utilizando CopraRNA (Wright et al., 2014). Las regiones promotoras de los genes se extrajeron manualmente utilizando Geneious 8.1.9 (Kearse et al., 2012). La representación gráfica de la abundancia de las diferentes secuencias se realizó utilizando la herramienta WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/>).

RESULTADOS

Índices de calidad de la secuenciación RNAseq

Para analizar el efecto endógeno y exógeno del IAA sobre el transcriptoma de Psv NCPPB 3335 se realizaron RNAseq comparativos. Para analizar el efecto endógeno, se comparó el transcriptoma de la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 con la cepa mutante Psv *ΔiaaMH1-2*, la cual carece de los genes *iaaM* e *iaaH*, implicados en la biosíntesis de más del 90% del IAA producido por esta cepa (Capítulo 2). Para ello, ambas cepas se incubaron en medio de cultivo manitol-glutamato (MG) durante 20h. Por otro lado, el efecto exógeno del IAA se analizó incubando la cepa Psv NCPPB 3335 en medio de inducción HRP, un medio mínimo que imita las condiciones del apoplasto vegetal, suplementado o no con 1 mM de IAA. Se siguieron unas condiciones de cultivo idénticas a las descritas anteriormente (Capítulo 2) y la extracción de RNA se realizó tal y como se describe en material y métodos. Posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación de dos muestras independientes de RNA para cada una de las condiciones como se describe en material y métodos.

Tabla 2. Resumen de las lecturas obtenidas en las secuenciaciones RNAseq

Muestra	Entrada	Salida	Eliminadas	% Eliminadas
Efecto endógeno de IAA				
Psv WT R1	43,297,180	40,273,582	1,809,500	4.18
Psv WT R2	44,165,714	40,534,846	2,093,266	4.74
Psv <i>ΔiaaMH1-2</i> R1	45,897,058	42,956,306	1,778,582	3.88
Psv <i>ΔiaaMH1-2</i> R2	50,074,880	46,648,122	2,065,875	4.13
Efecto exógeno de IAA^a				
HRP R1	41,289,538	37,174,762	2,305,317	5.58
HRP R2	40,704,762	38,429,940	1,336,980	3.28
IAA R1	130,017,076	116,400,190	7,965,853	6.13
IAA R2	128,077,966	115,783,938	7,472,774	5.83

^a HRP, muestras del medio HRP sin IAA; IAA, muestras del medio HRP suplementado con 1 mM de IAA

En la Tabla 2 se indica el número de lecturas obtenidas en la secuenciación para cada una de las muestras (entrada), así como el total de lecturas utilizadas en el análisis (salida) tras eliminar las lecturas correspondientes a los adaptadores y las secuencias de baja calidad, ambiguas o de tamaño inferior a 25 pb.

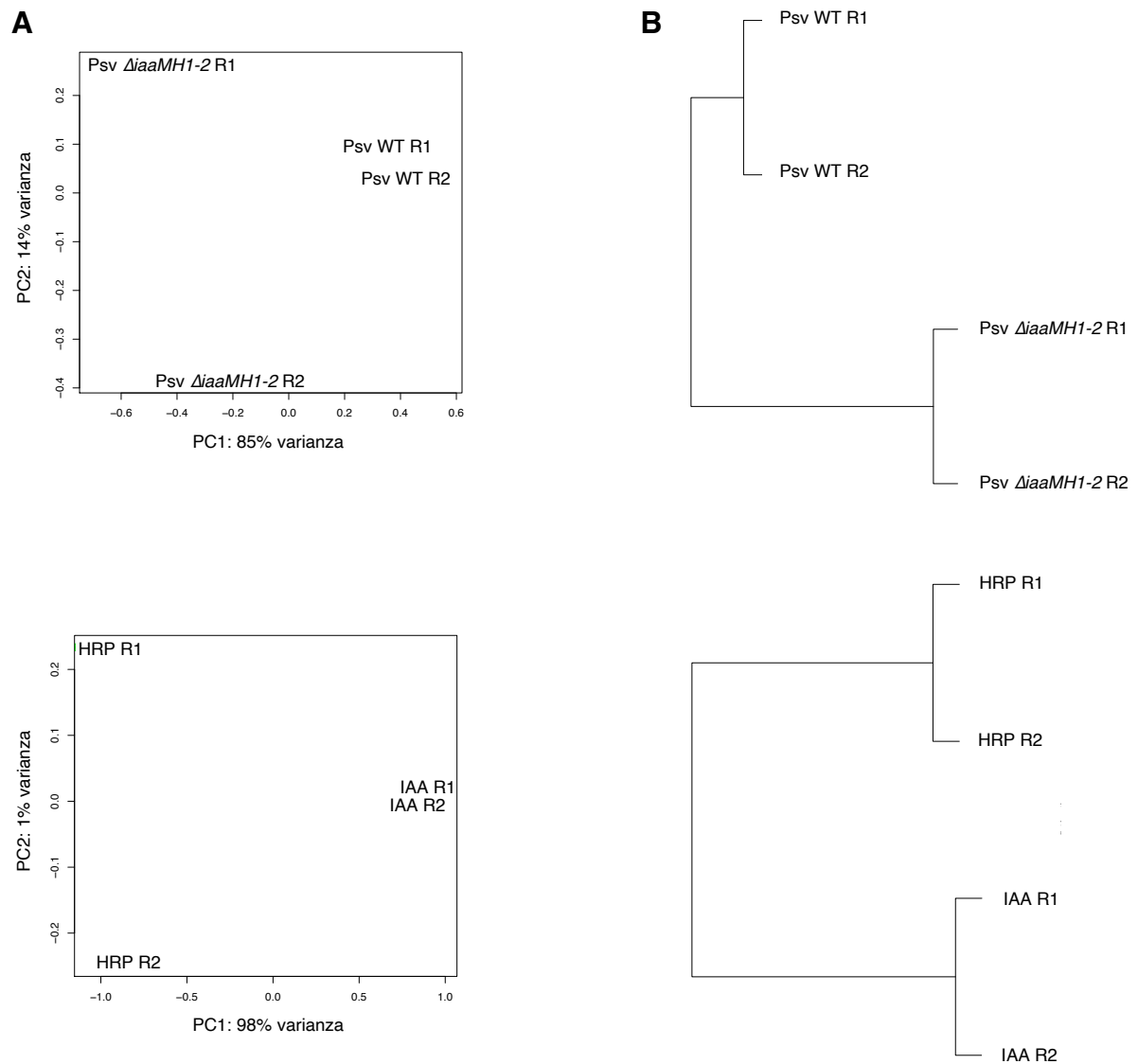


Figura 1. (A) Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras RNAseq correspondientes al análisis del efecto endógeno (arriba) o exógeno (abajo) del IAA en Psv NCPPB 3335. El nombre de cada muestra representa el transcriptoma de réplicas biológicas independientes. **(B)** Agrupación jerárquica de las diferentes muestras. Psv WT, Psv NCPPB 3335; Psv $\Delta iaaMH1-2$, cepa carente de la principal ruta de biosíntesis de IAA en Psv; HRP, muestras del medio HRP sin IAA; IAA, muestras del medio HRP suplementado con 1 mM de IAA.

La varianza entre las diferentes muestras se analizó mediante análisis de componentes principales (PCA), permitiendo detectar las diferencias existentes entre réplicas y condiciones (Figura 1A). En la comparativa entre la cepa silvestre de Psv NCPPB 3335 (Psv WT) vs. Psv $\Delta iaaMH1-2$, la mayor varianza (PC1 = 85%) se identificó entre las dos condiciones. Por el contrario, entre las diferentes réplicas biológicas la varianza fue menor (PC2 = 14%). De manera similar, en el análisis del efecto exógeno de IAA, el 98% de la varianza (PC1) se debía a la diferencia entre las dos condiciones, HRP (medio HRP sin IAA) vs. IAA (medio HRP con 1 mM de IAA), mientras que la diferencia entre las réplicas biológicas únicamente fue del 1% (PC2). Además, en la agrupación jerárquica de las diferentes muestras, agruparon juntas las réplicas pertenecientes a la misma condición (Figura 1B).

La disminución de la concentración de IAA endógena provoca cambios en el transcriptoma de Psv NCPPB 3335

Tras procesar las lecturas como se describe en material y métodos, se seleccionaron los genes expresados diferencialmente con un \log_2 (tasa de variación) superior a 1 e inferior a -1, es decir, aquellos que mostraban una sobreexpresión o represión de al menos 2 veces, respectivamente, en la cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$ en comparación con Psv WT (Figura 2A). En total se identificaron 53 genes diferencialmente expresados, de los cuales 14 genes estaban sobreexpresados y 39 genes reprimidos en Psv $\Delta iaaMH1-2$ (Figura 2B). Utilizando el software Sma3s.v2 (Casimiro-Soriguer et al., 2017), se llevó a cabo una asignación de términos GO (del inglés, *Gene Ontology*) y enriquecimiento funcional para identificar la función principal de los genes expresados diferencialmente. Posteriormente, se llevó a cabo una curación manual mediante blastx para asignar de una forma más precisa sus funciones, que se clasificaron en 9 categorías (Figura 2C, Tabla 3).

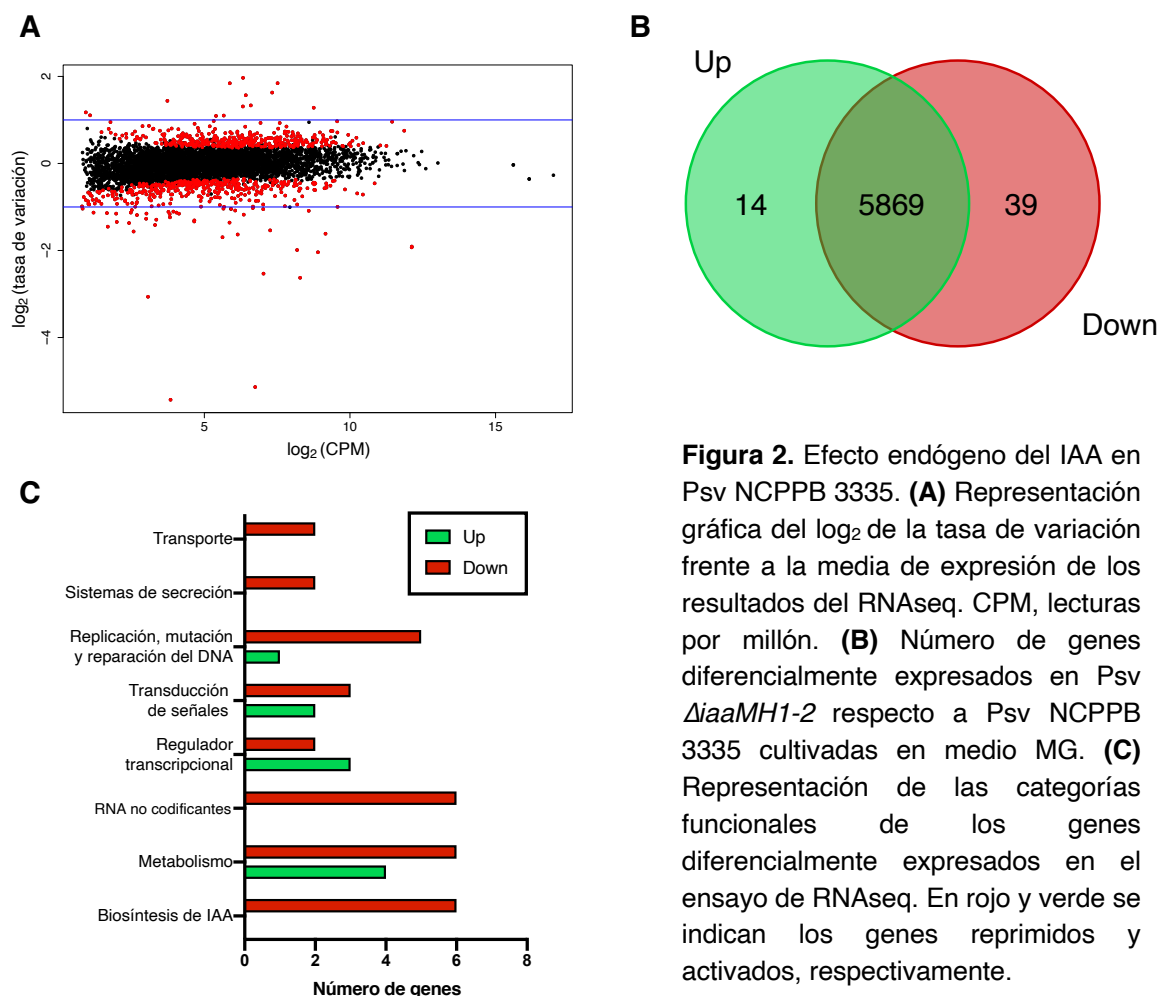


Figura 2. Efecto endógeno del IAA en Psv NCPPB 3335. **(A)** Representación gráfica del \log_2 de la tasa de variación frente a la media de expresión de los resultados del RNAseq. CPM, lecturas por millón. **(B)** Número de genes diferencialmente expresados en Psv $\Delta iaaMH1-2$ respecto a Psv NCPPB 3335 cultivadas en medio MG. **(C)** Representación de las categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en el ensayo de RNAseq. En rojo y verde se indican los genes reprimidos y activados, respectivamente.

Dentro de estas categorías, las formadas por proteínas hipotéticas y los genes relacionados con el metabolismo fueron las que incluían un mayor número de genes. Como era de esperar, se identificaron genes relacionados con la biosíntesis de IAA, como los genes *iaaM* e *iaaH*, que aparecen reprimidos en Psv $\Delta iaaMH1-2$, que carece de ellos. Además, también se identificó un gen anotado con actividad aldehído deshidrogenasa reprimido en Psv $\Delta iaaMH1-2$. Por otro lado, se identificaron genes reguladores, implicados en la transducción de señales o que actúan como reguladores transcripcionales. En este último grupo, destacan los genes *hrpR* y *hrpS*, los cuales se encuentran sobreexpresados en Psv $\Delta iaaMH1-2$. Los genes *hrpR* y *hrpS* codifican dos reguladores transcripcionales encargados de la activación del gen *hrpL* mediante la formación del heterodímero HrpRS.

Tabla 3. Genes expresados diferencialmente en Psv *ΔiaaMH1-2* respecto a Psv NCPPB 3335 y presencia de cajas AuxRE en su región promotora.

ID ^a	Descripción/Producto	log ₂ (TC) ^b	AuxRE
Biosíntesis de IAA			
PSA3335_RS05385*	Indol-3-acetamida hidrolasa (<i>iaaH</i>)	-5.134899	-
PSA3335_RS05390*	Triptófano 2-monooxigenasa (<i>iaaM</i>)	-2.623719	-
PSA3335_RS08645*	Triptófano 2-monooxigenasa (<i>iaaM</i>)	-5.408368	TGTCGA TGTCGT
PSA3335_RS08650*	Indol-3-acetamida hidrolasa (<i>iaaH</i>)	-3.062397	-
PSA3335_RS10130	Aldehído deshidrogenasa	-1.104148	TGTCGA TGTCGT
Metabolismo			
PSA3335_RS02225	N-metilglicina oxidasa	-1.11012	-
PSA3335_RS04380	Enoil-CoA hldratasa	-1.149644	TGTCGA
PSA3335_RS09155*	Proteína de unión a NAD(P)	1.848626	-
PSA3335_RS09160*	Oxidoreductasa NAD(P)-dependiente	1.633415	-
PSA3335_RS09465*	D-eritro-7,8-dihidropterina trifosfato 2'-epimerasa (<i>folX</i>)	1.314393	TGTCGA
PSA3335_RS09470*	GTP ciclohidrolasa (<i>folE</i>)	1.33789	-
PSA3335_RS15110	Peptidasa de serina (familia S8)	-1.04892	-
PSA3335_RS22055*	N-acetilglutaminil glutamina amidotransferasa	-1.042397	-
PSA3335_RS22060*	N-acetilglutaminil glutamina sintetasa	-1.078516	-
PSA3335_RS22535	Acetil-coenzima A sintetasa	-2.037802	TGTCGC
RNA no codificantes			
PSA3335_RS03555	tRNA-Tyr	-1.359431	-
PSA3335_RS04020	tRNA-Leu	-1.037844	-
PSA3335_RS10935	tRNA-Leu	-1.331551	-
PSA3335_RS20355	tRNA-Ser	-1.086621	-
PSA3335_RS20795	Pequeño RNA (sRNA)	-1.162928	TGTCGT
PSA3335_RS21235	tRNA-Leu	-1.140033	-
Regulación: Regulador transcripcional			
PSA3335_RS09165*	Factor de transcripción nuclear	1.571786	-
PSA3335_RS09615	Regulador transcripcional LysR	-1.021508	-
PSA3335_RS10545	HrpR	1.103468	TGTCCT
PSA3335_RS10550	HrpS	0.97673	TGTCGA
PSA3335_RS16900	Regulador transcripcional LysR	-1.308089	-
Regulación: Transducción de señales			
PSA3335_RS02295*	Proteína de unión a nucleótidos cíclicos	-1.630242	-
PSA3335_RS03015	Proteína con dominio PAS	-1.693612	-
PSA3335_RS09145*	Metiltransferasa SAM-dependiente clase 1	1.971378	-
PSA3335_RS12405	Metiltransferasa SAM-dependiente clase 1	1.097062	TGTCAT
PSA3335_RS13750	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	-1.535836	TGTGCA

^aEn gris se indican los genes sobreexpresados. Con un asterisco se indican genes potencialmente expresados en forma de operón.

^bTC, Tasa de cambio

Tabla 3 (Continuación). Genes expresados diferencialmente en Psv *ΔiaaMH1-2* respecto a Psv NCPPB 3335 y presencia de cajas AuxRE en su región promotora.

ID ^a	Descripción	log ₂ (TC) ^b	AuxRE
Replicación, mutación y reparación del DNA			
PSA3335_RS02155	RNA polimerasa factor sigma-70	-1.410994	-
PSA3335_RS02290*	3'-5' exonucleasa	-1.268338	TGTCGG
PSA3335_RS05380	Transposasa	-1.562949	-
PSA3335_RS09170*	Deoxiribodipirimidina fotoliasa	1.284761	-
PSA3335_RS09580	RNA polimerasa factor sigma-70	-1.129338	-
PSA3335_RS17020	RNA polimerasa factor sigma-70	-1.126516	TGTCGC
Sistemas de secreción			
PSA3335_RS25050	Proteína de ensamblaje del pilus Flp (RcpC/CpaB)	-1.367724	TGTCGC
PSA3335_RS25060	ATPasa del sistema de secreción tipo II/IV	-1.183105	TGTCGC
Transporte			
PSA3335_RS06920	Bacterioferretina	-1.067799	-
PSA3335_RS22115	Simporte catión/acetato	-1.985887	TGTCGT
Proteínas hipotéticas^c			
PSA3335_RS09140	Proteína con dominio DUF2878	1.4423	TGTCTT
PSA3335_RS20090	-	-1.4525	TGTGCA
PSA3335_RS20600	Proteína con dominio DUF3509	-1.2912	TGTCTG
PSA3335_RS20995	Proteína con dominio DUF2256	1.1782	TGTCCT

^aEn gris se indican los genes sobreexpresados. En cursiva se indican genes potencialmente expresados en forma de operón.

^bTC, Tasa de cambio

^cÚnicamente se indican las proteínas hipotéticas con cajas AuxRE identificadas.

El gen *hrpL* codifica el principal regulador positivo encargado de la inducción del T3SS y de sus efectores mediante su unión a cajas *hrp* altamente conservadas en las regiones promotoras de los genes del T3SS (Xie et al., 2019). Sin embargo, no se identificaron cambios en la expresión de otros genes reguladores, estructurales o codificadores de efectores del T3SS.

Por último, también se identificó la represión de genes implicados en la replicación, mutación y reparación del DNA, transporte o en la formación del pilus, así como genes relacionados con el sistema de secreción tipo II (T2SS) y el T4SS. Además, entre los genes reprimidos también destaca la identificación de RNA no codificantes, como los RNA de transferencia (tRNA) de leucina, serina y tirosina, o los pequeños RNA (sRNA). Utilizando la herramienta CopraRNA (Wright et al., 2014) se analizaron posibles genes diana de

interacción del sRNA. En la Tabla 4 se muestran los 10 genes identificados por CopraRNA como posibles mRNA dianas del sRNA PSA3335_RS20795.

Tabla 4. Genes potencialmente regulados por el gen PSA3335_RS20795, un pequeño RNA reprimido en Psv *ΔiaaMH1-2*.

ID	p-value	Energía (kcal/mol)	Posición mRNA	Posición sRNA	log ₂ (TC) ^a	Anotación
PSA3335_RS16330	0.0017	-11.47	220 -- 246	32 -- 59	0.2075	Regulador transcripcional LysR
PSA3335_RS16395	0.0028	-15.69	163 -- 192	32 -- 61	-0.1425	acetil-CoA carboxilasa
PSA3335_RS05625	0.0072	-8.96	22 -- 42	15 -- 38	0.3416	KpsF/GutQ azucar-fosfato isomerasa Proteína
PSA3335_RS06975	0.0076	-4.57	89 -- 125	28 -- 63	0.0540	transportadora hierro-sulfato
PSA3335_RS17405	0.0080	-12.02	165 -- 185	34 -- 57	0.0833	hidroximetilglutaril-CoA liasa
PSA3335_RS09970	0.0089	-9.96	208 -- 217	88 -- 97	-0.9904	Sensor histidina quinasa (PAS)
PSA3335_RS05010	0.0119	-10.40	1 -- 20	62 -- 84	0.0667	Carbamoil fosfato sintasa
PSA3335_RS14090	0.0138	-4.32	62 -- 78	40 -- 54	0.1937	Subunidad oxidoreductasa NADH-quinona
PSA3335_RS06310	0.0149	-10.89	267 -- 291	34 -- 56	-0.2558	Transportador MFS
PSA3335_RS17790	0.0227	-5.39	221 -- 227	91 -- 97	0.0944	Transportador ABC

^aVariación de la expresión en el análisis por RNAseq de los genes identificados por CopraRNA. En gris se indican los genes cuya expresión varía de manera significativa en la cepa Psv *ΔiaaMH1-2*. TC, tasa de cambio.

Entre las dianas identificadas destacan reguladores transcripcionales de la familia LysR, transportadores MFS y ABC o genes relacionados con el metabolismo. Además, también se identificó una posible diana de este sRNA, cuyo gen esta implicado en la transducción de señales. Por otro lado, se analizó la variación de la expresión de los genes diana identificados por CopraRNA en la cepa Psv *ΔiaaMH1-2*. No se identificaron cambios significativos en la expresión de los diferentes genes, a excepción del gen que codifica una proteína sensora histidina quinasa con dominios funcionales PAS, el cual, al igual que el sRNA, disminuye su expresión en un ambiente de baja concentración de IAA (Tabla 4).

Identificación de cajas AuxRE en genes diferencialmente expresados en Psv *ΔiaaMH1-2*

La presencia de cajas AuxRE en las regiones promotoras de plantas ha sido ampliamente estudiada y relacionada con la regulación por IAA (Dharmasiri et al., 2005; Hagen and Guilfoyle, 2002; Ulmasov et al., 1995; 1997).

Sin embargo, en bacterias únicamente se ha descrito la presencia de estas cajas AuxRE en la región promotora del gen *ipdC* de *A. brasiliense* y de los genes *iaaM*, *matE* e *iaaL* de Psn ESC23, todos ellos implicado en el metabolismo del IAA (Cerboneschi et al., 2016; Lambrecht et al., 1999). Las cajas AuxRE identificadas en la región promotora de estos genes son secuencias cortas de 6 nucleótidos, siendo TGTCCC el motivo presente en el promotor del gen *ipdC* y TGTCCA el motivo identificado en el promotor de todos los genes descritos en Psn ESC23. Por lo tanto, con el fin de analizar si la variación en la expresión génica debida a la disminución de la concentración de IAA en la cepa Psv *ΔiaaMH1-2* se relaciona con la codificación de cajas de regulación AuxRE, se analizó la región promotora de estos genes. Para ello, se analizó manualmente la presencia de cajas AuxRE en las 500 pb aguas arriba del inicio de los genes, para los expresados en forma de operón, únicamente se analizó la presencia de la caja en el gen situado en primera posición. De los 14 genes sobreexpresados en ausencia de IAA, 7 de ellos se expresaban individualmente o estaban situados en la primera posición del operón. De estos 7 promotores, se identificó la presencia de cajas de regulación AuxRE en 6 de ellos (Tabla 3). Por otro lado, 35 de los 39 genes reprimidos en presencia de IAA, se expresaron individualmente o estaban situados en la primera posición del operón. De los 35 promotores analizados se identificó la presencia de cajas AuxRE en 14 de ellos (Tabla 3). En total se identificaron 9 cajas AuxRE diferentes, siendo TGTCTGA la única secuencia común presente en el promotor de los genes sobreexpresados y reprimidos. En la Figura 3 se muestra una representación esquemática de la secuencia consenso (TGTCNN) identificada en el promotor de los genes sobreexpresados (Figura 3A) y reprimidos (Figura 3B).

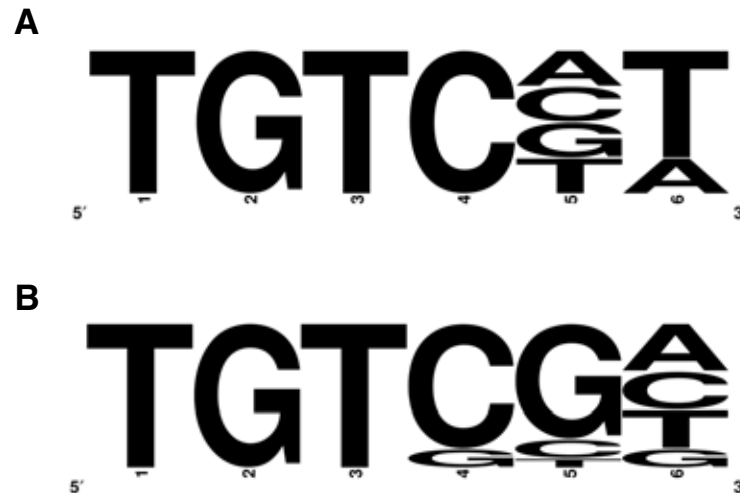


Figura 3. Representación de la variación en la secuencia de nucleótidos de los motivos AuxRE identificados en los genes sobreexpresados **(A)** o reprimidos **(B)** en *Psv ΔiaaMH1-2*. Los números indican la posición correspondiente para cada nucleótido en sentido 5'-3'.

La adición de IAA exógeno modifica la expresión de genes en *Psv* NCPPB 3335

El procesado de las lecturas y la selección de los genes expresados diferencialmente en medio HRP con y sin 1 mM de IAA se realizó tal y como se ha descrito en el apartado anterior, los resultados se muestran en la Figura 4A. En total se identificaron 567 genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico comparativo, con 213 genes sobreexpresados y 354 genes reprimidos en presencia de IAA exógeno (Figura 4B). La función principal de los genes identificados se analizó utilizando el software Sma3s.v2 (Casimiro-Soriguer et al., 2017) y, posteriormente, se realizó un enriquecimiento funcional utilizando el paquete de R topGO (Alexa and Rahnenfuhrer, 2020), seleccionándose las categorías que mostraron una probabilidad (*p-value*) inferior a 0.05 (Figura 4C).

La mayoría de los genes sobreexpresados se clasificaron únicamente en tres categorías con un número abundante de genes: biosíntesis de compuestos nitrogenados y genes relacionados con la traducción y el metabolismo de proteínas.

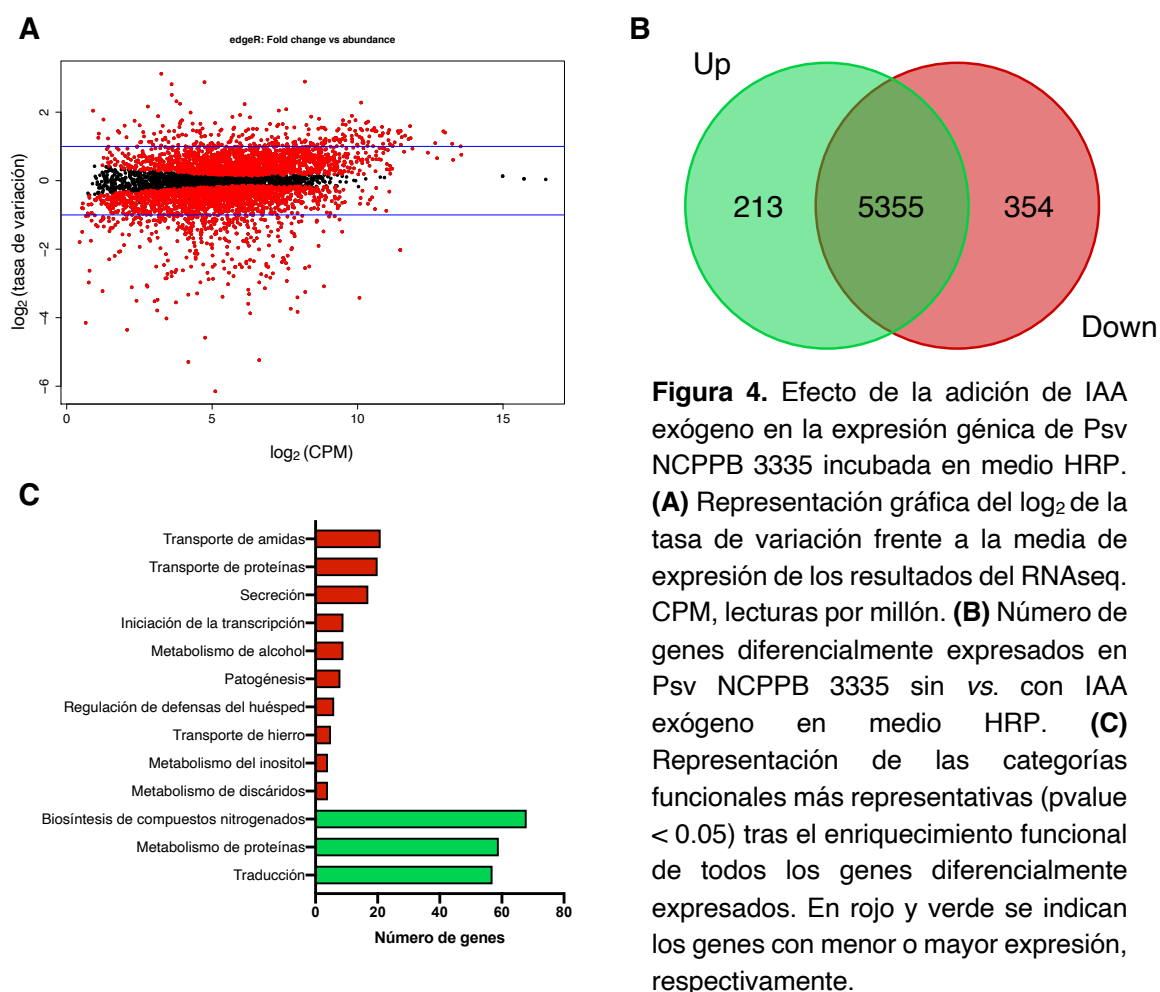


Figura 4. Efecto de la adición de IAA exógeno en la expresión génica de Psv NCPPB 3335 incubada en medio HRP. **(A)** Representación gráfica del \log_2 de la tasa de variación frente a la media de expresión de los resultados del RNAseq. CPM, lecturas por millón. **(B)** Número de genes diferencialmente expresados en Psv NCPPB 3335 sin vs. con IAA exógeno en medio HRP. **(C)** Representación de las categorías funcionales más representativas (p value < 0.05) tras el enriquecimiento funcional de todos los genes diferencialmente expresados. En rojo y verde se indican los genes con menor o mayor expresión, respectivamente.

Por el contrario, los genes reprimidos se clasificaron en múltiples categorías con un número variable de genes, destacando la represión de genes clasificados en las categorías relacionadas con secreción, patogénesis y regulación de las defensas del huésped. Trabajos anteriores realizados en Psv NCPPB 3335 han demostrado una variación de la expresión de determinados genes del T3SS en presencia de IAA, como son los genes *hrpA* y *hrpL* (Aragón et al., 2014). Por lo tanto, el IAA exógeno provoca la represión de múltiples genes relacionados con secreción, sugiriendo una regulación del T3SS a través del IAA.

El IAA exógeno regula la expresión de múltiples genes relacionados con la virulencia en Psv NCPPB 3335

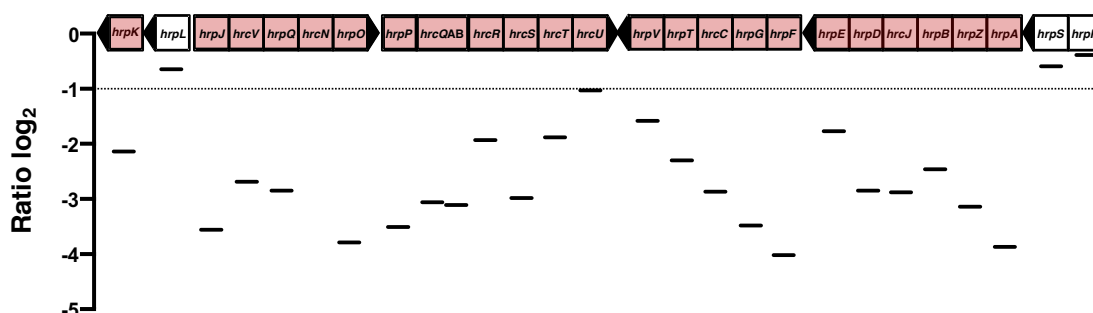
En bacterias patógenas, el IAA se ha descrito como una molécula de señalización capaz de modificar la expresión de múltiples factores de virulencia, como el T3SS y el T6SS o QS (Chalupowicz et al., 2009; Van Puyvelde et al., 2011). Con el fin de obtener una visión integrada de la regulación de los diferentes factores de virulencia descritos en Psv NCPPB 3335 provocada por el IAA, se analizó manualmente el efecto del IAA en la expresión de genes relacionados con estos factores (Caballo-Ponce et al., 2017a). Entre los factores de virulencia analizados, se identificaron cambios en la expresión de genes relacionados con la producción de la fitohormona citoquinina y fitotoxinas, elementos del T3SS y genes relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos presentes en la región genómica denominada WHOP (del inglés, *Woody Host and Pseudomonas*).

Sin embargo, no se identificaron cambios en la regulación de genes relacionados con la producción de IAA, metabolismo del diGMP cíclico, QS o elementos del T4SS y T6SS.

La presencia de IAA exógeno en el medio provocó variaciones en la expresión de la mayor parte de los genes *hrp* (del inglés, *hypersensitive response and pathogenicity*) y *hrc* (del inglés, *hypersensitive response and conserved*) constituyentes del T3SS. De los 27 genes que forman estos grupos, 24 de ellos mostraron una tasa de cambio inferior a -1, indicando una represión generalizada del T3SS en presencia de IAA (Figura 5A; Tabla 5). Además, los 24 genes reprimidos estaban constituidos únicamente por genes estructurales del T3SS, con la excepción de *hrpK*, el cual se encuentra junto al conjunto de genes *hrp/hrc*, y cuya función es desconocida. Por último, los genes reguladores del T3SS *hrpL* (-0.65), *hrpR* (-0.28) y *hrpS* (-0.59), mostraron una tendencia a disminuir su expresión en presencia de IAA, pese mostrar una tasa de cambio superior a -1 y no mostrar una disminución significativa de su expresión.

A

Sistema de secreción tipo III



B

Región WHOP

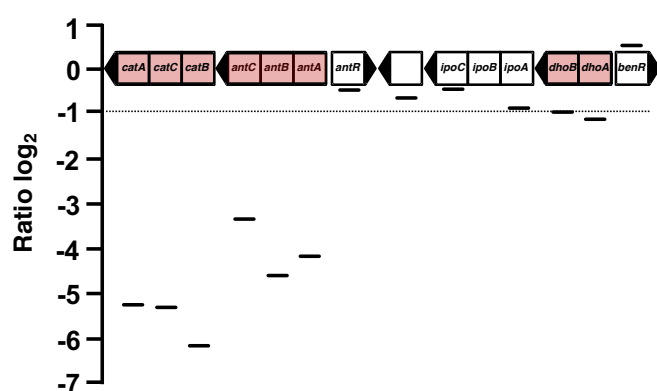


Figura 5. Representación gráfica de la variación de la expresión de los genes del sistema de secreción tipo III (A) y de la región WHOP (B). En rojo se indican genes reprimidos y en blanco genes cuya expresión no se ve alterada. Las líneas indican el \log_2 de la tasa de cambio obtenida para cada gen.

Por otro lado, en Psv NCPPB 3335 se han identificado la presencia de 31 proteínas efectoras del T3SS (Moreno-Pérez et al., 2020). En presencia de IAA exógeno, únicamente se modificó el perfil de expresión de 4 de estos genes (*avrPto1*, *hopAA1*, *hopM1* y *hopAE1*), los cuales mostraron una tasa de cambio inferior a -1 (Tabla 5). Además, también se identificaron cambios en la expresión de genes asociados al T3SS, como *hrpW*, un gen que codifica una proteína translocadora encargada de ayudar en el proceso de translocación de efectores, o los genes *shcA* y *shcV*, unas chaperonas que facilitan el proceso de a la translocación de efectores (Tabla 5).

En presencia de IAA exógeno, los genes que forman parte de la región genómica denominada WHOP (del inglés, *Woody Host and Pseudomonas*) e implicada en el metabolismo de compuestos aromáticos, también vieron alterados sus niveles de expresión (Figura 5B, Tabla 5). La región, formada principalmente por 4

operones, mostró una represión significativa de los genes que forman parte de los operones *catBCA*, *antABC* y *dhoAB* en presencia de IAA. Sin embargo, los niveles de expresión de los genes del operón *ipoABC* no se vieron alterados. De manera similar a lo obtenido en el T3SS, no se modificó la expresión de los genes reguladores *antR* o *benR*, como suele ocurrir por la expresión constitutiva de muchos genes reguladores de operones catabólicos.

Además del T3SS y la región WHOP, el IAA exógeno también reprimió la expresión de los genes *rtxA* y *rtxC*, encargados de la biosíntesis de la fitotoxina rizobitoxina. Por último, el gen *ptz*, implicado en la biosíntesis de citoquininas, aumentó de manera significativa su expresión.

Tabla 5. Genes de virulencia expresados diferencialmente en Psv NCPPB 3335 en presencia de IAA exógeno.

ID	Gen	Log2 ratio	ID	Gen	Log2 ratio
T3SS			Efectores T3SS		
PSA3335_RS10545	<i>hrpR</i>	-0.28	PSA3335_RS01620	<i>avrPto1</i>	-1.03
PSA3335_RS10550	<i>hrpS</i>	-0.59	PSA3335_RS10490	<i>hopAA1</i>	-2.45
PSA3335_RS10555	<i>hrpA</i>	-3.87	PSA3335_RS10525	<i>hopM1</i>	-1.25
PSA3335_RS10560	<i>hrpZ</i>	-3.14	PSA3335_RS24240	<i>hopAE1</i>	-1.20
PSA3335_RS10565	<i>hrpB</i>	-2.46	Proteínas asociadas al T3SS		
PSA3335_RS10570	<i>hrcJ</i>	-2.88	PSA3335_RS10495	<i>hrpW1</i>	-1.68
PSA3335_RS10575	<i>hrpD</i>	-2.85	PSA3335_RS10690	<i>shcA</i>	-1.35
PSA3335_RS10580	<i>hrpE</i>	-1.77	PSA3335_RS15920	<i>shcV</i>	-2.08
PSA3335_RS10585	<i>hrpF</i>	-4.02	Región WHOP		
PSA3335_RS10590	<i>hrpG</i>	-3.48	PSA3335_RS13075	<i>antA</i>	-5.239
PSA3335_RS10595	<i>hrcC</i>	-2.87	PSA3335_RS13080	<i>antB</i>	-5.295
PSA3335_RS10600	<i>hrpT</i>	-2.30	PSA3335_RS13085	<i>antC</i>	-6.152
PSA3335_RS10605	<i>hrpV</i>	-1.58	PSA3335_RS13100	<i>catA</i>	-3.328
PSA3335_RS10620	<i>hrcU</i>	-1.03	PSA3335_RS13090	<i>catB</i>	-4.584
PSA3335_RS10625	<i>hrcT</i>	-1.88	PSA3335_RS13095	<i>catC</i>	-4.157
PSA3335_RS10630	<i>hrcS</i>	-2.98	PSA3335_RS13070	<i>antR</i>	-0.342
PSA3335_RS10635	<i>hrcR</i>	-1.93	PSA3335_RS13065	<i>PSA3335_3206</i>	-0.796
PSA3335_RS10640	<i>hrcQB</i>	-3.11	PSA3335_RS13060	<i>ipoC</i>	-0.442
PSA3335_RS10645	<i>hrcQA</i>	-3.06	PSA3335_RS13055	<i>ipoB</i>	NA
PSA3335_RS10650	<i>hrpP</i>	-3.51	PSA3335_RS13050	<i>ipoA</i>	-0.860
PSA3335_RS10655	<i>hrpO</i>	-3.79	PSA3335_RS13045	<i>dhoB</i>	-0.947
PSA3335_RS10660	<i>hrcN</i>	NA	PSA3335_RS13040	<i>dhoA</i>	-1.115
PSA3335_RS10665	<i>hrpQ</i>	-2.85	PSA3335_RS13035	<i>benR</i>	0.113
PSA3335_RS10670	<i>hrcV</i>	-2.69	Otros		
PSA3335_RS10675	<i>hrpJ</i>	-3.56	PSA3335_A0024	<i>ptz</i>	1.352
PSA3335_RS10680	<i>hrpL</i>	-0.65	PSA3335_RS08630	<i>rtxA</i>	-1.692
PSA3335_RS10685	<i>hrpk</i>	-2.14	PSA3335_RS08625	<i>rtxC</i>	-1.545

DISCUSIÓN

En este trabajo, se ha analizado el efecto del IAA en la expresión génica de Psv NCPPB 3335, diferenciando entre el IAA producido por ella misma (IAA endógeno) y el IAA añadido al medio de cultivo (IAA exógeno).

Papel del IAA endógeno en el transcriptoma de *P. savastanoi*

Trabajos anteriores, han demostrado que la pérdida de función por mutación en los genes *iaaM* e *iaaH* (Psv $\Delta iaaMH1-2$), implicados en la biosíntesis de IAA en Psv NCPPB 3335, reducía de manera severa los niveles de IAA producidos por esta bacteria (Aragón et al., 2014), condiciones que se han reproducido en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

En el capítulo anterior, se comprobó que las condiciones de cultivo en medio MG empleadas resultaban adecuadas para identificar cambios en la expresión de ciertos genes. Por lo tanto, el efecto de regulación provocado por la producción de IAA endógeno se analizó comparando el perfil transcriptómico de la cepa Psv NCPPB 335 frente al de la cepa mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ en medio de cultivo MG. En total se han identificado 53 genes expresados de manera diferencial en la cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$ respecto a Psv NCPPB 3335. Entre los genes seleccionados, como cabía esperar, se identificaron los genes *iaaM* e *iaaH*, junto a un gen anotado como aldehído deshidrogenasa, los cuales mostraron una menor expresión en la cepa mutante. Los genes codificadores de aldehído deshidrogenasas, ampliamente distribuidos en los genomas bacterianos, están implicados en multitud de procesos, entre los que destaca un papel relevante en la producción de IAA, transformando el IAAld en IAA y participando en múltiples rutas (McClerklin et al., 2018; Xie et al., 2005) (Capítulo 2). Además, cabe destacar que el gen aldehído deshidrogenasa identificado en este análisis (PSA3335_RS10130), también fue identificado en el análisis transcriptómico llevado a cabo en la cepa mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ en presencia de Trp en el medio de cultivo MG (Capítulo 2). En medio suplementado con Trp, los niveles de IAA producidos por Psv $\Delta iaaMH1-2$ son superiores, provocando su sobreexpresión (Capítulo 2), mientras que en condiciones de baja concentración

de IAA se produciría la represión de éste (Tabla 3). Por lo tanto, aunque desconocemos su papel en el metabolismo del IAA, este gen presenta una expresión diferencial en base a la cantidad de de Trp e IAA presentes en el medio, sugiriendo que podría estar potencialmente implicado en la biosíntesis de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*.

Los genes anotados como proteínas hipotéticas, con función desconocida o genes relacionados con el metabolismo, fueron las categorías donde se englobaron un mayor número de genes (Figura 4). La identificación de un elevado número de genes metabólicos alterados, posiblemente esté relacionada con la adaptación del metabolismo de la cepa mutante Psv *ΔiaaMH1-2* al nuevo entorno provocado por la disminución de la concentración de IAA. Además, entre los genes metabólicos destacó la sobreexpresión de genes anotados como oxidoreductasas NADP dependientes. Trabajos recientes, han identificado proteínas NADP dependientes con actividad aldehído deshidrogenasa, por lo que podrían estar contribuyendo a la producción de IAA en Psv *ΔiaaMH1-2*, actuando como aldehído deshidrogenasas pese a mantener una función principal diferente (Koppaka et al., 2012; Napora-Wijata et al., 2014) (Capítulo 2).

Junto a la variación en la expresión en genes metabólicos, también se identificaron genes no codificantes con un perfil de expresión modificado en Psv *ΔiaaMH1-2*. Entre ellos destaca un sRNA (PSA3335_RS20795) que podría realizar una regulación postranscripcional de los 10 genes cuyos mRNA diana fueron identificados mediante el software CopraRNA (Tabla 4). En bacterias, a menudo el alineamiento de un sRNA con el mRNA diana no es completamente exacto, permitiéndose de esta forma la regulación simultánea de múltiples genes diana (Waters and Storz, 2009). Además, entre los genes potencialmente regulados por este sRNA destacan varios genes reguladores, como un regulador transcripcional LysR o un sensor histidina quinasa con dominio PAS, los cuales podrían a su vez regular otros genes, lo que se ha sugerido en trabajos anteriores en los que se ha demostrado que un solo sRNA puede regular directamente

múltiples genes, debido a efectos pleiotrópicos (Gottesman et al., 2006). Por otro lado, aunque también se identificaron genes metabólicos o transportadores como posibles dianas del sRNA, no se observaron grandes variaciones en la expresión de éstos en el análisis transcriptómico (Tabla 4). Sin embargo, esto no es sorprendente, ya que el sRNA hibridaría con el mRNA, provocando una regulación postranscripcional e impidiendo observar cambios en la cantidad de mRNA de los genes diana, sino en la cantidad de proteína presente. Únicamente se observó un aumento de la expresión del gen PSA3335_RS09970, codificante del sensor histidina quinasa, el cual podría estar regulado por IAA a través del sRNA, ya que la ausencia de IAA en el medio provocaría la represión del sRNA, el cual cesaría su regulación negativa sobre el gen PSA3335_RS09970 y este aumentaría sus niveles de expresión. Además, el sRNA se encuentra altamente conservado en multitud de cepas del complejo *P. syringae*, sugiriendo un papel clave en la regulación por IAA en estas bacterias (datos no mostrados). Sin embargo, el grado de conservación de este sRNA no es sorprendente, ya que muchos RNA no codificantes presentes en *Pseudomonas* se encuentran conservados (Livny, 2006). Además, el sRNA identificado en Psv *ΔiaaMH1-2* se encuentra indirectamente influenciado por el regulador global de respuesta GacA, ya que su expresión se encuentra alterada en una cepa mutante de Psv NCPPB 3335 en el gen *gacA* (Carla Lavado, comunicación personal). El sRNA llamado *RgsA*, ampliamente estudiado en *Pseudomonas aeruginosa*, tiene una expresión dependiente del factor sigma RpoS y, al igual que el sRNA identificado en este trabajo, de GacA (González et al., 2008). Por lo tanto, el IAA podría estar desempeñando un papel clave en el control de la expresión de genes, actuando como un factor esencial para la correcta expresión génica.

Por otro lado, la reducción del IAA intracelular también modifica la expresión de diferentes reguladores transcripcionales, como la represión de reguladores de la familia LysR o la sobreexpresión de los genes *hrpR* y *hrpS*, reguladores del T3SS. Estos genes, producen las proteínas HrpR y HrpS, las cuales forman un heterodímero capaz de activar la transcripción del gen *hrpL*, el cual a su vez regula la expresión de múltiples genes relacionados con el T3SS, como genes

estructurales o proteínas efectoras (Xie et al., 2019). Sin embargo, en el análisis transcriptómico realizado en este trabajo no se detectó un aumento en la expresión del gen *hrpL* y otros genes relacionados con el T3SS. Además del heterodímero HrpRS, la expresión del gen *hrpL* requiere, entre otros factores, la presencia de un factor sigma denominado *rpoN* (PSA3335_RS05600), el cual no presenta alterados sus niveles de expresión (0.15) en Psv *ΔiaaMH1-2* (Xie et al., 2019). Por lo tanto, pese a estar inducida la expresión de los genes *hrpR* y *hrpS*, los niveles de expresión del gen *rpoN* podrían no ser suficientes para lograr la inducción del gen *hrpL* y la consecuente activación del T3SS. Además, el gen *hrpL* también se encuentra regulado por las condiciones ambientales, por lo que para lograr una activación completa del T3SS y sus efectores, es necesario que las condiciones de cultivo sean similares al apoplásto de la planta, las cuales se imitan de manera satisfactoria empleando el medio de cultivo HRP (Huynh et al., 1989).

La variación de la expresión de los reguladores *hrpR* y *hrpS* indica que el IAA endógeno estaría actuando al nivel de estos reguladores, aunque no se observan cambios en la expresión de más genes de T3SS ya que sería necesaria la activación de otros factores.

En resumen, la disminución de los niveles de IAA en Psv NCPPB 3335, modifica la expresión génica en esta bacteria. Sin embargo, únicamente se alteró la expresión de aproximadamente un 0.9% del genoma de Psv NCPPB 3335, siguiendo una tendencia similar a la observada para *A. brasilense*, donde la comparativa de la variación de la expresión génica entre la cepa silvestre y un mutante en el gen *ipdC*, productor de una baja concentración de IAA, provocó una alteración del 2.63% del genoma de *A. brasilense* (Van Puyvelde et al., 2011). Además, es posible que la menor tasa de variación observada en Psv *ΔiaaMH1-2*, se deba a que la producción basal de IAA presente en esta cepa, sea aún suficiente para mantener la regulación interna producida por el IAA. Por lo tanto, el trabajo realizado en el Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral, donde se aborda la construcción de un mutante de producción cero de IAA en Psv

ΔiaaMH1-2, sería esencial para identificar todos los genes regulados por auxinas.

Por otro lado, el mecanismo de regulación de estos genes en respuesta a IAA aún no está claro, aunque múltiples son los trabajos que han demostrado que el IAA produce cambios en el transcriptoma bacteriano (Malhotra and Srivastava, 2008; Yang et al., 2007; Yuan et al., 2008). Posiblemente, el IAA regule la expresión génica mediante ARFs capaces de controlar la expresión de determinados genes (Hagen and Guilfoyle, 2002).

En este trabajo, se ha identificado la presencia de hasta 11 secuencias AuxRE diferentes en la región promotora de múltiples genes cuya expresión estaba alterada en Psv *ΔiaaMH1-2* (Tabla 3; Figura 3). Hasta la fecha, la caja AuxRE del gen *ipdC* de *A. brasilense* es la única que se ha relacionado con la respuesta a auxinas (Lambrecht et al., 1999). Además, en Psn ESC23 también se ha propuesto que la presencia de cajas AuxRE en el promotor de los genes *iaaM* e *iaaL*, relacionados con la síntesis y conjugación del IAA, respectivamente, podría permitir la regulación de éstos. Sin embargo, en Psv NCPPB 3335 no solo se ha identificado la presencia de cajas AuxRE en uno de los operones formados por el gen *iaaM* y el gen *iaaH*, sino que también se han identificado en los genes *hrpR* y *hrpS*, implicados en la regulación del T3SS. Por lo tanto, la identificación de cajas AuxRE en genes no relacionados con la producción de IAA, sugiere la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcriptómico, provocado por el IAA y mediado por estas secuencias AuxRE y que posiblemente esté presente en otras bacterias productoras de IAA. Por último, la presencia de cajas AuxRE variables en su secuencia (TGTCNN), sugiere una regulación de la expresión de los diferentes genes provocada por el IAA en función de la afinidad de las proteínas reguladoras con la caja AuxRE, ya que, por ejemplo, los promotores de los genes reprimidos estaban enriquecidos en la secuencia TGTCGN (Tabla 3; Figura 3).

Por lo tanto, para continuar profundizando en el papel del IAA en la regulación de otros genes no relacionados con el metabolismo del IAA, sería necesario realizar una búsqueda bioinformática global de la presencia de estas cajas AuxRE en la región promotora de los genes de Psv NCPPB 3335, así como ampliar la búsqueda de secuencias a otras bacterias productoras de IAA.

IAA Exógeno en la regulación de *P. savastanoi*

La evaluación del efecto exógeno del IAA en el transcriptoma de Psv NCPPB 3335 se analizó mediante la adicción de IAA, seleccionando una concentración de 1 mM, de acuerdo con trabajos anteriores realizados en Psv (Aragón et al., 2014). Además, en trabajos anteriores realizados en *E. coli*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti* y *A. brasilense* para conocer el efecto del IAA exógeno sobre su transcriptoma, se emplearon concentraciones de IAA comprendidas entre los 0.5 – 1 mM (Bianco et al., 2006a; Bianco et al., 2006b; Imperlini et al., 2009; Van Puyvelde et al., 2011; Yuan et al., 2008). La concentración de IAA utilizada, contrasta con la concentración fisiológica de IAA producida por Psv NCPPB 3335 (0.19 mM de IAA) en medio de cultivo (Capítulo 2). Sin embargo, aunque aparentemente las concentraciones de IAA utilizadas en estos trabajos son más elevadas que las detectadas en el tejido tumoral de plantas de olivo (0.13 mM de IAA), resultan similares a las concentraciones de IAA locales (en el rango milimolar) detectadas en el tejido foliar de otras plantas, como las leguminosas (Epstein, 1982; Figueiredo et al., 2007). Además, los niveles de IAA experimentados por Psv NCPPB 3335 en el interior del tumor podrían ser más elevados de los producidos por ella misma, ya que en el interior de los tumores producidos por Psv en plantas de olivo, se ha demostrado la presencia de un microbioma complejo, formado principalmente por *P. savastanoi* y *P. agglomerans*, junto con aislados de *E. toletana* y *E. oleae*, todas ellas productoras de IAA (Marchi et al., 2006; Moretti et al., 2011; Rojas et al., 2004).

La exposición de Psv NCPPB 3335 a IAA exógeno alteró la expresión de aproximadamente un 10% del genoma (Figura 4), un número de genes alterados mayor que el obtenido en *A. brasilense* (6.1%), aunque inferior que el obtenido

en *B. japonicum* (15.5%) (Donati et al., 2013; Van Puyvelde et al., 2011). En general, se alteró la expresión de genes relacionados con el metabolismo de proteínas, encontrándose un elevado número de genes sobreexpresados relacionados con la traducción de proteínas, así como una gran cantidad de genes reprimidos implicados en el transporte de proteínas. En *A. brasilense*, también se identificaron modificaciones de la expresión de genes asociados con el metabolismo de proteínas en presencia de IAA exógeno (Van Puyvelde et al., 2011).

Sin embargo, el papel principal del IAA durante el proceso de infección por Psv NCPPB 3335 podría ser la modulación de la virulencia del patógeno. En este Capítulo, además de demostrar que el IAA exógeno provoca cambios generales en el transcriptoma de Psv NCPPB 3335, también es capaz de regular la expresión de genes clave en el proceso de virulencia de Psv, como genes relacionados con el T3SS, catabolismo de compuestos aromáticos y otros genes relacionados con la producción de fitohormonas (Tabla 5). Al igual que en trabajos anteriores, nuestros resultados han demostrado el efecto negativo sobre la expresión de genes relacionados con el T3SS provocado por la adición de IAA exógeno en *P. savastanoi* NCPPB 3335 (Aragón et al., 2014). La ausencia de cambio en la expresión de los elementos reguladores del T3SS (*hrpL*, *hrpR* y *hrpS*) contrasta con la fuerte represión observada en todos sus elementos estructurales (Tabla 6). Además, pese a identificarse variaciones en la expresión de los genes *hrpR* y *hrpS* en la cepa mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ (baja concentración de IAA endógeno), no se alteró la expresión de éstos en presencia de IAA exógeno, pese a encontrarse en medio de inducción HRP. Esto sugiere que los mecanismos moleculares de regulación utilizados por el IAA endógeno producido por Psv y el IAA exógeno detectado por la bacteria podrían ser independientes.

Los genes presentes en la región WHOP muestran un comportamiento similar al descrito anteriormente en el T3SS, sugiriendo que el IAA podría llevar a cabo una regulación directa y global de los genes presentes en estas regiones,

independientemente de los reguladores transcripcionales descritos hasta la fecha para estos factores de virulencia, indicando la existencia de nuevas vías de regulación presentes en estas bacterias y mediadas por IAA.

En resumen, la presencia de IAA exógeno parece estar afectando directamente la expresión de genes relacionados con factores de virulencia de Psv NCPPB 3335, quedando patente que Psv tiene la capacidad de percibir los niveles de IAA presentes en el exterior celular, producidos por ella misma o por la planta, induciendo cambios en la regulación de otros genes de virulencia.

Además de confirmar el papel del IAA como molécula señal, el análisis transcriptómico sugiere que este podría llevar a cabo un control coordinado y secuencial de la expresión de los diferentes genes de virulencia. El IAA podría jugar un papel principal en el proceso de infección, ya que el producido por la planta podría participar en la atenuación de la virulencia de Psv, provocando la represión, entre otros factores, de genes del T3SS y de la región WHOP, los cuales se han demostrado como claves en el proceso de infección (Caballo-Ponce et al., 2017a). Sin embargo, el IAA producido por Psv y excretado al medio, podría llevar a cabo la regulación secuencial a lo largo del proceso de infección de los diferentes factores de virulencia presentes en Psv. Inicialmente y en una condición de bajos niveles de IAA, la bacteria colonizaría el apoplasto de la planta, activando la expresión de los genes estructurales de T3SS y secretando las proteínas efectoras al interior celular, con el fin de controlar la respuesta de defensa de las plantas (Büttner, 2016; Xin et al., 2018). Los genes *rtxA* y *rtxC* estarían expresados, permitiendo la producción de rizobitoxina. Esta toxina, presente exclusivamente en los aislados de *P. savastanoi* tumorigénicos podría ser esencial en los primeros estadios del proceso de patogénesis, ya que su ausencia en las cepas del patovar fraxini, estaría condicionando el rango de huésped de estas bacterias e impidiendo el desarrollo tumoral (Capítulo 1). Además, los genes presentes en la región WHOP estarían activados, permitiendo la degradación de compuestos aromáticos de tipo lignina presentes en la pared vegetal de la planta, facilitando a la bacteria el acceso a agua y nutrientes suficientes para alcanzar una densidad poblacional elevada (Caballo-

Ponce et al., 2017b). En este punto Psv NCPPB 3335 estaría produciendo IAA, el cual incrementaría los niveles locales de IAA presentes en el tejido infectado provocando cambios en la fisiología de la planta que permitan el desarrollo tumoral. El IAA producido se acumularía en el tejido infectado, permaneciendo en él durante un periodo de tiempo prolongado (O'Donnell et al., 2003; Schmelz et al., 2004). Tras alcanzar los niveles de IAA adecuados, el IAA provocaría la represión de los genes relacionados con el T3SS y los genes presentes en la WHOP. Al mismo tiempo, se produciría la activación del gen *ptz*, induciendo la producción de citoquininas, una fitohormona clave para el desarrollo completo del tumor (Añorga et al., 2020).

Por lo tanto, son necesarios futuros trabajos para profundizar en el estudio de los mecanismos mediante el cual las bacterias fitopatógenas responden frente al IAA, así como para analizar el papel que desempeña el IAA controlando la expresión génica de los diferentes factores de virulencia con el fin de establecer una activación secuencial y eficiente de estos durante el proceso de interacción del patógeno con la planta.

|CAPÍTULO 4|

Variación alélica del gen *iaaL* y biosíntesis de IAA-lisina
en *Pseudomonas savastanoi*

INTRODUCCIÓN

La presencia de un balance correcto de auxinas es fundamental para el crecimiento, el desarrollo y la defensa de las plantas (Naseem et al., 2015). El ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina natural más abundante y su homeostasis esta regulada por una red de procesos relacionados con su biosíntesis, catabolismo, señalización y transporte. En plantas, los niveles de auxinas pueden ser regulados mediante conjugación a aminoácidos y azúcares, o por degradación, permaneciendo disponible únicamente una pequeña cantidad del IAA libre (Ljung, 2013; Normanly, 2010; Ruiz Rosquete et al., 2012). Diversos trabajos, han identificado la presencia de conjugados de IAA con Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Alanina (Ala), Glicina (Gly), Valina (Val) y Leucina (Leu), entre otros, en una amplia variedad de plantas. Algunos de estos, como los conjugados IAA-Ala, IAA-Leu, IAA-Phe e IAA-Val participan en el control de los niveles de IAA disponibles en los tejidos mediante la acción de hidrolasas (LeClere et al., 2002; Rampey et al., 2004). La conjugación de IAA con aminoácidos afecta la distribución de la hormona en la planta y, en consecuencia, a su arquitectura (Yu, 2019). Los genes GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) codifican enzimas que catalizan la formación de conjugados aminoacídicos de IAA. Las diferentes variantes del gen GH3 tienen una especificidad de sustrato ligeramente diferente, contribuyendo a la formación de diferentes tipos de conjugados IAA-aminoácido (Staswick, 2005). Mediante la mutación de estos genes, se ha relacionado el conjugado IAA-Glu con la regulación de los niveles de IAA en el hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*, ya que la mutación de esta enzima disparó los niveles de IAA, reduciendo los de IAA-Glu (Zheng et al., 2016).

En bacterias, la ruta de producción de IAA mejor caracterizada es la ruta de la indol-3-acetamida (IAM), donde las enzimas triptófano-2-monooxigenasa y la IAM hidrolasa, codificadas por los genes *iaaM* e *iaaH*, respectivamente, convierten secuencialmente el triptófano (Trp) a IAM y posteriormente a IAA (Kosuge et al., 1966; Magie et al., 1963). Además, el IAA puede ser metabolizado

mediante la transformación a un conjugado aminoacídico biológicamente menos activo como la 3-indol-acetil- ϵ -L-lisina (IAA-Lys), mediante la acción de la enzima IAA-lisina sintasa, codificada en el gen *iaaL* (Glass and Kosuge, 1986; Hutzinger and Kosuge, 1968). La producción del conjugado aminoacídico IAA-Lys es el único descrito hasta la fecha en bacterias fitopatógenas. La mayoría de las cepas del complejo *P. syringae* poseen el gen *iaaL* en sus genomas y su presencia es independiente de los genes *iaaM* e *iaaH* relacionados con la biosíntesis de IAA, ya que también se encuentran en patógenos incapaces de provocar síntomas hiperplásticos (Glickmann et al., 1998; Xin et al., 2018). En *P. savastanoi*, el número de copias y la ubicación del gen *iaaL* varía entre las diferentes cepas, ya que *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) generalmente contiene dos copias cromosómicas del gen *iaaL*, mientras que cepas de *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) muestran una codificación plasmídica (Matas et al., 2009). Mediante análisis comparativo de secuencias se ha determinado la presencia de 3 variantes alélicas del gen *iaaL*, el alelo *iaaL*_{Psn}, *iaaL*_{Psv} e *iaaL*_{Pto}, descritos en cepas de Psn y Psv, Psv y *P. syringae* pv. *tomato* (Pto), respectivamente. Además, se ha identificado la presencia de un número variable de repeticiones de 3 nucleótidos (TAC) en el alelo *iaaL*_{Psv} codificado en diferentes cepas, así como de una delección de 9 residuos en el extremo N-terminal del alelo *iaaL*_{Psn} de Psv NCPPB 3335. Basados en la presencia de estas repeticiones, se han desarrollado métodos de detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción que permiten la diferenciación de los tres alelos (Matas et al., 2009).

Hasta la fecha, la capacidad de los diferentes alelos para sintetizar el conjugado IAA-Lys es desconocida. Únicamente se ha detectado IAA-Lys en el sobrenadante de aislados de Psn, mientras que este compuesto no pudo ser detectado en el cultivo de cepas de Psv (Evidente et al., 1985). Además, trabajos recientes han demostrado la incapacidad de producir IAA-Lys por parte de un mutante de Psn ESC23 en el alelo *iaaL*_{Psn} (Tegli et al., 2020). Sin embargo, se desconoce la importancia de la producción de IAA-Lys durante el proceso de patogénesis, ya que la construcción de cepas mutantes de estos alelos arroja resultados contradictorios en la evaluación de su implicación en virulencia.

Mientras que un mutante de Psn PB213 en el alelo *iaaL*_{Psn} obtenido por inserción de un transposón Tn5 provocaba una atenuación de la virulencia en adelfa, un mutante de este alelo en Psn ESC23 mostró un fenotipo hipervirulento (Cerboneschi et al., 2016; Glass and Kosuge, 1988). Por otro lado, la delección del alelo *iaaL*_{Pto} en Pto DC3000 provocó una reducción de su virulencia en tomate (Castillo-Lizardo et al., 2015).

En bacterias, se ha sugerido que la conversión de IAA a IAA-Lys desempeña un papel relevante en la regulación dinámica del contenido de IAA en el sitio de infección (Cerboneschi et al., 2016). De hecho, la expresión de genes bacterianos, como los genes *iaaM* e *iaaL*, se ha utilizado para controlar la producción de IAA en plantas. Utilizando un promotor constitutivo y el gen *iaaL*_{Psn}, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco cuyos niveles de IAA estaban severamente reducidos, observándose cambios en la dominancia apical, reducción del enraizamiento e inhibición de la diferenciación vascular (Romano et al., 1991). Además, el gen *iaaL* se ha empleado en la modificación específica y local de la producción de IAA en diferentes tejidos de la planta, controlando la expresión del gen utilizando promotores específicos (Basu et al., 2013; Olatunji et al., 2017; Weijers et al., 2005). Por lo tanto, el análisis de las diferentes variantes del gen *iaaL* presentes en *P. savastanoi* podría ofrecer una excelente oportunidad para diseñar nuevas herramientas dirigidas al control de los niveles de IAA en plantas.

Junto al gen *iaaL*, la mayoría de las cepas del complejo *P. syringae* codifican aguas arriba un transportador de la familia MATE (gen *matE*). En Pto DC3000 la transcripción de estos genes puede producirse de manera independiente o en forma de operón. La delección de este gen en Pto DC3000 también provocó una reducción de la virulencia en plantas de tomate (Castillo-Lizardo et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado la implicación del transportador MATE en la virulencia de Psn ESC23 (Tegli et al., 2020). Por lo tanto, durante el proceso de patogénesis, se produciría una regulación de los niveles de IAA libre en los tejidos mediante su conversión al conjugado IAA-Lys o a la actividad de los

transportadores MATE que participarían en la expulsión de estos compuestos al medio.

En este capítulo, gracias al avance en las tecnologías de secuenciación que han permitido obtener un número elevado de genomas de cepas incluidas en el complejo *P. syringae*, se ha llevado a cabo un análisis de la distribución del gen *iaaL* en este complejo, prestando especial atención a las cepas de *P. savastanoi*. Además, se han realizado ensayos para verificar la funcionalidad, así como la capacidad de producción de IAA-Lys, de las diferentes variantes alélicas del gen *iaaL*, incluido un nuevo alelo (*iaaL_{Psf}*) no descrito anteriormente y codificado en cepas de *P. savastanoi* pv. *fraxini* (Psf). Por último, se ha analizado la producción de otros conjugados aminoacídicos de IAA en *P. savastanoi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas se cultivaron a 28 °C (cepas de *P. savastanoi*) o 37 °C (cepas de *Escherichia coli*) en medio de cultivo lisogénico (LB) (Bertani, 1951) o medio de cultivo súper óptimo (SOB) (Hanahan, 1983). Además, las cepas de *P. savastanoi* se cultivaron en medio mínimo manitol-glutamato (MG) suplementado con citrato férrico (10 g/L de manitol, 2 g/L de ácido L-glutámico, 0.5 g/L de KH_2PO_4 , 0.2 g/L de NaCl, 0.2 g/L de MgSO_4 , pH 7) (Bronstein et al., 2008). Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se indican en la Tabla 1. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con Kanamicina (Km) 10 $\mu\text{g/ml}$ para *Pseudomonas* y 50 $\mu\text{g/ml}$ para *E. coli*.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa ^a	Características relevantes ^b	Referencia
<i>Pseudomonas</i>		
Psv NCPPB 3335	Cepa silvestre (<i>Olea europaea</i>)	(Pérez-Martínez et al., 2007)
Psv Δ iaaMH1-2	Doble mutante por deleción de los operones <i>iaaMH1</i> e <i>iaaMH2</i>	(Aragón et al., 2014)
Psv DAPP-PG772	Cepa silvestre (<i>Olea europaea</i>)	(Hosni et al., 2011)
Psn ESC23	Cepa silvestre (<i>Nerium oleander</i>)	(Tegli et al., 2011)
Psn CFBP 5067	Cepa silvestre (<i>Nerium oleander</i>)	(Janse, 1991)
Psf NCPPB 1006	Cepa silvestre (<i>Fraxinus excelsior</i>)	(Janse, 1981)
Psf CFBP 5062	Cepa silvestre (<i>Fraxinus excelsior</i>)	(Janse, 1991)
Psr CECT 4861	Cepa silvestre (<i>Retama sphaerocarpa</i>)	(Alvarez et al., 1998)
Psm Ph3	Cepa silvestre (<i>Mandevilla</i> spp.)	(Eltlbany et al., 2012)
Pto DC3000	Cepa silvestre (<i>Solanum lycopersicum</i>)	(Cuppels, 1986)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	(Hanahan, 1983)
BL21	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	(Studier and Moffatt, 1986)

^aPsv, Psn, Psf, Psr y Psm: *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *nerii*, *fraxini*, *retacarpa* y *mandevillae*, respectivamente. Pto: *P. syringae* pv. *syringae*.

^bEntre paréntesis se indica el huésped de aislamiento.

Construcción de cepas bacterianas y plásmidos

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se indican en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Para la expresión heteróloga en Psv NCPPB 3335 se amplificaron los marcos abiertos de lectura de los diferentes alelos del gen *iaaL* junto con su correspondiente promotor utilizando DNA genómico de las diferentes cepas, y utilizando la polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, Hitchin, UK) y los oligonucleótidos *iaaL*-RBS-F e *iaaL*-RBS-R (Tabla 2). Los productos resultantes se clonaron en el vector de expresión constitutiva pAMEX utilizando las enzimas de restricción incluidas en los oligonucleótidos. La ligación de los fragmentos de DNA se realizó utilizando la enzima T4 DNA ligase (Takara Biotech Cor.; Kaohsiung, Taiwán), manteniendo una proporción 1:3 de vector e inserto y se comprobó la ausencia de mutaciones en la secuencia. Los plásmidos obtenidos se transfirieron a Psv NCPPB 3335 mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron en medio LB-Km (Pérez-Martínez et al., 2007).

Para la purificación de las proteínas *iaaL*, las regiones codificantes de los alelos *iaaL* se amplificaron mediante PCR usando el DNA genómico correspondiente como molde y la polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, Hitchin, UK). Los fragmentos resultantes se clonaron en un plásmido pET28a, un plásmido de expresión utilizado para la producción de proteínas que fusiona la clonación a una cola de hexahistidina (6xHis), permitiendo su purificación mediante cromatografía de afinidad de níquel. Los vectores resultantes se transformaron en *E. coli* DH5α y se comprobó que la amplificación por PCR no contenía ningún error mediante secuenciación empleando los oligonucleótidos pET-UP y pET-DOWN. Posteriormente, los vectores se transformaron en células competentes comerciales de *E. coli* BL21, una cepa optimizada para la producción de proteínas.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características relevantes	Referencia
pAMEX	Vector de expresión en <i>Pseudomonas</i> con promotor P _{nptII} (Km ^R)	(Macho et al., 2009)
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Psv-1}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psv-1} de Psv NCPPB 3335 (Km ^R)	Este trabajo
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Pto}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Pto} de Pto DC3000 (Km ^R)	Este trabajo
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Psf-3}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psf-3} de Psf NCPPB 1006 (Km ^R)	Este trabajo
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Psn-1}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psn-1} de Psn ESC23 (Km ^R)	Este trabajo
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Psv-2}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psv-2} de Psn ESC23 (Km ^R)	Este trabajo
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Psf-1}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psf-1} de Psf CFBP 5062 (Km ^R)	Hilario Domínguez
pAMEX:: <i>iaaL</i> _{Psv-2}	Vector derivado de pAMEX que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psv-2} de Psf CFBP 5062 (Km ^R)	Hilario Domínguez
pET28a	Vector de expresión en <i>E. coli</i> con promotor inducible por IPTG (Km ^R)	Novagen
pET28a:: <i>iaaL</i> _{Psv-1}	Vector derivado de pET28a que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psv-1} de Psv NCPPB 3335 (Km ^R)	Este trabajo
pET28a:: <i>iaaL</i> _{Pto}	Vector derivado de pET28a que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Pto} de Pto DC3000 (Km ^R)	Este trabajo
pET28a:: <i>iaaL</i> _{Psf-3}	Vector derivado de pET28a que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psf-3} de Psf NCPPB 1006 (Km ^R)	Este trabajo
pET28a:: <i>iaaL</i> _{Psn-1}	Vector derivado de pET28a que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psn-1} de Psn ESC23 (Km ^R)	Este trabajo
pET28a:: <i>iaaL</i> _{Psv-2}	Vector derivado de pET28a que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psv-2} de Psn ESC23 (Km ^R)	Este trabajo
pET28a:: <i>iaaL</i> _{PsnYY}	Vector derivado de pET28a que contiene el alelo <i>iaaL</i> _{Psn-1} de Psn ESC23 modificado mediante mutagénesis dirigida (Km ^R)	Este trabajo

El vector pET28a::*iaaL*_{PsnYY} se obtuvo mediante la modificación del vector pET28a::*iaaL*_{Psn-1} introduciendo dos residuos de Tirosina (Y) mediante mutagénesis dirigida, utilizando la técnica *QuikChange site-directed mutagenesis* (Liu and Naismith, 2008). Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos Mut_YY_F y Mut_YY_R siguiendo las siguientes recomendaciones: longitud entre 30 y 45 bases, temperatura de *melting* (T_m) de al menos 78 °C, contenido en GC mínimo del 40% y presencia de bases C o G en el extremo 3'. Además, la secuencia a insertar se colocó en el medio del oligonucleótido, dejando aproximadamente 15 bases a ambos lados. Para llevar a cabo la mutagénesis se realizó una reacción de PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Q5, los oligonucleótidos diseñados y 25-60 ng del plásmido

pET28a::*iaaL*_{Ps_n-1} como molde. Posteriormente, el tubo de reacción se mantuvo en hielo durante 2 min y se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción DpnI y se incubó durante 2 h a 37 °C. Como control negativo se utilizó una fracción de la reacción sin tratar con DpnI. La reacción tratada con DpnI se transformó en células de *E. coli* DH5α y se sembró en placas de LB-Km. La presencia de la mutación se comprobó mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos pET-UP y pET-DOWN.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' – 3') ^a	Enzima de restricción
Construcción de plásmidos para expresión heteróloga		
iaaL-RBS-F	TTAAATA <u>AAGCTT</u> AATCCACGTTTTGCCACC	HindIII
iaaL-RBS-R	TTAAATGA <u>ATTCTCAGTTTCGGCGGTCGATG</u>	EcoRI
Construcción de plásmidos para expresión de proteínas		
iaaLPsn23PC-F	TTAAAT <u>GGATCCA</u> ATGACTGCCTACGATATGG	BamHI
iaaLPsn23PC-R	TTAAAT <u>GCGGCCGCGT</u> TTTCGGCGGTCGATG	NotI
iaaLPsv48PC-F	TTAAAT <u>GGATCCA</u> ATGACTGCCTACGATGTAG	BamHI
iaaLPtoPC-F	TTAAAT <u>GGATCCA</u> ATGACTGCCTACGATGTA	BamHI
iaaLPtoPC-R	TTAAAT <u>GCGGCCGCTCA</u> ATTCTGCGGTCA	NotI
pET-UP	AGATCTCGATCCCGC	-
pET-DOWN	TTTGTTAGCAGCCGG	-
Mutagénesis dirigida		
Mut_YY_F	CGCTGTTATTACTACTACTACTACGACTGCGAA GTCGATGA	
Mut_YY_R	TCATCGACTTCGCAGTCGTAGTAGTAGTAGTAA TAACAGCG	
RT-qPCR		
iaaL2 F-175	ACGCTGTCTGGAACGCAACGAGC	-
iaaL2 R-271	GCTGCGGAAGACGTTGGAGCGTG	-
qRTiaaLPsn-F	AACAAGTCTCCATCGTCGGT	-
qRTiaaLPsn-R	CGTATTCAGTGTGGCAAGGG	-
gyrA-F	GACGAGCTGAAGCAGTCCTACC	
gyrA-R	TTCCAGTCGTTACCCAGCTCG	

^aEl subrayado indica la secuencia reconocida por la enzima de restricción.

Análisis filogenético

La secuencia de los genes *iaaL* se obtuvo mediante blastn frente al genoma de las 21 cepas de *P. savastanoi*, cuyas secuencias fueron descargadas de NCBI. El análisis de las relaciones filogenéticas se llevó a cabo mediante la construcción de un árbol filogenético utilizando MEGAX (Kumar et al., 2018) con el método de máxima verosimilitud y 100 réplicas de *bootstrap* para evaluar la topología del árbol. La secuencia del gen *iaaL* de *P. syringae* pv. tomate DC3000 se utilizó como grupo externo.

Detección y cuantificación de IAA e IAA-Lys y otros conjugados

Los compuestos indólicos IAA e IAA-Lys se detectaron y cuantificaron en las cepas correspondientes a partir de cultivos en fase exponencial ($OD_{600nm} = 0.5$) en medio MG en presencia o en ausencia de L-Trp 2.5mM.

Para la detección de IAA-Lys se realizó una extracción de acetato de etilo. El sobrenadante de estos cultivos se mezcló con el mismo volumen de acetato de etilo y se incubó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la fracción de acetato de etilo extraída se evaporó a temperatura ambiente y el liofilizado obtenido se resuspendió en 1 ml de MeOH/H₂O (10:90 v/v). Para la detección del conjugado se utilizó un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Acquity (UPLC, del inglés Ultra-Performance Liquid Chromatography; Waters, Mildford, MA, EEUU), acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo (Q-TOF, del inglés *Quadrupole Time-Of-Flight*; Q-TOF MS Premier). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna analítica Kinetex C18, con un tamaño de partícula de 1.7 μ m, 50 mm \times 2.1 mm (Phenomenex). Para la elución de las muestras se aplicó un gradiente de MeOH y agua con 0.01% de HCOOH y un flujo de 0.3 ml/min. El espectrómetro de masas se utilizó en modo *full scan* y la ionización por electrospray (ESI) se usó en modo ionización positiva y negativa. El IAA-Lys se identificó en modo ESI positivo y filtrando la masa del ión parental correspondiente a 304.164 m/z.

La cuantificación de la cantidad de IAA, IAA-Lys y de los diferentes conjugados aminoacídicos de IAA producidos por las diferentes cepas bacterianas, se cuantificó utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Acquity (UPLC, del inglés Ultra-Performance Liquid Chromatography; Waters, Mildford, MA, EEUU), acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TQD, del inglés Triple Quadrupole Detector; Waters, Manchester, Reino Unido). Las muestras se diluyeron siguiendo la misma proporción en 1 ml MeOH/H₂O (10:90 v/v) tras añadir los estándares internos a una concentración final de 100 ng/ml. La columna usada en la separación cromatográfica fue la misma que la indicada anteriormente y se siguieron los parámetros descritos en Gamir et al., (2014).

Extracción de RNA y RT-qPCR

A partir de un precultivo de las cepas Psv NCPPB 3335, Psv DAPP-PG772, Psn ESC23, Psn CFBP 5067, Psr CECT 4861 y Psm Ph3 cultivados durante toda la noche, se incubaron 3 cultivos independientes en medio MG hasta alcanzar una fase exponencial ($OD_{600nm} = 0.5$). El RNA total se extrajo utilizando el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. El RNA total se trató con un kit TURBO DNA-freeTM (Applied Biosystems; CA, EE. UU.), como se detalla en las instrucciones del fabricante. La ausencia de DNA en las muestras se analizó mediante PCR. La transcripción reversa del RNA se llevó a cabo utilizando 1 μ g de RNA por muestra y oligonucleótidos inespecíficos incluidos en el kit *iScript* de síntesis de cDNA (BioRad, Hercules, CA, EEUU). El diseño de los oligonucleótidos para RT-qPCR, así como las pruebas de eficiencia y especificidad, se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Thornton and Basu, (2011) y Vargas et al., (2011). La abundancia relativa de transcritos se calculó utilizando el método de $\Delta\Delta$ *cycle-threshold* (Ct) (Livak and Schmittgen, 2001). Los datos transcripcionales se normalizaron a la expresión del gen *gyrA*. La expresión relativa se calculó como la diferencia entre los Ct del gen a analizar y los del gen

gyrA ($\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{gyrA}$). Un ciclo de RT-qPCR representa una diferencia de dos veces con respecto a la abundancia en la muestra, por lo que la tasa de variación se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001). La RT-qPCR se realizó por triplicado. Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 3.

Ensayo de elongación radicular

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 se esterilizaron superficialmente con lejía al 1% y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Posteriormente, se estratificaron en placas de Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) con 10 g/L de agar a pH 5,7-5,8 y se incubaron a 4 °C durante 2 – 4 días para obtener una germinación uniforme. Tras este periodo, las placas de MS se cultivaron en posición vertical en un fitotrón a 22 °C con fotoperiodo de día corto. A 4 cm de la raíz se inocularon 20 μ L de una suspensión bacteriana ($OD_{600} = 0.5$). Se obtuvieron fotografías después de 15 días adicionales de crecimiento vertical y se midió la longitud de la raíz utilizando el software ImageJ. Se calculó la media \pm desviación estándar para 10 a 15 plántulas.

Expresión y purificación de proteínas

Las diferentes cepas de *E. coli* BL21 transformada con los diferentes plásmidos pET28a se incubaron en medio LB durante toda la noche. Posteriormente, se realizó una dilución 1/50 en medio LB y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD_{600} de 0,5. Para la puesta a punto de las condiciones óptimas de producción de proteínas se añadió al medio de cultivo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y se incubó durante 2 h y 4 h a 20 °C y 28 °C. Al día siguiente, se recogieron las células por centrifugación y se almacenaron a -80°C. La inducción se verificó mediante un ensayo de Western *blot* (Figura 1). Se seleccionó la condición de 4 h de incubación a 28 °C y se eliminó cualquier resto de medio de cultivo, resuspendiendo las células en búfer de lisis (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazol, 10% glicerol, and 1% Tween-20). Para extraer las proteínas, se sonicó el cultivo y el extracto celular se centrifugó durante 45 min a 16000g a 4 °C. El sobrenadante obtenido con la proteína soluble se filtró a través de una columna de cromatografía de Ni^{2+} .

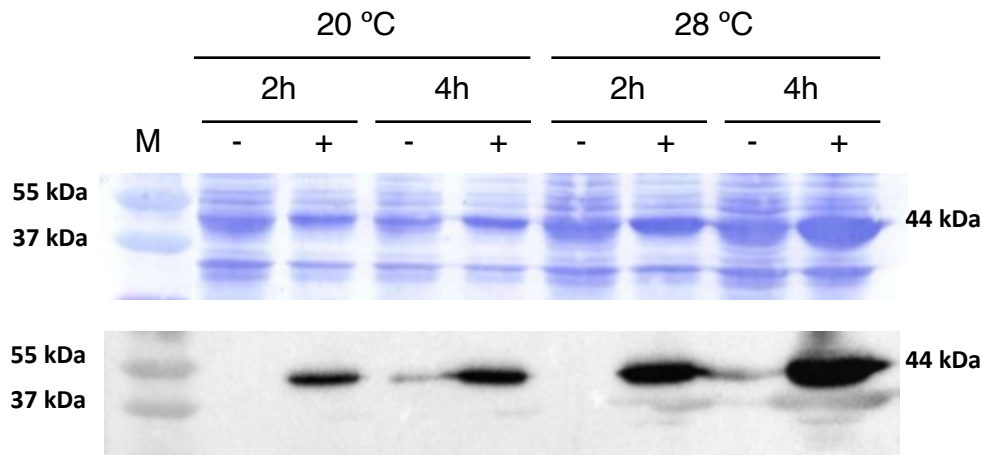


Figura 1. Puesta a punto de las condiciones óptimas para la purificación de las proteínas laaL. La inducción de la expresión génica se realizó con 1 mM de IPTG. **(Arriba)** El lisado celular se separó mediante electroforesis en un gel de acrilamida al 10% y se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie. **(Abajo)** Análisis mediante *Western blot* (ver más abajo) para verificar la producción de la proteína laaL utilizando anticuerpos específicos para el epítipo de hexahistidina. Las proteínas laaL se separaron al tamaño esperado de aproximadamente 44 kDa. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (Biorad).

La columna se lavó utilizando búfer de lavado (búfer de lisis sin Tween-20) y posteriormente se eluyó en búfer de elución (búfer de lavado con 250 mM imidazol). La proteína eluída se sometió a un proceso de diálisis durante toda la noche para eliminar restos de detergente, la alta concentración de imidazol presente en la muestra y para equilibrar el pH de la solución. Para ello la solución proteica se introdujo dentro de una membrana de diálisis y se mantuvo toda la noche a 4 °C en agitación en una solución compuesta por 25 mM HEPES, 100 mM NaCl y 10% de glicerol a pH 7,5. Tras recuperar la solución dializada, se cuantificaron los niveles de proteína presentes en cada extracción utilizando el reactivo de Bradford y seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

Western blot

A partir de células congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se llevó a cabo la lisis celular utilizando ditioneitol (DTT) y tampón Laemmli en una relación 1:3. Las muestras se incubaron durante 10 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugaron durante 1 min a 13000 rpm. La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el reactivo de Bradford. De cada muestra se fraccionaron 5 μg en un gel monodimensional de SDS-PAGE al 10 %. Para llevar a cabo la inmunodetección, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Merk, Alemania) durante 30 min a 12V utilizando un sistema de transferencia *Trans-Blot Turbo Transfer System* (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Tras el bloqueo de la membrana con leche desnatada al 5% en TBS-T (20 mM TRIS + 150 mM NaCl + 1 ml Tween 20 + H_2O), las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico frente a la cola de hexahistidina obtenido en ratón (SAB1305538 - *Sigma-Aldrich*) durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o 1 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con TBS-T, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón (A9044 - *Sigma-Aldrich*) en TBS-T + leche desnatada al 1%. Tras eliminar los restos de anticuerpo con varios lavados en TBS-T se reveló la membrana añadiendo *Clarity Western ECL substrate luminol/enhancer solution* (Promega; Madison, EEUU).

Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática de cada una de las proteínas laaL se analizó siguiendo la desaparición de NADH del medio midiendo la absorbancia a 340 nm en un lector de placas multipocillos Synergy HTX (Biotek, Winooski, VT, EEUU). Para la puesta a punto de las condiciones óptimas de reacción para nuestras proteínas, se comprobó la actividad de las proteínas laaL en presencia de diferentes sales (100 mM NaCl, 100 mM KCl), cofactores (3 mM MgCl_2 , 3 mM MnCl_2 , 3 mM CaCl_2 , 3 mM ZnCl_2 y NiSO_4) y pH (50 mM Tris-HCl pH 7 / 7,5 / 8 / 8,5). Finalmente, se seleccionaron las siguientes condiciones estándar para las reacciones enzimáticas con las proteínas laaL: Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), MgCl_2 3 mM, ATP 1 mM, PEP 1 mM, NADH 0.2 mM, 100 mM KCl, 2 unidades de Mioquinasa y 4 unidades de Piruvato Quinasa + Lactato deshidrogenasa. Para

determinar la actividad específica de estas enzimas se utilizaron las siguientes concentraciones de sustrato: Lys 5 mM e IAA 1 mM. La determinación de los parámetros cinéticos en estado estacionario se realizó siguiendo las condiciones de un ensayo estándar con la concentración de Lys fija (10 mM) e IAA variable (0.01-30 mM) y con la concentración de IAA fija (5 mM) y la de Lys variable (0.01-30 mM). Utilizando el programa *GraphPad Prism* versión 8 (www.graphpad.com), todos los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten o a un modelo de inhibición por sustrato, cuando fue necesario.

Análisis bioinformáticos

La presencia de los genes implicados en las diferentes rutas de biosíntesis de IAA a partir de Trp en Psv NCPPB 3335 se analizó mediante blastn, utilizando el software Geneious v7.1.13 (<http://www.geneious.com>) junto a la secuencia de nucleótidos correspondientes a dichos genes. El análisis comparativo de las secuencias de las diferentes variantes alélicas se llevó a cabo mediante el alineamiento de las secuencias utilizando la plataforma *Multalin server* (<http://multalin.toulouse.inra.fr>). La estructura tridimensional (3D) de las diferentes proteínas laaL se obtuvo utilizando Phyre2 (Kelley et al., 2015) y RaptorX (Källberg et al., 2012). La visualización de los modelos moleculares se llevó a cabo utilizando el software USCF Chimera (Pettersen et al., 2004).

RESULTADOS

Distribución de alelos del gen *iaaL* en *P. savastanoi*

Para analizar la distribución de las aloenzimas codificadas por los diferentes alelos del gen *iaaL* en *P. savastanoi*, se realizó una búsqueda de proteínas parálogas mediante blastp en el genoma de las 21 cepas de *P. savastanoi* seleccionadas en el capítulo 1 del presente trabajo, cuyas secuencias se encontraban disponibles en NCBI. Utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos codificada por el alelo *iaaL*_{Psn} de Psn ESC23, se obtuvieron un total de 35 secuencias homólogas procedentes de las cepas seleccionadas, que mostraron un porcentaje de identidad superior al 90%, y con las que se llevó a cabo un análisis filogenético. Debido a que el genoma de la mayoría de las cepas se encontraba en forma de borrador, se eliminaron del análisis filogenético las secuencias no completas. Además, se introdujo en el análisis la secuencia codificada por el alelo *iaaL*_{Pto} de *P. syringae* pv. tomate (Pto) DC3000, con el fin de obtener una visión global de la distribución de los tres alelos descritos hasta la fecha (Figura 2). El árbol filogenético permitió la identificación de 4 grupos definidos, tres grupos formados por las secuencias de las aloenzimas codificadas por los alelos *iaaL*_{Psn}, *iaaL*_{Psv} e *iaaL*_{Pto}, y un nuevo grupo formado exclusivamente por secuencias procedentes del patovar fraxini (Psf). El grupo *iaaL*_{Psn} está formado por proteínas codificadas en cepas pertenecientes a todos los patovares de *P. savastanoi*, excepto al patovar Psf. Además, este grupo está formado por secuencias que mostraban una identidad del 100% (*iaaL*_{Psn-1}), con la excepción de aquellas codificadas en las cepas Psv NCPPB 3335 e ICMP 1411, las cuales presentan una delección de 9 residuos en el extremo N-terminal (*iaaL*_{Psn-2}). El grupo *iaaL*_{Psv} está presente en todas las cepas de *P. savastanoi*, excepto en las del patovar retacarpa (Psr) e incluye un total de 6 aloenzimas diferentes. La secuencia codificada por el alelo *iaaL*_{Pto} únicamente se encontró en la cepa de Pto DC3000. Por último, se identificó un nuevo grupo formado por 3 aloenzimas diferentes, codificadas por los alelos *iaaL*_{Psf-1}, *iaaL*_{Psf-2} e *iaaL*_{Psf-3}, todas ellas procedentes de cepas de Psf. Estas 3 secuencias, comparten un

ancestro común con las codificadas por los alelos del grupo $iaaL_{Psn}$, aunque están agrupadas en ramas filogenéticas diferentes.

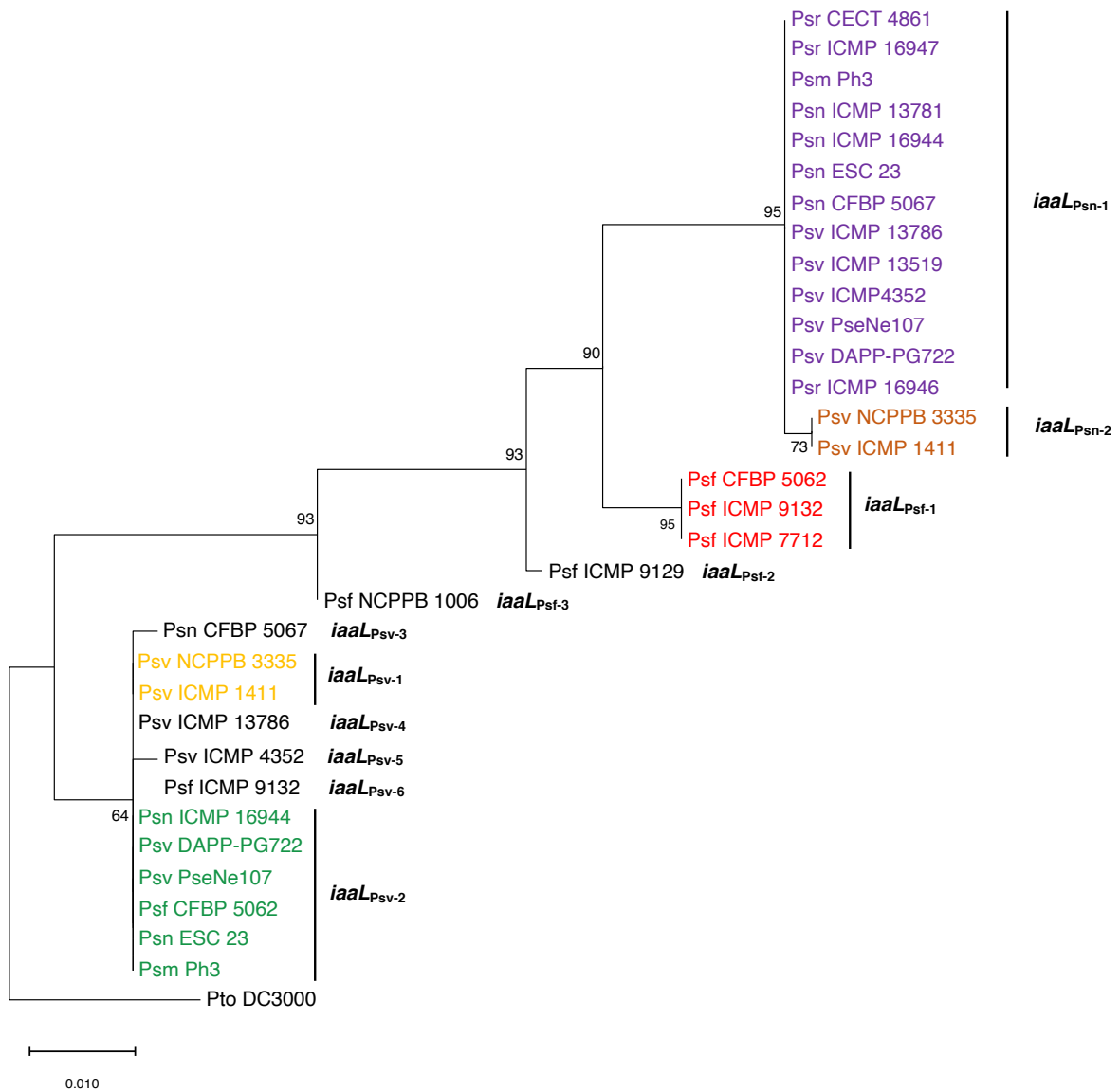


Figura 2. Distribución filogenética de las aloenzimas codificadas por los diferentes alelos del gen *iaaL* en los patovares de *P. savastanoi*. El árbol se construyó utilizando MEGAX (Kumar et al., 2018) utilizando el método de máxima verosimilitud. La secuencia del gen *iaaL*_{Pto} se utilizó como grupo externo. Las secuencias del alelo *iaaL*_{Psv} correspondientes a las cepas Psv ICMP 13519, ICMP 7712 y Psf ICMP 9129 se eliminaron debido a la baja calidad de su secuencia. Los valores en los nodos indican los porcentajes del *Bootstrap* después de 100 repeticiones.

Teniendo en cuenta que la secuencia de nucleótidos de los 3 alelos del gen *iaaL* previamente descritos (*iaaL*_{PSV}, *iaaL*_{PSN} e *iaaL*_{Pto}) pueden diferenciarse mediante análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Matas et al., 2009), se analizó bioinformáticamente si los alelos *iaaL*_{PSf-1}, *iaaL*_{PSf-2} e *iaaL*_{PSf-3} podrían diferenciarse del resto de alelos. Utilizando esta técnica con los alelos *iaaL*_{PSf-1} e *iaaL*_{PSf-2} se obtuvo un tamaño de fragmentos de DNA idénticos a los obtenidos con el alelo *iaaL*_{PSN}, mientras que el alelo *iaaL*_{PSf-3} mostró unos fragmentos de DNA similares a los obtenidos con el alelo *iaaL*_{PSV} (Figura 3).

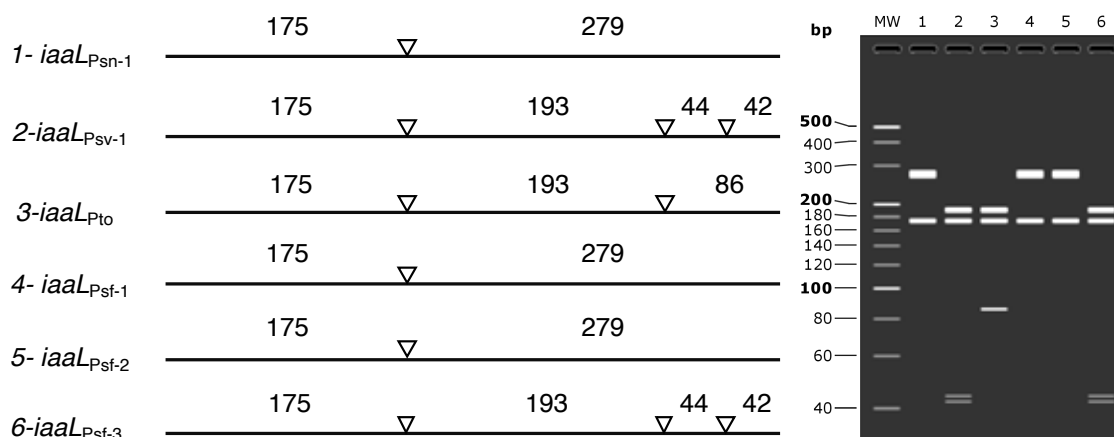


Figura 3. Diferenciación por PCR-RFLP de las secuencias del gen *iaaL* de *P. savastanoi* y *P. syringae* pv. tomato (Pto). **(A)** Representación esquemática de los fragmentos de DNA amplificados por PCR y digeridos con la enzima de restricción HaeIII (Matas et al., 2009). La posición de la secuencia identificadas por la enzima de restricción se indica con una punta de flecha invertida. **(B)** Simulación bioinformática de un gel de electroforesis (agarosa al 3%) de la digestión de los amplicones con HaeIII. Línea 1-6 se corresponden con los alelos *iaaL*_{PSN-1}, *iaaL*_{PSV-1}, *iaaL*_{Pto}, *iaaL*_{PSf-1}, *iaaL*_{PSf-2} e *iaaL*_{PSf-3}, respectivamente. MW, marcador de peso molecular de 20 pb (Takara).

Por lo tanto, con el fin de esclarecer las diferencias existentes entre las secuencias exclusivas del patovar Psf y de las codificadas por los otros alelos, se llevó a cabo un análisis comparativo de todas las aloenzimas *iaaL* identificadas (Figura 4). El alineamiento de estas 12 secuencias aminoacídicas diferentes, presentes en los patovares de *P. savastanoi* y Pto DC3000, permitió identificar residuos exclusivos presentes en cada aloenzima.

IaaLPsn	IaaLPsn-1	MTAYDMEKEW	SRISSTAAKI	HQNNDFEGFT	YQDFRTHVPI	MDKDGFAAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsn-2	-----Y	SRISSTAAKI	HQNNDFEGFT	YQDFRTHVPI	MDKDGFAAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
IaaLPsf	IaaLPsf-1	MTAYDMEKEW	SRISSTAAKI	HQNNDFEGFT	YQDFRTHVPI	MDKDGFAAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsf-2	MTAYDMEKEW	SRISSTAAKI	HQNNDFEGFT	YQDFRTHVPI	MDKDGFAAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsf-3	MTAYDMEKEW	SRISSTAAKI	HQNNDFEGFT	YQDFRTHVPI	MDKDGFAAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
IaaLPsv	IaaLPsv-1	MTAYDVEKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQNFRRHVPI	MDKEGFTAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsv-2	MTAYDVEKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQNFRRHVPI	MDKEGFTAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsv-3	MTAYDVEKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQNFRRHVPI	MDKEGFTAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsv-4	-----EKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQNFRRHVPI	MDKEGFTAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsv-5	MTAYDVEKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQNFRRHVPI	MDKEGFTAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
	IaaLPsv-6	MTAYDVEKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQNFRRHVPI	MDKEGFTAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS
IaaLPto	MTAYDVEKEW	SRISNTAAKT	HQNNDFEGFT	YQDFRTHVPI	MDKEGFAAQT	ERCLERNERN	CLIGFTSGTS	

IaaLPsn	IaaLPsn-1	GNLKRCYYYY	--DCEVDE--	--DSSLSNVFR	SNGFILPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsn-2	GNLKRCYYYY	--DCEVDE--	--DSSLSNVFR	SNGFILPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
IaaLPsf	IaaLPsf-1	GNLKRCYYYY	--DCEVDK--	--DSSLSNVFR	SNGFILPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsf-2	GNLKRCYYYY	--DCEVDK--	--DSSLSNVFR	SNGFILPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsf-3	GNLKRCYYYY	--DCEVDK--	--DSSLSNVFR	SNGFILPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
IaaLPsv	IaaLPsv-1	GNLKRCYYYY	YYDCEVDE--	--DSSRSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsv-2	GNLKRCYYYY	--DCEVDE--	--DSSRSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsv-3	GNLKRCYYYY	--DCEVDE--	--DSSRSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsv-4	GNLKRCYYYY	--DCEVDEVD	EDSSRSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsv-5	GNLKRCYYYY	--DCEVDEVD	EDSSRSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
	IaaLPsv-6	GNLKRCYYYY	--DCEVDE--	--DSSLSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS
IaaLPto	GNLKRCYYYY	--DCEVDE--	--DSSRSNVFR	SNGFIQPGDR	CANLFTINLF	SALNNITIMM	AGNCGAHVVS	

IaaLPsn	IaaLPsn-1	VGDITLVTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFINAMQHN	GVHINIEKVV	FTGESLKTFFQ	KKIIRQAFGE
	IaaLPsn-2	VGDITLVTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFINAMQHN	GVHINIEKVV	FTGESLKTFFQ	KKIIRQAFGE
IaaLPsf	IaaLPsf-1	VGDITLVTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFINAMQHN	GVHINIEKVV	FTGESLKTFFQ	KKIIRQAFGE
	IaaLPsf-2	VGDITLVTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFINAMQHN	GVHINIEKVV	FTGESLKTFFQ	KKIIRQAFGE
	IaaLPsf-3	VGDITLVTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
IaaLPsv	IaaLPsv-1	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
	IaaLPsv-2	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
	IaaLPsv-3	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
	IaaLPsv-4	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
	IaaLPsv-5	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
	IaaLPsv-6	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIEIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGQ
IaaLPto	VGDITLLTKS	HFEALNSIKL	NVLLGVPSTI	LQFIDAMQQH	GVHIDIEKVV	FNGEGLKTFQ	KKIIREAFGE	

IaaLPsn	IaaLPsn-1	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsn-2	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
IaaLPsf	IaaLPsf-1	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsf-2	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsf-3	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
IaaLPsv	IaaLPsv-1	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsv-2	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsv-3	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsv-4	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsv-5	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
	IaaLPsv-6	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK
IaaLPto	QVSIVGVYGS	SEGGILGFTN	SPCHTEYEFL	SDKYFIEKEG	DSILITSLTR	ENFTPLLRYR	LGDTATLSMK	

IaaLPsn	IaaLPsn-1	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRSL	EIQVHLSVTE	ERKELVTVFV	QASEVDEDER
	IaaLPsn-2	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRSL	EIQVHLSVTE	ERKELVTVFV	QASEVDEDER
IaaLPsf	IaaLPsf-1	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRSL	EIQVHLSVTE	ERKELVTVFV	QASEVDEDER
	IaaLPsf-2	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
	IaaLPsf-3	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
IaaLPsv	IaaLPsv-1	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
	IaaLPsv-2	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
	IaaLPsv-3	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
	IaaLPsv-4	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
	IaaLPsv-5	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
	IaaLPsv-6	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER
IaaLPto	GDKLYLTDIQ	REDMSFNFMG	NLIGLGIQQ	AIKQTLGRPL	EIQVHLSVTE	ARKELVTVFV	QASEVDEEER	

IaaLPsn	IaaLPsn-1	ARIETAIADI	PDINEAYQKN	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsn-2	ARIETAIADI	PDINEAYQKN	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
IaaLPsf	IaaLPsf-1	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsf-2	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsf-3	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
IaaLPsv	IaaLPsv-1	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsv-2	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsv-3	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsv-4	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsv-5	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
	IaaLPsv-6	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN		
IaaLPto	ARIETAIADI	PDINEAYQKD	QGSVSVLRKD	ARDYAVSERG	KMLYIIDRRN			

Figura 4. Alineamiento múltiple de la secuencia de las proteínas *laaL* codificadas en los alelos *laaL_{Psf}*, *laaL_{Psv}* e *laaL_{Psn}* presentes en los diferentes patovares de *P. savastanoi*. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas se realizó utilizando MEGAX (Kumar et al., 2018) usando el algoritmo ClustalW. En negrita se indican las secuencias correspondientes a diferentes grupos identificados. Los residuos exclusivos de la secuencia de la proteína *laaL_{Psv}* (azul), *laaL_{Psn}* (rojo), *laaL_{Psf}* (amarillo) e *laaL_{Pto}* (verde), así como los cambios en la secuencia intraalélicos (gris) se encuentran indicados con cajas de colores.

Las secuencias aminoacídicas codificadas por los dos alelos *laaL_{Psn}* y el alelo *laaL_{Pto}* contienen seis residuos exclusivos, mientras que las seis aloenzimas pertenecientes al grupo *laaL_{Psv}* únicamente comparten tres residuos exclusivos. Además, se identificó la presencia de dos residuos exclusivos compartidos en las tres secuencias procedentes de *Psf*. Considerando estas diferencias, los alelos *laaL* codificantes de las 3 aloenzimas identificadas exclusivamente en cepas de *Psf* se clasificaron dentro de un nuevo grupo de alelos (*laaL_{Psf}*). La distribución de cada uno de los alelos del gen *laaL* en las 21 cepas de *P. savastanoi* analizadas en este trabajo se indica en la Tabla 4.

Por otro lado, el gen *laaL* presentó un elevado grado de sintenia en *P. savastanoi*, ya que en todas las cepas analizadas el gen *matE* se situaba aguas arriba de éste, tal y como ha sido previamente descrito (Castillo-Lizardo et al., 2015). Además, se identificó un elevado grado de asociación de determinados genes a las diferentes variantes alélicas. Los dos alelos *laaL_{Psn}* se codifican aguas arriba de una de las copias del operón *iaaMH*, implicado en la biosíntesis de IAA, en todas las cepas, mientras que los alelos incluidos en los grupos *laaL_{Psv}* e *laaL_{Psf}* siempre se localizaron aguas abajo del efector del sistema de secreción tipo III *hopR1*. Por último, en las cercanías de los alelos *laaL* también se encontraron secuencias anotadas como transposasas en los genomas de algunas cepas de *P. savastanoi*, sugiriendo la posible transferencia horizontal de estos alelos, como se ha sido previamente descrito en el complejo *P. syringae* (Ramos et al., 2012) y como se refleja en la filogenia mostrada en la Figura 2.

Tabla 4. Distribución de alelos del gen *iaaL* en las 21 cepas de *P. savastanoi* analizadas en este trabajo.

Patovar/Cepa ^a	Alelo ^b			(Y) _n ^c	Referencia
	<i>iaaL</i> _{Psn}	<i>iaaL</i> _{Psv}	<i>iaaL</i> _{Psf}		
pv. fraxini					
NCPBP 1006	-	-	<i>iaaL</i> _{Psf-3}	4	Este trabajo
CFBP 5062	-	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	<i>iaaL</i> _{Psf-1}	4	(Nowell et al., 2016)
ICMP 9132	-	<i>iaaL</i> _{Psv-6}	<i>iaaL</i> _{Psf-1}	4	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 7712	-	p	<i>iaaL</i> _{Psf-1}	4	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 9129	-	p	<i>iaaL</i> _{Psf-2}	4	(Dillon et al., 2019b)
pv. nerii					
ESC23	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	4	Este trabajo
CFBP 5067	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-3}	-	4	(Nowell et al., 2016)
ICMP 13781	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	-	-	4	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 16944	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	4	(Dillon et al., 2019b)
pv. retacarpa					
CECT 4861	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	-	-	4	Este trabajo
ICMP 16946	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	-	-	4	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 16947	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	-	-	4	(Dillon et al., 2019b)
pv. savastanoi					
NCPBP 3335	<i>iaaL</i> _{Psn-2}	<i>iaaL</i> _{Psv-1}	-	6	Este trabajo
ICMP 4352	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-5}	-	4	(Thakur et al., 2016)
DAPP-PG722	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	4	(Moretti et al., 2014)
PseNe107	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	4	(Bartoli et al., 2015)
ICMP 13519	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	p	-	4	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 1411	<i>iaaL</i> _{Psn-2}	<i>iaaL</i> _{Psv-1}	-	6	(Dillon et al., 2019b)
0485_9	p	p	-	4	(Dillon et al., 2019b)
ICMP 13786	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-4}	-	4	(Dillon et al., 2019b)
pv. mandevillae					
Ph3	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	4	Este trabajo

^aEn gris se indican las cepas seleccionadas para futuros análisis.

^b -, ausencia; p, secuencia parcial.

^cNúmero de repeticiones del residuo Y (Tyr) detectados en las proteínas *iaaL*_{Psv}.

Producción de IAA-Lys en *P. savastanoi*

La capacidad de producir IAA-Lys por parte de cepas de *P. savastanoi* es un hecho conocido desde los años 80. Sin embargo, únicamente se ha analizado su producción en cepas de *P. savastanoi* aisladas de adelfa y olivo, detectándose exclusivamente en las cepas de adelfa (Evidente et al., 1985). Más recientemente, se ha identificado la producción del conjugado en la cepa de Psn ESC23, así como la pérdida de su producción en un mutante del alelo *iaaL*_{Psn-1} (Cerboneschi et al., 2016), también codificado en el genoma de todas las cepas analizadas en este trabajo, con la excepción de las cepas pertenecientes a Psf, Psv NCPBP 3335 e ICMP 1411 (Tabla 4). Por otro lado, Psn ESC23 también

codifica un alelo *iaaL*_{PSV-2} (Tabla 4), sin embargo, este otro alelo podría ser no funcional o contribuir en menos medida a la producción de IAA-Lys.

La capacidad de producir IAA-Lys en otras cepas de *P. savastanoi* con una combinación de alelos *iaaL* diferentes no ha sido analizada hasta la fecha. Por lo tanto, se decidió analizar la producción de IAA e IAA-Lys en una selección de cepas representantes de los 5 patovares de *P. savastanoi* y con una combinación diferente de alelos *iaaL*: Psf NCPPB 1006 (*iaaL*_{Psf-3}), Psn ESC23 (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{PSV-2}), Psn CFBP 5067 (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{PSV-3}), Psr CECT 4861 (*iaaL*_{Psn-1}), Psv NCPPB 3335 (*iaaL*_{Psn-2}, *iaaL*_{PSV-1}), Psv DAPP-PG722 (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{PSV-2}) y Psm Ph3 (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{PSV-2}), Además, se incluyó la cepa Pto DC3000 (*iaaL*_{Pto}) (Tabla 5). En resumen, de los 12 alelos diferentes identificados, se seleccionaron cepas portadoras de siete de ellos: los dos alelos *iaaL*_{Psn} (*iaaL*_{Psn-1} e *iaaL*_{Psn-2}), uno de los tres alelos *iaaL*_{Psf} (*iaaL*_{Psf-3}), tres de los seis alelos *iaaL*_{PSV} (*iaaL*_{PSV-1}, *iaaL*_{PSV-2} e *iaaL*_{PSV-3}) y el alelo *iaaL*_{Pto}.

Los niveles de IAA se cuantificaron mediante UPLC-TQD en el sobrenadante de los cultivos de estas cepas tras 20 h de incubación. En medio MG suplementado con Trp, las cepas Psv NCPBB 3335, Psn ESC23, Psm Ph3 y Psr CECT 4861 mostraron una mayor acumulación de IAA, en comparación con las cepas Psf NCPPB 1006 y Pto DC3000, las cuales carecen de los genes *iaaM* e *iaaH* implicados en la principal ruta de biosíntesis de IAA presente en *P. savastanoi* (Figura 5A). Por otro lado, en medio MG, las cepas Psv DAPP-PG772 y Psn CFBP 5067 mostraron unos niveles de IAA similares a los producidos por Psv NCPPB 3335 (Figura 5B). A pesar de las diferencias en las condiciones de cultivo (+/- Trp) utilizadas para cuantificar la producción de IAA en las diferentes cepas, los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado previamente por otros autores para cepas de Psv, Psn, Psf, Psr y Pto. Además, la producción de IAA en cepas de Psm no había sido descrita hasta la fecha.

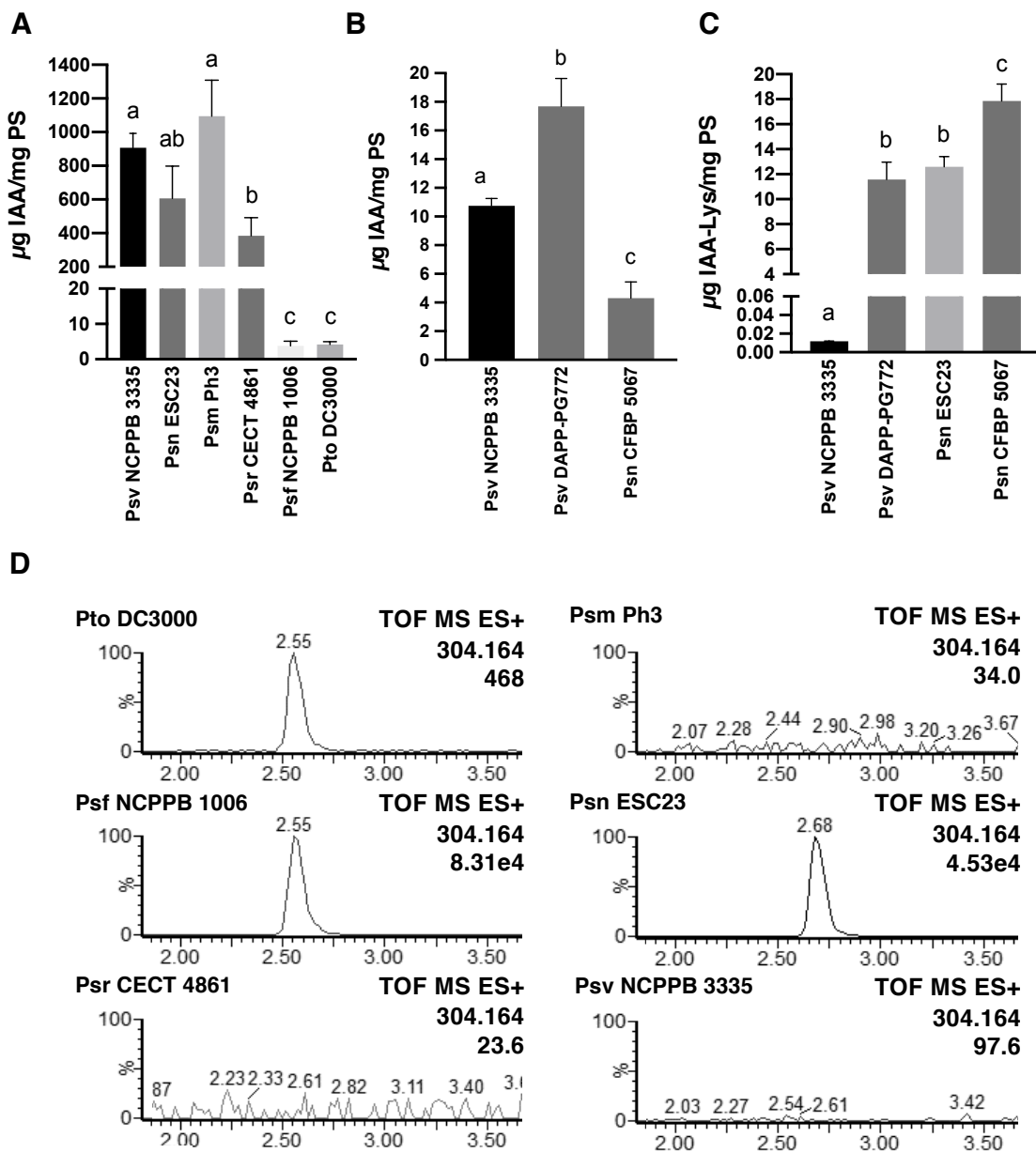


Figura 5. Detección de IAA e IAA-Lisina en cepas representantes de cada patovar de *P. savastanoi* y Pto DC3000. **(A)** Cuantificación de los niveles de IAA mediante UPLC-TQD en cepas incubadas en medio MG suplementado con Trp. **(B)** Cuantificación de los niveles de IAA mediante UPLC-TQD en cepas incubadas en medio MG. Los datos se representan como µg de IAA por mg del peso seco bacteriano. Cada barra se corresponde con la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. **(C)** Cuantificación de los niveles de IAA-Lisina presentes en cepas incubadas en medio MG. Las barras representan las medias de tres réplicas ± la desviación estándar. **(D)** Cromatogramas de UPLC-QTOF para la detección de IAA-Lisina en modo ESI + en cepas incubadas en medio MG suplementado con Trp.

Los niveles de IAA-Lys se cuantificaron mediante UPLC-TQD (Figura 5C) y, cuando no fue posible, se detectó mediante UPLC-QTOF (Figura 5D) la presencia del conjugado en el sobrenadante de los cultivos de estas cepas incubadas durante 20h. Las cepas Psv DAPP-PG772 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*), Psn ESC23 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*) y Psn CFBP 5067 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-3}*) produjeron cantidades cuantificables de IAA-Lys en medio MG, sin embargo, no se detectó producción del conjugado en el sobrenadante de la cepa Psv NCPPB 3335 (*iaaL_{Psn-2}*, *iaaL_{Psv-1}*). En medio MG suplementado con Trp, se identificó un pico correspondiente al compuesto IAA-Lys (304.164 m/z) únicamente en las cepas Psn ESC23 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*), Psv NCPPB 1006 (*iaaL_{Psv-3}*) y Pto DC3000 (*iaaL_{Pto}*). Sin embargo, los picos correspondientes a los aislados de adelfa y fresno fueron de aproximadamente 180 veces más intensidad que el pico de Pto, indicando una mayor acumulación del compuesto en estas cepas. En las cepas de Psv NCPPB 3335 (*iaaL_{Psn-2}*, *iaaL_{Psv-1}*), Psv CECT 4861 (*iaaL_{Psn-1}*) y Psm Ph3 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*) no se detectó el conjugado IAA-Lys.

En conclusión, la producción del conjugado IAA-Lys no está condicionada por la cantidad de IAA presente, ya que en cepas que producen grandes cantidades de IAA no se detectó acumulación del conjugado (Psv NCPPB 3335, Psm Ph3 y Psv CECT 4861). Por el contrario, en algunas cepas cuya producción de IAA era menor (Psv NCPPB 1006 y Pto DC3000) sí se detectó acumulación de IAA-Lys. Además, se detectó producción de IAA-Lys en cepas con al menos un alelo *iaaL_{Psv-3}*, *iaaL_{Pto}* o *iaaL_{Psn-1}*. Sin embargo, en las cepas Psv CECT 4861 y Psm Ph3, las cuales contienen un alelo *iaaL_{Psn-1}*, así como la cepa Psv NCPPB 3335 (*iaaL_{Psn-2}*, *iaaL_{Psv-1}*) no se detectó el conjugado. Las cepas y los diferentes alelos del gen *iaaL* presentes en éstas, así como su capacidad de producción de IAA e IAA-Lys se encuentran indicados en la Tabla 5.

Tabla 5. Detección de IAA e IAA-Lys en cepas de los patovares de *P. savastanoi* y Pto DC3000.

Cepa	Alelos				IAA ^a	IAA-Lys ^a
	<i>iaaL</i> _{Psn}	<i>iaaL</i> _{Psv}	<i>iaaL</i> _{Psf}	<i>iaaL</i> _{Pto}		
Psv NCPPB 3335	<i>iaaL</i> _{Psn-2}	<i>iaaL</i> _{Psv-1}	-	-	++	-
Psv DAPP-PG772	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	-	++	++
Psn ESC23	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	-	++	++
Psn CFBP 5067	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-3}	-	-	++	++
Psf NCPPB 1006	-	-	<i>iaaL</i> _{Psf-3}	-	+	++ ^b
Psr CECT 4861	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	-	-	-	++	- ^b
Psm Ph3	<i>iaaL</i> _{Psn-1}	<i>iaaL</i> _{Psv-2}	-	-	++	- ^b
Pto DC3000	-	-	-	<i>iaaL</i> _{Pto}	+	+ ^b

^aCapacidad de producción del compuesto en la cepa analizada: ++, alta producción del compuesto; +, producción baja del compuesto; -, ausencia de producción; ND, no cuantificada.

^bCompuesto detectado mediante HPLC-QTOF, pero no cuantificado.

Análisis transcripcional de los genes *iaaL*

Anteriormente, se ha demostrado que la producción de IAA-Lys es independiente de la cantidad de IAA producido. Por lo tanto, la producción de IAA-Lys podría estar condicionada por la presencia de determinados alelos (Tabla 5). La cepa Psv NCPPB 3335 presenta en su genoma dos copias del gen *iaaL*, el alelo *iaaL*_{Psn-2}, el cual contiene una delección en su extremo N-terminal (Figura 4), y un alelo *iaaL*_{Psv-1}. La delección de 9 aminoácidos en *iaaL*_{Psn-2} podría estar inactivando la actividad de la enzima en Psv NCPPB 3335, sin embargo, el alelo *iaaL*_{Psv-1} no parece estar contribuyendo a la producción de IAA-Lys. En las cepas Psr CECT 4861 (*iaaL*_{Psn-1}) y Psm Ph3 (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psv-2}), no se identificó producción de IAA-Lys pese a producir altos niveles de IAA. Sin embargo, estas cepas contienen un alelo *iaaL*_{Psn-1} 100% idéntico al alelo presente en las cepas Psv DAPP-PG772, Psn ESC23 y CFBP5067, productoras del conjugado IAA-Lys. Además, no se encontraron diferencias en las regiones promotoras de los genes *matE* e *iaaL*_{Psn-1}, mostrando un elevado grado conservación de esta región en *P. savastanoi* (datos no mostrados). Por lo tanto, la ausencia de producción en estas cepas podría deberse a diferencias transcripcionales entre los alelos *iaaL*, pese a su elevado grado de conservación de la región promotora en las diferentes cepas.

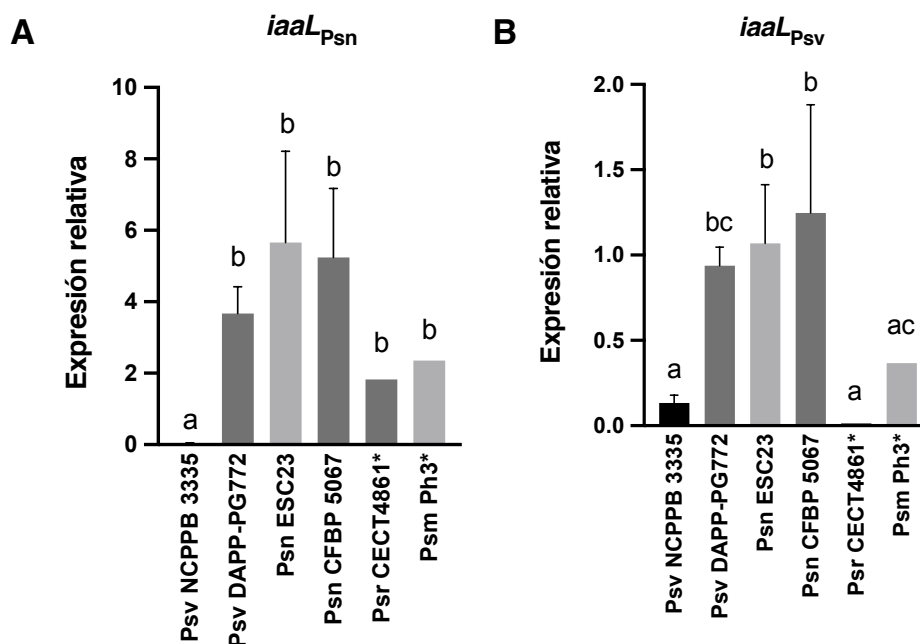


Figura 6. (A) Análisis transcripcional del alelo *iaaL_{Psn}* y (B) del alelo *iaaL_{Psv}* de cepas de *P. savastanoi*. Los niveles de expresión relativa se calcularon normalizando la expresión al gen *gyrA* utilizado como control interno. Las barras representan las medias de tres réplicas \pm la desviación estándar. Las cepas marcadas con un asterisco representan una única réplica biológica.

Mediante un ensayo de RT-qPCR se cuantificaron los niveles de expresión de los alelos presentes en las cepas Psv NCPPB 3335 (*iaaL_{Psn-2}*, *iaaL_{Psv-1}*), Psr CECT 4861 (*iaaL_{Psn-1}*) y Psm Ph3 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*). Además, se incluyeron las cepas Psv DAPP-PG772 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*), Psn ESC23 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-2}*) y Psn CFBP 5067 (*iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psv-3}*) como control positivo de cepas productoras de IAA-Lys. A partir de un cultivo incubado o/n, las cepas seleccionadas se cultivaron en medio MG hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5 y posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de ambos alelos utilizando cebadores específicos. Como control de la especificidad se utilizó la cepa Psr CECT 4861 (*iaaL_{Psn-1}*), la cual carece de un alelo *iaaL_{Psv}*. En la mayoría de las cepas, la expresión del alelo *iaaL_{Psn}* (Figura 6A) fue aproximadamente 6 veces mayor que la del alelo *iaaL_{Psv}* (Figura 6B). Además, se identificaron algunas particularidades que podrían explicar las diferencias presentes en la producción de IAA-Lys entre estas cepas. No se detectó expresión del alelo *iaaL_{Psn-2}* en Psv NCPPB 3335, mientras que las cepas Psr CECT 4861 y Psm Ph3 mostraron unos niveles de expresión reducidos para el alelo *iaaL_{Psn-1}* en comparación al resto de cepas

(Figura 6A). Sin embargo, los datos de las cepas P_{sr} CECT 4861 y P_{sm} Ph3 proceden de una única réplica biológica, siendo necesario repetir el análisis con el fin de confirmar la tendencia. Por otro lado, la expresión de los alelos *iaaL*_{P_{sv}-1} e *iaaL*_{P_{sv}-2} en las cepas P_{sv} NCPPB 3335 y P_{sm} Ph3, respectivamente, también fue significativamente menor que en las cepas productoras de IAA-Lys. Además, no se identificó amplificación en P_{sr} CECT 4861 (*iaaL*_{P_{sn}-1}), la cual carece de un alelo *iaaL*_{P_{sv}}, confirmando la especificidad de los oligonucleótidos (Figura 6B).

Por lo tanto, la combinación de la cuantificación y detección de los niveles de IAA e IAA-Lys, junto con el análisis transcripcional de los alelos *iaaL*_{P_{sn}} e *iaaL*_{P_{sv}}, sugieren que: 1) los alelos *iaaL*_{P_{sn}-1}, *iaaL*_{P_{sf}-3} o *iaaL*_{P_{to}} parecen contribuir a la producción del conjugado, 2) unos niveles de expresión del alelo *iaaL*_{P_{sn}-1} similares a los alcanzados por las cepas P_{sv} DAPP-PG 772, P_{sn} ESC23 y CFBP 5062 podrían ser necesarios para la producción del conjugado en cantidad suficiente para ser detectado en los cultivos de *P. savastanoi*, 3) los niveles de expresión de los alelos *iaaL*_{P_{sn}-2} e *iaaL*_{P_{sv}-1} en P_{sv} NCPPB 3335 podrían ser insuficientes para la producción de IAA-Lys, 4) en cepas productoras de IAA-Lys (P_{sn} ESC23 y CFBP 5067) los alelos *iaaL*_{P_{sv}-2} e *iaaL*_{P_{sv}-3} presentan unos niveles de expresión similares, sin embargo, en cepas no productoras (P_{sm} Ph3) el alelo *iaaL*_{P_{sv}-2} mostró una reducción en sus niveles de expresión.

Evaluación funcional de los alelos *iaaL*

La producción de IAA-Lys esta ligada a la presencia de un alelo *iaaL*_{P_{sn}-1} funcional y completo, ya que no se detectó producción del conjugado en cepas con el alelo *iaaL*_{P_{sn}-2}, el cual contiene una delección. Además, la ausencia de producción de IAA-Lys en P_{sv} NCPPB 3335 sugiere la inactividad del alelo *iaaL*_{P_{sv}-1} presente en esta cepa. Por otro lado, la construcción de un mutante en el alelo *iaaL*_{P_{sn}-1} en P_{sn} ESC23 provocó la pérdida de producción del conjugado (Tegli et al., 2020), por lo que el alelo *iaaL*_{P_{sv}-2}, presente en esta cepa, podría no estar contribuyendo a la producción de éste.

Las diferentes aloenzimas codificadas en los alelos del gen *iaaL* presentes en *P. savastanoi* podrían presentar diferencias de actividad, condicionando la producción de IAA-Lys. Por lo tanto, de los siete alelos codificados en las cepas utilizadas en los ensayos anteriores, se seleccionaron los 3 alelos que parecen contribuir a la producción de IAA-Lys (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psf-3} e *iaaL*_{Pto}) y dos de los tres alelos *iaaL*_{Psv} (*iaaL*_{Psv-1} e *iaaL*_{Psv-2}) que podrían no contribuir a la formación del conjugado. Además, se seleccionó el alelo *iaaL*_{Psf-1}, cuya secuencia se encuentra más representada entre las cepas de Psf analizadas, pero no está codificado en ninguna de las cepas seleccionadas en los ensayos anteriores (Tabla 5).

La actividad de los diferentes alelos se cuantificó de manera indirecta mediante la sobreexpresión de estos en Psv NCPPB 3335. Debido a la ausencia de transcripción en algunos alelos, así como para eliminar las diferencias existentes en las tasas de transcripción de los diferentes alelos, la secuencia amplificada por PCR se clonó en el plásmido de expresión pAMEX, bajo el control del promotor constitutivo *nptII*. El efecto de las diferentes aloenzimas *iaaL* sobre el pool total de IAA producido se observó mediante un ensayo biológico basado en el análisis del efecto del IAA bacteriano en la elongación radicular de plántulas de *A. thaliana* Col-0. La presencia de altas concentraciones de IAA provoca una fuerte inhibición del alargamiento radicular en *A. thaliana*, por lo que diferencias en el crecimiento radicular estarían influenciadas directamente por la actividad de las diferentes aloenzimas sobre el pool de IAA. Este ensayo ha sido empleado anteriormente para el análisis del efecto de un mutante en el gen *iaaL* sobre el “pool” de IAA en Psn ESC23, obteniéndose los resultados esperados a un aumento de la concentración de IAA libre (Cerboneschi et al., 2016). Además, se incluyeron en el análisis las cepas Psv NCPPB 3335 silvestre y el mutante Psv $\Delta iaaMH1-2$ derivado de ésta, como control del efecto de la presencia de altas o bajas concentraciones de IAA, respectivamente (Figura 7A). Tras 15 días, la longitud media de la raíz principal de las plántulas tratadas con la cepa Psv NCPPB 3335 fue de 8.66 ± 2.11 cm, aproximadamente la mitad a la obtenida en las plántulas sin tratar (15.54 ± 1.73 cm), debido a la presencia de altas

concentraciones de IAA. Por el contrario, las plántulas tratadas con la cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$ mostraron una longitud de 21.35 ± 3.73 cm. De manera similar, las plántulas tratadas con las cepas de Psv sobreexpresando los alelos $iaaL_{Psf-3}$ e $iaaL_{Psn-1}$ mostraron una longitud de 20.82 ± 3.04 cm y 18.17 ± 3.41 cm, respectivamente. Por lo tanto, la sobreexpresión de los alelos $iaaL_{Psf-3}$ e $iaaL_{Psn-1}$ parece provocar la retirada del IAA producido por Psv NCPPB 3335 del medio, disminuyendo el acortamiento radicular observado en presencia de ésta. Sin embargo, la sobreexpresión de los alelos $iaaL_{Psv-1}$ (10.18 ± 1.92 cm) e $iaaL_{Pto}$ (9.06 ± 1.71 cm) en Psv NCPPB 3335 no provocó cambios en el crecimiento radicular de las plántulas de *A. thaliana*, ya que se obtuvieron valores similares al obtenido en plántulas tratadas con la cepa silvestre de Psv NCPPB 3335 (Figura 7A).

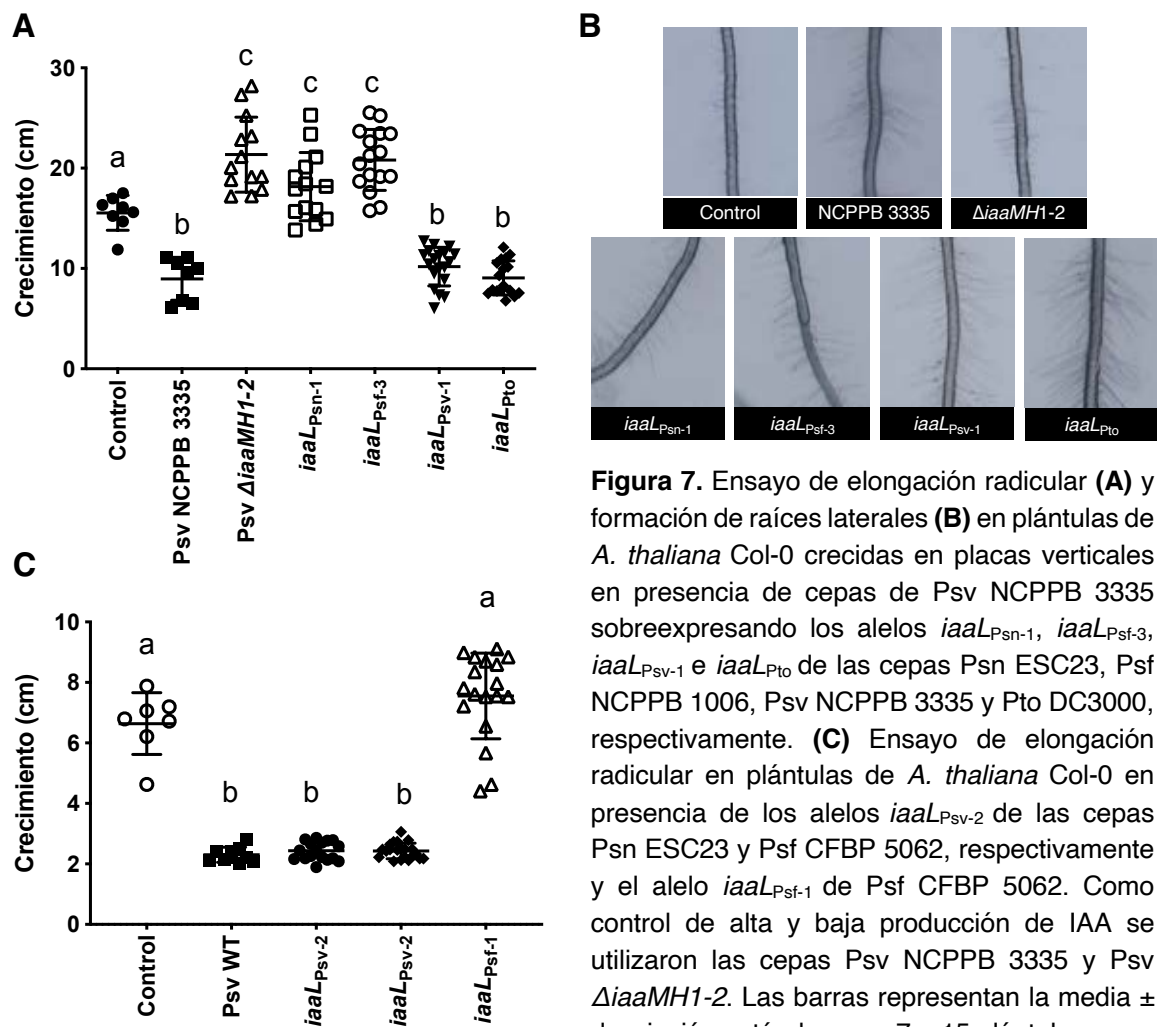


Figura 7. Ensayo de elongación radicular (**A**) y formación de raíces laterales (**B**) en plántulas de *A. thaliana* Col-0 crecidas en placas verticales en presencia de cepas de Psv NCPPB 3335 sobreexpresando los alelos $iaaL_{Psn-1}$, $iaaL_{Psf-3}$, $iaaL_{Psv-1}$ e $iaaL_{Pto}$ de las cepas Psn ESC23, Psf NCPPB 1006, Psv NCPPB 3335 y Pto DC3000, respectivamente. (**C**) Ensayo de elongación radicular en plántulas de *A. thaliana* Col-0 en presencia de los alelos $iaaL_{Psv-2}$ de las cepas Psn ESC23 y Psf CFBP 5062, respectivamente y el alelo $iaaL_{Psf-1}$ de Psf CFBP 5062. Como control de alta y baja producción de IAA se utilizaron las cepas Psv NCPPB 3335 y Psv $\Delta iaaMH1-2$. Las barras representan la media \pm desviación estándar para 7 a 15 plántulas.

Además, de acuerdo con el efecto bimodal y opuesto de la concentración de IAA libre sobre la elongación del eje principal de la raíz y los eventos locales de diferenciación de ésta, se observó un desarrollo masivo de raíces laterales en las plántulas tratadas con Psv NCPPB 3335 en comparación con las plántulas sin tratar (Figura 7B). Sin embargo, las plántulas tratadas con Psv $\Delta iaaMH1-2$ o con cepas de Psv sobreexpresando los alelos $iaaL_{Psf-3}$ e $iaaL_{Psn-1}$ mostraron una formación de pelos radiculares similar a las plántulas sin tratar. No se observaron diferencias entre las plántulas tratadas con las cepas de Psv sobreexpresando los alelos $iaaL_{Psv-1}$ e $iaaL_{Pto}$ y la cepa control Psv NCPPB 3335.

Por otro lado, también se analizó la actividad biológica de los alelos $iaaL_{Psv-2}$ e $iaaL_{Psf-1}$ (Figura 7C). La cepa Psv NCPPB 3335 se utilizó como control de alta producción de IAA en un fondo genético no productor de IAA-Lys. Tras 15 días, la longitud media de la raíz principal de las plántulas tratadas con la cepa Psv NCPPB 3335 fue de 2.33 ± 0.25 cm, significativamente inferior a 6.64 ± 1.02 cm obtenidos para las plántulas sin tratar. Las plántulas tratadas con las cepas de Psv que sobreexpresan los alelos $iaaL_{Psv-2}$ de las cepas Psn ESC23 y Psf CFBP 5062 mostraron un crecimiento de 2.42 ± 0.30 cm y 2.43 ± 0.26 cm, respectivamente. La elongación radicular de estas plántulas, similar a la obtenida para Psv NCPPB 3335, sugiere que no se está produciendo retirada de IAA libre del medio mediante conversión en IAA-Lys, por lo que de ser funcionales estos alelos, su actividad no es detectable mediante el bioensayo utilizado. Por el contrario, las plántulas tratadas con la cepa de Psv donde se sobreexpresaba el alelo $iaaL_{Psf-1}$ de Psf CFBP 5062 mostró una elongación de 7.55 ± 1.42 cm, confirmando la capacidad de retirar IAA libre del medio por esta aloenzima.

Por lo tanto, existen diferencias de actividad entre las aloenzimas codificadas por los diferentes alelos del gen *iaaL*. Los alelos $iaaL_{Psn-1}$, $iaaL_{Psf-1}$ e $iaaL_{Psf-3}$ provocaron una mayor elongación radicular que la cepa silvestre Psv NCPPB 3335, sugiriendo que son capaces de retirar IAA libre del medio mediante su transformación en IAA-Lys. Por el contrario, no se observaron diferencias en la elongación radicular de plántulas de *A. thaliana* tratadas con cepas de Psv que

sobreexpresaban los alelos *iaaL*_{Psv-1}, *iaaL*_{Psv-2} e *iaaL*_{Pto}. Por lo tanto, estas aloenzimas podrían ser inactivas o mostrar una actividad residual que provoque una variación en la concentración de IAA libre no detectable mediante el bioensayo utilizado.

Análisis de la producción de IAA e IAA-Lys de las aloenzimas *iaaL*

Con el fin de verificar la funcionalidad de las diferentes aloenzimas ensayadas, y poder correlacionar el efecto sobre la elongación radicular con la concentración de IAA libre, se cuantificaron los niveles de IAA e IAA-Lys de un representante de cada uno de los grupos de alelos del gen *iaaL* (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psv-1}, *iaaL*_{Psf-3} e *iaaL*_{Pto}) expresados en la cepa Psv NCPPB 3335.

Para ello, las diferentes cepas bacterianas, partiendo de un precultivo incubado o/n, se cultivaron durante 20h en medio MG suplementado con Trp hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5. Los niveles de IAA e IAA-Lys se cuantificaron mediante UPLC-TQD (Figura 8).

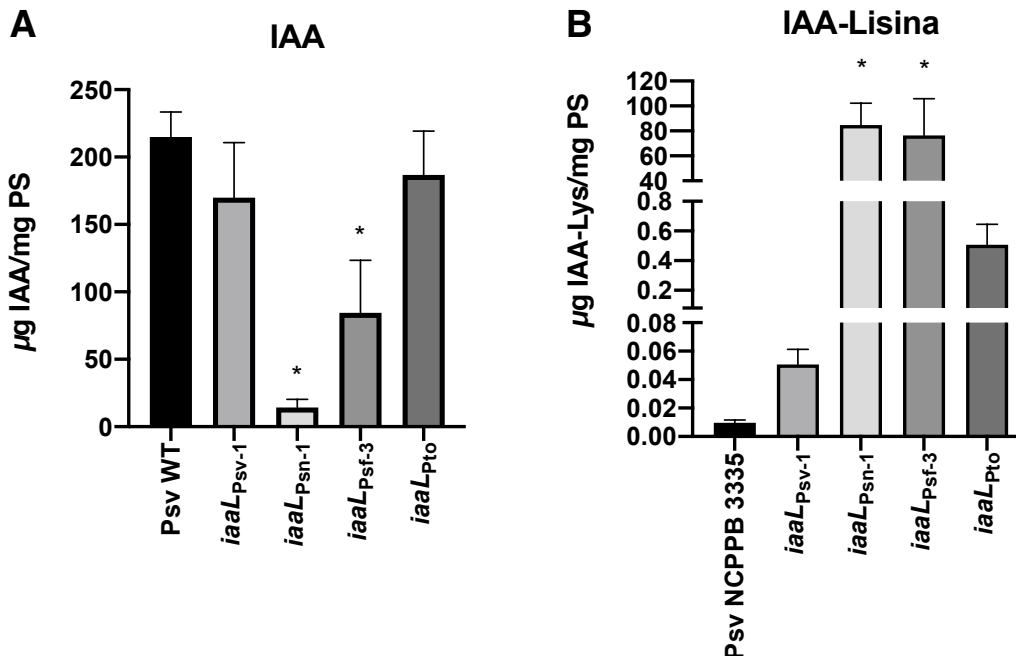


Figura 8. Cuantificación de los niveles de IAA (A) e IAA-Lisina (B) producidos en las cepas de Psv NCPPB 3335 que sobreexpresan los diferentes alelos del gen *iaaL*. Se utilizaron los alelos *iaaL*_{Psv-1}, *iaaL*_{Psf-3}, *iaaL*_{Psn-1} e *iaaL*_{Pto} de las cepas Psv NCPPB 3335, Psv NCPPB 1006, Psn ESC23 y Pto DC3000, respectivamente, expresados constitutivamente bajo el control del promotor *nptII* en la cepa silvestre Psv NCPPB 3335. Las barras representan la media ± desviación estándar de tres réplicas biológicas analizadas por duplicado.

La sobreexpresión de los alelos *iaaL_{Psf-3}* e *iaaL_{Psn-1}* redujeron de manera drástica los niveles de IAA libre en el medio de cultivo, donde se acumularon las concentraciones IAA-Lys más elevadas. Estos resultados concuerdan con el mayor crecimiento radicular observado bajo la influencia de estos alelos (Figura 7). Por el contrario, la cepa Psv NCPPB 3335 silvestre y la que sobreexpresaba el alelo *iaaL_{Psv-1}* produjeron cantidades de IAA similares y no acumularon IAA-Lys (Figura 8), datos que concuerdan con los valores reducidos de elongación radicular observados para estas tres cepas (Figura 7). Sin embargo, y aunque la expresión del alelo *iaaL_{Pto}* indujo la aparición de una baja concentración de IAA-Lys en el medio (aproximadamente 130 veces inferior), no se observó una disminución significativa de los niveles de IAA producidos en comparación con la cepa silvestre. Por lo tanto, a pesar de la producción de IAA-Lys por parte de esta cepa, la ausencia de cambios en los niveles de IAA son acordes con la similar elongación radicular observada para los alelos *iaaL_{Psv-1}* e *iaaL_{Pto}*. Además, la producción de IAA-Lys por la expresión del alelo *iaaL_{Pto}* en Psv NCPPB 3335 concuerda con la producción del conjugado en la cepa Pto DC3000 (Figura 5D).

En resumen, existen diferencias de actividad entre las aloenzimas codificadas por los diferentes alelos del gen *iaaL*. Las aloenzimas codificadas en los alelos *iaaL_{Psf-3}* e *iaaL_{Psn-1}* retiran gran cantidad de IAA del medio, a la vez que producen altas cantidad de IAA-Lys. Sin embargo, la aloenzima *iaaL_{Pto}* pese a no reducir de manera significativa los niveles de IAA del medio, sintetiza pequeñas cantidades de IAA-Lys. Por el contrario, la aloenzima codificada en el alelo *iaaL_{Psv-1}* podría ser inactiva, ya que no disminuyeron los niveles de IAA ni indujeron la aparición de IAA-Lys.

Las aloenzimas *laaL* muestran diferentes comportamientos en presencia de IAA

Mediante el análisis anterior realizado en plántulas de *A. thaliana*, han quedado patentes las diferencias de actividad existentes entre las diferentes variantes alélicas del gen *laaL*. Para profundizar en el análisis funcional de estos alelos, se llevó a cabo un ensayo bioquímico *in vitro* donde se determinaron las actividades específicas de las aloenzimas *laaL* codificadas en las diferentes variantes alélicas presentes en *P. savastanoi*. Para examinar su actividad IAA-lisina sintasa, se construyeron fusiones traduccionales del extremo C-terminal de las aloenzimas *laaL*_{Psn-1}, *laaL*_{Psf-3}, *laaL*_{Psv-1} e *laaL*_{Pto} a un epítipo de hexahistidina, utilizando el plásmido pET28a para su expresión en *E. coli* BL21. Los cultivos de *E. coli* BL21 transformados con los diferentes plásmidos construidos, se indujeron con IPTG y se incubaron a 28 °C durante 4 h. La inducción se verificó mediante Western *blot* utilizando un anticuerpo específico para el epítipo de hexahistidina (Figura 9). Posteriormente, se purificaron las proteínas mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel. Los ensayos *in vitro* se realizaron tal y como se detalla en material y métodos.

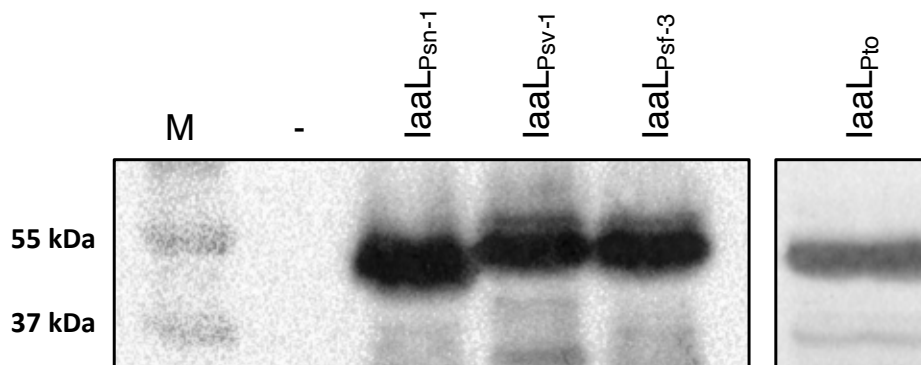
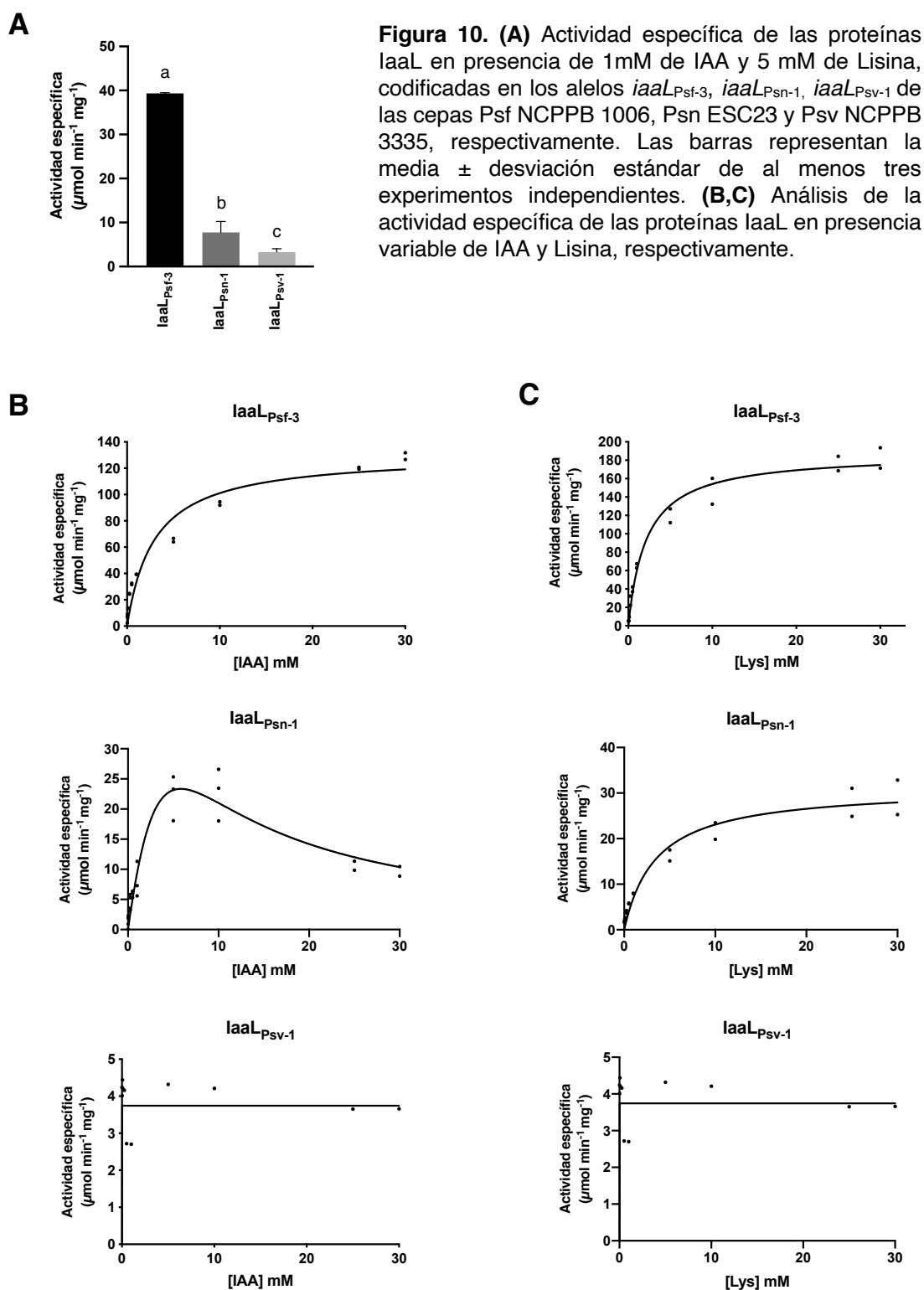


Figura 9. Análisis Western *blot* de la producción de las proteínas *laaL*_{Psf-3}, *laaL*_{Psn-1}, *laaL*_{Psv-1} e *laaL*_{Pto} en *E. coli* BL21. La inmunodetección se realizó con anticuerpos específicos para el epítipo de hexahistidina fusionado a las proteínas. El tamaño observado para las proteínas *laaL* fue de aproximadamente 44 kDa, como cabía esperar de su composición aminoácidica. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (Biorad).

El análisis bioquímico *in vitro* con las proteínas *laaL* purificadas, confirmaron las diferencias de actividad presentes entre las aloenzimas *laaL* analizadas,

utilizando condiciones estándar e IAA 1 mM y Lisina 5 mM como sustrato (Figura 10A). La proteína laaL_{Psf-3} mostró una actividad específica de 39.33 ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$), la cual fue 5 veces superior a la obtenida para la proteína laaL_{Psn-1} ($7.76 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). Por el contrario, la proteína laaL_{Psv-1} mostró un valor de actividad específica más reducida ($3.28 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). Por último, ninguna de las proteínas laaL ensayadas mostró actividad detectable en presencia de IAA-Lys 1 mM (datos no mostrados), indicando una clara preferencia por la formación de IAA-Lys en comparación con la reacción inversa.

Además, se llevó a cabo un análisis cinético que permitió identificar diferencias catalíticas entre las proteínas laaL. Utilizando condiciones estándar, se analizó la actividad específica de las proteínas laaL en presencia variable de IAA (Figura 10B, Tabla 6). La actividad cinética de la proteína laaL_{Psf-3} se ajustó a una cinética de Michaelis-Menten, obteniendo un V_{max} de $130.80 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$. Por el contrario, la proteína laaL_{Psn-1} obtuvo una V_{max} de $93.40 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ y se ajustó a un modelo de inhibición por sustrato, mostrando una constante de inhibición de $3.89 \mu\text{M}$, reduciendo su actividad en presencia de altas concentraciones de IAA. Además, la proteína laaL_{Psf-3} mostró una mayor afinidad por el IAA que la proteína laaL_{Psn-1}, obteniéndose una K_m de $2.95 \mu\text{M}$ y $8.75 \mu\text{M}$, respectivamente para estas proteínas. Por último, no se identificaron diferencias de actividad en la proteína laaL_{Psv-1} en presencia de cantidades variables de IAA, lo que sugiere que la actividad observada para esta enzima, calculada mediante la variación en la concentración de NADH en la mezcla de reacción, no es dependiente de la actividad de la proteína. Además, también se analizó la actividad específica de estas proteínas en presencia de cantidad variables de Lys (Figura 10C). Las proteínas laaL_{Psf-3} e laaL_{Psn-1} se ajustaron a un modelo de Michaelis-Menten, mientras que no se identificaron cambios de actividad en la proteína laaL_{Psv-1}. Sin embargo, se identificaron grandes diferencias en la V_{max} de estas proteínas, obteniendo valores de $187.30 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ y $31.22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ para las proteínas laaL_{Psf-3} e laaL_{Psn-1}, respectivamente.



Por último, las proteínas *laaL*_{Psf-3} e *laaL*_{Psn-1} mostraron diferencias en su eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m), siendo la de *laaL*_{Psf-3} 4 veces mayor en presencia de IAA y 10 veces mayor en presencia de Lys en comparación con *laaL*_{Psn-1}. La baja o nula actividad de *laaL*_{Psv-1} no permitió la determinación precisa de los

parámetros cinéticos de esta proteína. Los parámetros cinéticos obtenidos en los diferentes análisis bioquímicos se encuentran indicados en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis cinético de las proteínas *laaL*.

Proteína	Sustrato	V_{max}^a	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ min ⁻¹)
<i>laaL</i> _{Psf-3}	IAA	130.80	5945.45	2.95	2015.41
	Lisina	187.30	8513.64	2.15	3959.83
<i>laaL</i> _{Psn-1}	IAA	93.40	4245.45	8.75	485.19
	Lisina	31.22	1419.09	3.53	402.01
<i>laaL</i> _{Psv-1}	IAA	3.74	ND	2e-14	ND
	Lisina	3.74	ND	2e-14	ND

^a V_{max} : μmol min⁻¹ mg proteína⁻¹

^bND: No determinado

Inactivación del alelo *laaL*_{Psn} mediante inserción de YY

Mediante análisis comparativo de secuencias de aminoácidos, en este trabajo se han determinado las diferencias existentes entre las diferentes aloenzimas *laaL* (Figura 4). La ausencia de actividad en las aloenzimas *laaL*_{Psv-1} e *laaL*_{Psv-2} analizados en este trabajo podría deberse a modificaciones exclusiva en su secuencia. La aloenzima *laaL*_{Psv-1} se caracterizó por la presencia de varios residuos de Tirosina (Y) extras en comparación con el resto de aloenzimas analizadas. Trabajos anteriores, han demostrado la presencia de varias repeticiones del residuo Y (tripleto TAC) en múltiples cepas del patovar Psv, sugiriendo que su formación, atribuida a errores de replicación por deslizamiento de hebra de la DNA polimerasa, podría provocar la inactivación del gen (Matas et al., 2009). Para profundizar en esta hipótesis, se seleccionó la aloenzima *laaL*_{Psn-1} de Psn ESC23, cuya actividad ha sido demostrada en este trabajo. Utilizando la secuencia de la proteína *laaL*_{Psv-1} como molde, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida mediante la cual se introdujo en la proteína *laaL*_{Psn-1} dos residuos de Y en la misma posición descrita en *laaL*_{Psv-1}. El ensayo de actividad bioquímica de estas enzimas se llevó a cabo tal y como se describió anteriormente (Figura 11A).

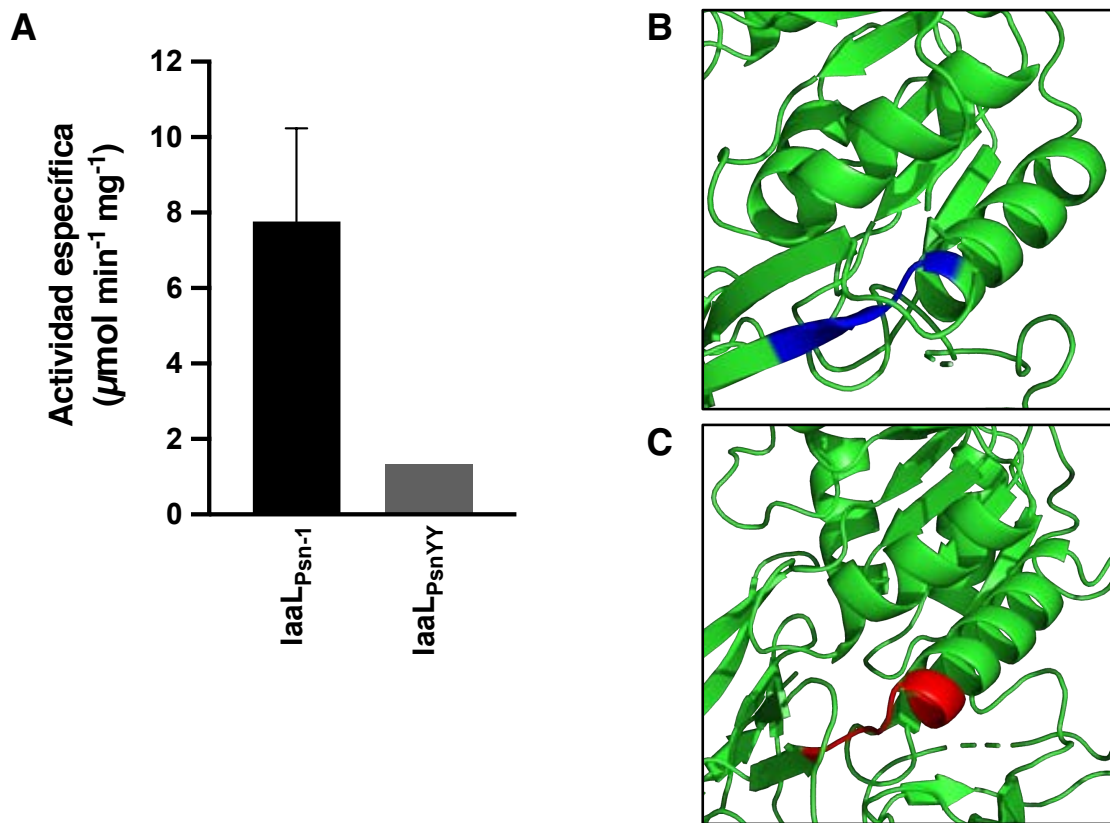


Figura 11. (A) Actividad específica de las proteínas *laaL_{Psn-1}* e *laaL_{PsnYY}* en presencia de 1mM de IAA y 5 mM de Lisina. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes, excepto para *laaL_{PsnYY}*. **(B)** Detalle del modelado 3D generado mediante homología utilizando Phyre2 del alelo *laaL_{Psn-1}* de Psn ESC23 y **(C)** del alelo *laaL_{Psv-1}* de Psv NCPPB 3335. En color se indica la región sin modificar (azul) y las modificaciones provocadas por las inserciones de Y (rojo).

La comparación de la actividad específica obtenida para la aloenzima *laaL_{PsnYY}*, con la obtenida para la aloenzima *laaL_{Psn-1}* silvestre, demostró que la inserción de 2 residuos de Y elimina la actividad de una enzima funcional. Por lo tanto, la presencia de residuos Y extra en la aloenzima *laaL_{Psv-1}*, estaría provocando la inactivación de este.

Con el fin de determinar el efecto de la adición de dos residuos de Y extras en la estructura de las proteínas *laaL* se analizó la estructura tridimensional de éstas. Debido a que la estructura cristalográfica de estas proteínas no se encuentra actualmente disponible, se utilizó el software Phyre2 para generar un modelo por

homología de las aloenzimas codificadas en los alelos *iaaL_{Psn-1}* de Psn ESC23 (Figura 11B) e *iaaL_{Psv-1}* de Psv NCPPB 3335 (Figura 11C). La presencia de dos residuos extra de Y provocan modificaciones en la estructura secundaria de la proteína *iaaL_{Psv-1}*, ya que se observó un alargamiento de la región en disposición de alfa-hélice, la desaparición de una región en disposición de lámina-beta y, en consecuencia, un aumento de la región sin estructura secundaria. Por lo tanto, la desorganización de la estructura secundaria podría provocar cambios en su estructura terciaria que dificultase el acceso del sustrato al sitio catalítico de estas enzimas, generando deficiencias funcionales.

Conjugación de IAA en *P. savastanoi*

En plantas, la conjugación del IAA es un recurso ampliamente utilizado y se han identificado conjugados de IAA con Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Alanina (Ala), Glicina (Gli), Valina (Val) y Leucina (Leu), entre otros, en una amplia variedad de plantas (Ljung, 2013; Rampey et al., 2004). Sin embargo, se desconoce su producción en bacterias fitopatógenas, siendo el IAA-Lys el único conjugado descrito hasta la fecha. Con el fin de analizar la producción de otros conjugados de IAA por *P. savastanoi*, se seleccionó la cepa Psv NCPPB 3335, la cual no produce IAA-Lys en concentraciones detectables. Se incubó esta cepa en medio MG suplementado con Trp hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.5. Posteriormente, se determinó y cuantificó la presencia de conjugados aminoacídicos en el sobrenadante de estos cultivos mediante UPLC-TQD (Tabla 7).

La cuantificación de los conjugados se realizó en dos experimentos independientes utilizando 2 réplicas biológicas (4 réplicas técnicas) y 3 réplicas biológicas (6 réplicas técnicas) en los experimentos 1 y 2, respectivamente. En ambos, se detectó la presencia de IAA conjugado a los aminoácidos Ala, Trp, Asp e Isoleucina (Ile). Mientras que también se detectó el compuesto IAA-Fenilalanina (IAA-Phe) en el segundo ensayo realizado.

Tabla 7. Detección de conjugados aminoacídicos de IAA en Psv NCPPB 3335.

Compuesto	Transición	ESI ^a	RT (min)	Concentración (ng/mg PS)	
				Exp 1	Exp 2
IAA-Ala	245.2>156.2	-	2.79	213.1 ± 7.41	374.44 ± 155.04
IAA-Trp	360.2>203.2	-	3.28	175.9 ± 28.15	508.33 ± 37.97
IAA-Phe	321.2>164.1	-	3.38	0.3 ± 0.19	22.41 ± 6.77
IAA-Asp	289.2>132.0	-	2.85	57.05 ± 19.77	77.35 ± 20.61
IAA-Ile	287.4>130.1	-	3.25	81.5 ± 29.33	54.26 ± 2.88

^aESI: Modo de ionización.

^bNo detectado.

Por lo tanto, aunque Psv NCPPB 3335 no produce IAA-Lys y su aloenzima *laaL*_{Psv-1} no responde a concentraciones de IAA ni de L-Lys, sintetiza otros conjugados aminoacídicos de IAA en medio con Trp. Sin embargo, en bacterias fitopatógenas el único gen caracterizado implicado en la conjugación de IAA a otros compuestos es el gen *iaaL* de *P. savastanoi*. En consecuencia, las diversas aloproteínas *laaL* analizadas en este trabajo podría estar participando en la conjugación del IAA a múltiples aminoácidos. Por ello, se analizó la actividad de las aloenzimas *laaL*_{Psf-3}, *laaL*_{Psn-1} e *laaL*_{Psv-1} en presencia de 19 aminoácidos: Ala, Arginina (Arg), Asparagina (Asn), Asp, Cisteína (Cis), Glutamina (Gln), Glu, Gli, Histidina (His), Ile, Leu, Lisina (Lys), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Prolina (Pro), Serina (Ser), Treonina (Thr), Trp y Val. El análisis bioquímico se realizó tal y como se detalla en material y métodos, siguiendo condiciones estándar y utilizando cada aminoácido a una concentración de 5 mM. Las aloenzimas *laaL*_{Psf-3} e *laaL*_{Psn-1} mostraron actividad únicamente en presencia de L-Lys (Figura 12). Además, ambas aloenzimas mostraron diferencias de actividad similares a las descritas anteriormente. Por el contrario, la aloenzima *laaL*_{Psv-1} no mostró actividad en presencia de ningún aminoácido ensayado, confirmando la inactividad de esta variante alélica del gen *iaaL*. Por lo tanto, la ausencia de actividad por parte de todas las aloenzimas ensayadas en presencia de aminoácidos diferentes de Lys, sugiere la presencia de enzimas no descritas hasta la fecha en el genoma de Psv NCPPB 3335, con la capacidad de producir los conjugados detectados anteriormente (Tabla 7).

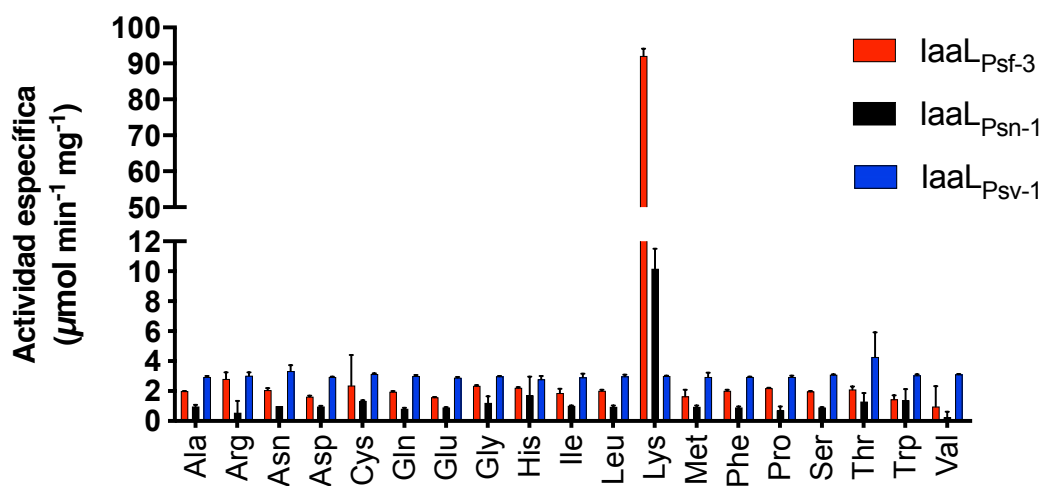


Figura 12. Actividad específica de las proteínas *laaL* codificadas en los alelos *laaL*_{Psf-3}, *laaL*_{Psv-1}, e *laaL*_{Psn-1} de las cepas Psf NCPPB 1006, Psv NCPPB 3335 y Psn ESC23, respectivamente. El ensayo bioquímico se realizó en presencia de 1mM de IAA y 5mM del correspondiente aminoácido. Las barras representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Comprender los factores que determinan la adaptación de patógenos a sus huéspedes resulta crucial para diseñar estrategias específicas de control de enfermedades, sin afectar la viabilidad de microorganismos beneficiosos. En *P. savastanoi* se han identificado múltiples factores de virulencia implicados en el proceso de infección, siendo esenciales la funcionalidad de un sistema de secreción tipo III o la producción de fitohormonas (Caballo-Ponce et al., 2017a). El gen *iaaL*, implicado en la transformación del IAA en IAA-Lys, un conjugado aminoacídico biológicamente menos activo que el IAA, se ha implicado en la virulencia de cepas del complejo *P. syringae*. En este sentido, se especula que la transformación del IAA en IAA-Lys en bacterias productoras de IAA, podría ser un mecanismo de control de los niveles de IAA libre. Sin embargo, el papel de este gen en la virulencia de bacterias de este complejo es controvertido, puesto que mutantes de este gen en Pto DC3000 (Castillo-Lizardo et al., 2015) y en Psn ESC23 (Cerboneschi et al., 2016) muestran una virulencia reducida y aumentada, respectivamente.

En este trabajo se ha demostrado que todas las cepas de *P. savastanoi* analizadas contienen al menos un alelo del gen *iaaL*, de acuerdo con trabajos anteriores, donde se describió una amplia distribución de este gen entre la mayoría de las cepas del complejo *P. syringae* (Glickmann et al., 1998; Xin et al., 2018). Muchas de estas cepas carecen de los genes *iaaM* e *iaaH*, implicados en la principal ruta de producción de IAA en bacterias fitopatógenas, por lo que no producen altas concentraciones de IAA. Por lo tanto, la presencia del gen *iaaL* podría ser importante en la regulación de los niveles de IAA libre citoplásmicos o excretados para el correcto desarrollo de la infección, ya que se ha demostrado la capacidad del IAA de provocar cambios en el transcriptoma de *P. savastanoi* e incluso regular la expresión de diferentes factores de virulencia (Capítulo 3).

Filogenia y evolución de aloenzimas IAAL en el complejo *P. syringae*

Hasta la fecha, se habían identificado 3 variantes alélicas del gen *iaaL* (*iaaL_{Psn}*, *iaaL_{Psv}* e *iaaL_{Pto}*) en el complejo *P. syringae* (Castillo-Lizardo et al., 2015; Matas et al., 2009). Sin embargo, el análisis filogenético realizado con la secuencia de aminoácidos de las diferentes proteínas *iaaL* identificadas en los genomas hoy disponibles de *P. savastanoi*, ha permitido la identificación de tres nuevas aloenzimas (*iaaL_{Psf-1}*, *iaaL_{Psf-2}* e *iaaL_{Psf-3}*) exclusivas de las cepas del pv. *fraxini*, las cuales carecen de los genes *iaaM* e *iaaH* y no son tumorigénicas (Figura 2). Mediante análisis RFLP de la secuencia de los alelos que las codifican, se encontraron diferencias con los alelos *iaaL_{Psn}* e *iaaL_{Psv}* (Figura 3), aunque el análisis filogenético reveló la agrupación de estas tres aloenzimas en una rama monofilética que incluye a todas las aloenzimas del grupo *iaaL_{Psn}* (Figura 2). De hecho, con la excepción de *iaaL_{Pto}*, todas las aloenzimas *iaaL* funcionales identificadas en este trabajo se incluyen en esta rama, mientras que las del grupo *Psv* parecen ser inactivas. Además, el análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de las proteínas *iaaL* presentes en *P. savastanoi*, identificó dos residuos exclusivos de las 3 nuevas proteínas de *iaaL_{Psf}* y ausentes en todas las demás, estableciéndose así la definición de un nuevo alelo del gen *iaaL* en el complejo *P. syringae* (Figura 2).

En el Capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral, se ha identificado un listado de genes exclusivos presentes y ausentes que podrían condicionar el rango de huésped de los diferentes patovares aislados de huéspedes leñosos de *P. savastanoi*. Sin embargo, aunque las diferencias en el rango de huésped presentes entre diferentes patovares se asocian generalmente con la ganancia o pérdida de genes, estudios recientes han relacionado la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con cambios drásticos en la especificidad de huésped (Singletary et al., 2016; Viana et al., 2015; Yue et al., 2015). La presencia de SNP, e incluso de pequeñas inserciones o deleciones en las secuencias codificantes de factores de virulencia en *P. aeruginosa* o *Salmonella entérica*, se han descrito como fundamentales en el proceso de adaptación a de estos patógenos su huésped y, por lo tanto, para el

establecimiento de la enfermedad (Feasey et al., 2012; Jorth et al., 2015; Marvig et al., 2015; Okoro et al., 2012; 2015). Las nuevas secuencias *iaaL*_{Psf} descritas en este trabajo, pertenecen de manera exclusiva al pv. *fraxini*, el cual presenta un rango de huésped muy restringido (Iacobellis et al., 1998; Janse, 1981; Moreno-Pérez et al., 2020). Por lo tanto, es posible que la capacidad de Psf de producir únicamente síntomas en fresno no solo se deba a la codificación de genes específicos en este patovar (Tabla 3 y 4 del Capítulo 1), sino también a la variabilidad alélica de los genes que codifican sus factores de virulencia.

El contexto genómico del gen *iaaL* en *P. savastanoi* reveló un elevado grado de sintenia, encontrando el gen *matE* situado aguas arriba de éste, de acuerdo con lo descrito anteriormente en otras cepas de *P. syringae* (Castillo-Lizardo et al., 2015). Además, los genes *iaaL* podrían haber sido adquiridos por fenómenos de transferencia horizontal en *P. savastanoi*, ya que: 1) el agrupamiento filogenético de las cepas de *P. savastanoi* en base a la secuencia de las proteínas IaaL (Figura 2) no se corresponde con el obtenido en el análisis filogenético del conjunto de genes presentes en todas las cepas de *P. savasanoi* (Figura 3 del Capítulo 1), 2) la mayoría de los genes *iaaL* están presentes en plásmidos, aunque en Psv estos genes suelen tener una disposición cromosómica (Matas et al., 2009), lo que podría estar relacionado con una mayor estabilidad y con un papel relevante en el proceso de infección, 3) las regiones genómicas de las dos copias del gen *iaaL* presentes en Psv NCPPB 33335 se identificaron como islas genómicas y 4) algunas copias del gen *iaaL* presentaban secuencias de inserción flanqueando las regiones genómicas o elementos genéticos móviles como transposasas en sus proximidades (datos no mostrados).

Producción de IAA-Lys en cepas de *P. savastanoi*

En la interacción planta-patógeno, el IAA desempeña un papel fundamental en el proceso de patogénesis. La mayoría de las bacterias fitopatógenas gram negativas pertenecientes al complejo *P. syringae* producen IAA, incluso aquellas que no inducen la producción de síntomas hiperplásicos (Duca et al., 2014a). En este trabajo, se ha analizado la producción de IAA en 8 cepas representativas de

todos los patovares de *P. savastanoi* y en Pto DC3000, demostrando que la producción de IAA es una característica presente en todas ellas, incluyendo cepas tumorigénicas (Psv NCPPB 3335, Psv DAPP-PG772, Psn ESC23, Psn CFBP 5067, Psr CECT 4861 y Psm Ph3) y no tumorigénicas (Psf NCPPB 1006 y Pto DC3000). Además, aunque la capacidad de producción de IAA en las cepas de *P. savastanoi* y Pto DC3000 ya era conocida con anterioridad, en este capítulo se ha descrito por primera vez la producción de IAA en la cepa Psm Ph3, aislada de dipladenia (Caballo-Ponce, 2017).

Por otro lado, no se encontró una correlación entre la capacidad de producir IAA y la capacidad de producción de IAA-Lys ya que, la mayoría de las cepas tumorigénicas y no tumorigénicas produjeron el conjugado, con la excepción de las cepas Psv NCPPB 3335 (*iaaL*_{Psn-2}, *iaaL*_{Psv-1}), Psr CECT 4861 (*iaaL*_{Psn-1}) y Psm Ph3 (*iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psv-2}), productoras de altas concentraciones de IAA (Figura 5). Sin embargo, el que no se detectase IAA-Lys en los cultivos de estas cepas no es sorprendente, ya que: 1) la cepa Psv NCPPB 3335 codifica un alelo *iaaL*_{Psn-2} que contiene una deleción en el extremo N-terminal (Figura 3), por lo que la proteína podría no ser funcional, 2) no se detectó expresión del alelo *iaaL*_{Psn-2} en Psv NCPPB 3335 (Figura 6), 3) los niveles de expresión del alelo *iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psv-1} e *iaaL*_{Psv-2} en estas cepas fueron inferiores a los obtenidos para los alelos codificados en las cepas productoras del conjugado (Figura 6), lo cual contrasta con la alta identidad de las regiones promotoras de estos genes. La transcripción de estos genes, está regulada por *hrpL*, un gen que codifica el principal regulador positivo encargado de la inducción de genes que presentan una caja *hrp* en su región promotora, como es el caso de los genes *iaaL* (Castillo-Lizardo et al., 2015; Cerboneschi et al., 2016). Por lo tanto, pese a la gran conservación de las regiones promotoras y, por lo tanto, de la caja *hrp* presente en éstas, la regulación por *hrpL* podría ser variable entre las diferentes cepas. El gen *hrpL* se encuentra regulado a su vez por diferentes factores, los cuales pueden variar de una cepa a otra, provocando cambios en la regulación de *hrpL* y por tanto de los genes *iaaL*. Además, la transcripción de estos genes se analizó en medio de cultivo MG, en el cual no se produce la inducción del T3SS, de *hrpL* ni de la mayoría de los genes que codifican una caja *hrp*, por lo que la

transcripción de los genes *iaaL* en ausencia de *hrpL* sugiere la presencia de otros factores de transcripción no conocidos que podrían participar en la inducción de su expresión.

Diferencias en la actividad de aloenzimas *iaaL*

En este trabajo, utilizando diferentes abordajes experimentales, se ha demostrado que los alelos *iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psf-3} e *iaaL*_{Pto} son los principales responsables de la producción de IAA-Lys en el grupo de bacterias analizadas y en las condiciones utilizadas. Además, los diferentes análisis realizados en este trabajo han determinado variaciones en la actividad de las diferentes aloenzimas codificadas por estos alelos. Los estudios genómicos a gran escala de patógenos bacterianos han revelado que el proceso de adaptación a un nuevo entorno puede implicar la adquisición de mutaciones puntuales en la secuencia de determinados genes implicados en virulencia, pudiendo también adquirirse la pérdida de función. Por lo tanto, la variabilidad funcional observada entre los diferentes alelos del gen *iaaL* podría deberse a la adquisición mediante transferencia horizontal de los diferentes genes *iaaL* y a posteriores mutaciones ventajosas seleccionadas durante el proceso de adaptación al nicho correspondiente de cada cepa. El grupo *iaaL*_{Psf}, al que pertenece *iaaL*_{Psf-3}, se encuentra formando exclusivamente por secuencias de cepas de Psf (Figura 2), productoras de niveles de IAA muy inferiores a los de las cepas del resto de los patovares de *P. savastanoi*. El hecho de que *iaaL*_{Psf-3} muestre una elevada afinidad por el IAA ($K_m = 2.95 \mu\text{M}$) y una eficiencia catalítica 4 veces mayor que la de la proteína *iaaL*_{Psn-1} ($K_m = 8.75 \mu\text{M}$), podría estar relacionado con la adaptación de la secuencia de *iaaL*_{Psf-3}, y quizás de otras aloenzimas del grupo *iaaL*_{Psf}, a bajas concentraciones de IAA. Por el contrario, la afinidad por el IAA, actividad e inhibición por sustrato identificada en *iaaL*_{Psn-1} (Figura 10; Tabla 6), podría reflejar adaptaciones a niveles elevados de IAA endógeno en las aloenzimas del grupo *iaaL*_{Psn}.

La expresión heteróloga en Psv NCPPB 3335 de la aloenzima *iaaL*_{Pto} de Pto DC3000, cuya implicación en la producción del conjugado IAA-Lys se ha

sugerido en este trabajo (Figura 5D), no redujo significativamente los niveles de IAA (Figura 8A), ni indujo cambios detectables sobre la longitud de las raíces de *A. thaliana* (Figura 7A). Resultados preliminares no incluidos en esta Tesis Doctoral sugieren que, a pesar de los bajos niveles de IAA producidos *in vitro* por Pto DC3000 (Figura 5A), *laaL_{Pto}* muestra una baja actividad específica en presencia de IAA, comportamiento opuesto al obtenido para *laaL_{Psf}*, presente en cepas de Psf también productoras de bajos niveles de IAA. Sin embargo, su diferente actividad específica podría deberse a las diferencias en el metabolismo del IAA y su señalización desarrolladas por Pto DC3000, patógeno foliar de tomate, y por las cepas de Psf, que inducen excrecencias en plantas de fresno lignificadas (Moreno-Pérez et al., 2020).

Por otro lado, también se analizó la actividad de dos proteínas del grupo *laaL_{Psv}*, no observándose alteraciones del crecimiento del eje radicular en el ensayo biológico realizado en *A. thaliana*, para las cepas de Psv NCPPB 3335 que expresaban las aloenzimas *laaL_{Psv-1}* e *laaL_{Psv-2}* con respecto a la cepa silvestre (Figura 7). Además, la expresión heteróloga del alelo *iaaL_{Psv-1}* en Psv NCPPB 3335 no produjo una retirada significativa de IAA del medio y la producción de IAA-Lys obtenida para este alelo fue residual (Figura 8). En la línea de los resultados obtenidos, el análisis cinético realizado con la proteína *laaL_{Psv-1}* mostró una actividad específica nula y una ausencia de respuesta a variaciones en la concentración de IAA, lo cual imposibilitó el cálculo de los parámetros cinéticos de dicha enzima (Figura 10; Tabla 6). Es posible que la inactivación de las aloenzimas del grupo *laaL_{Psv}* se deba a mutaciones de pérdida de función seleccionadas durante la interacción de las cepas de Psv con su huésped, el olivo. Las mutaciones de pérdida de función pueden generarse mediante diversos procesos, entre los que destaca la repetición de tripletes de nucleótidos en la secuencia de un gen como resultado del mal emparejamiento de la cadena de DNA durante el proceso de replicación. Este mecanismo, se ha relacionado con la adaptación de bacterias fitopatógenas a cambios ambientales (Bichara et al., 2006; Jock et al., 2003). La inactivación de alelos *iaaL_{Psv}*, podría resultar beneficiosa o neutra para la infección y supervivencia de Psv en ciertos cultivares

de olivo. De hecho, se ha descrito que la mayoría de las cepas de Psv codifican varias repeticiones del triplete TAC (Tirosina) en la secuencia de sus alelos *iaaL_{Psv}* (Figura 4; Matas et al., 2009). Por otro lado, la inserción de dos tripletes TAC en la secuencia de un alelo *iaaL_{Psn-1}* funcional, provocó la inactivación de la enzima (Figura 11), resultado que apoya la hipótesis de que las repeticiones del triplete TAC en la secuencia de los alelos *iaaL_{Psv}* son responsables de su inactivación. Aunque el alelo *iaaL_{Psv-2}*, también codificante de una enzima no funcional (Figura 7), no codifica inserciones del triplete TAC (Figura 4), las diferencias en su secuencia con respecto al resto de alelos podrían ser también responsables de su inactivación. Por lo tanto, estos resultados sugieren que, además del mecanismo de inactivación descrito anteriormente, los alelos del grupo *iaaL_{Psv}* han sufrido diferentes mutaciones que podrían haberse seleccionado por resultar beneficiosa la inactivación de las enzimas que codifican durante la interacción con olivo.

Psv NCPPB 3335 acumula diferentes conjugados de IAA

Por primera vez, en este trabajo se ha descrito la producción de conjugados de IAA en bacterias fitopatógenas diferentes de IAA-Lys. Bajo las condiciones ensayadas, se ha detectado la biosíntesis de IAA conjugado con los aminoácidos Ala, Trp, Phe, Asp, Ile y Glu por Psv NCPPB 3335 (Tabla 7). Además, también hemos identificado que esta cepa sintetiza otros conjugados no aminoacídicos del IAA, como el ácido oxoindol-3-acético (OxIAA), una variante oxidada del IAA (datos no mostrados). Inicialmente, barajamos la posibilidad de que las enzimas *laaL* estuviesen también implicadas en la síntesis de algunos de estos conjugados, o que las enzimas *laaL_{Psv}* mostrasen mayor preferencia por otro sustrato aminoacídico. Sin embargo, el análisis de la actividad específica realizada con las proteínas *laaL_{Psn-1}*, *laaL_{Psf-3}* e *laaL_{Psv-1}* en presencia de los 21 aminoácidos esenciales, demostró que únicamente las aloenzimas *laaL_{Psn-1}* e *laaL_{Psf-3}* mostraban actividad en presencia de Lys, datos que no apoyan las hipótesis anteriores (Figura 12). Por lo tanto, las enzimas *laaL* no parecen estar implicadas en la síntesis de los conjugados aminoacídicos identificados en este

trabajo y diferentes del IAA-Lys, siendo necesarios futuros experimentos para determinar las enzimas encargadas de la síntesis de dichos compuestos.

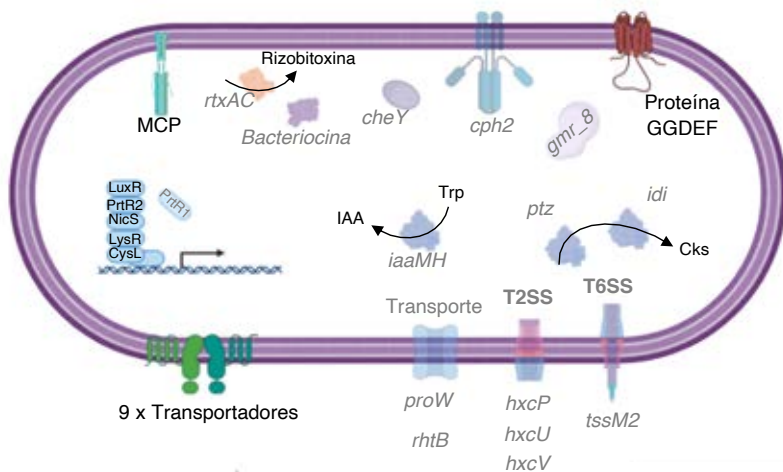
En plantas, la forma predominante del IAA es la conjugada, estando disponible de manera libre únicamente el 10% de este compuesto durante el crecimiento vegetativo, donde la conjugación de aminoácidos juega un papel importante en el metabolismo del IAA (Normanly, 1997). Algunos conjugados, como el IAA-Ala, funcionan como reserva temporal de IAA y que puede ser hidrolizado para liberar IAA libre cuando sea necesario, mientras que otros conjugados como el IAA-Asp parecen secuestrar el IAA como paso previo al inicio del proceso catabólico de su degradación (Staswick, 2005). En bacterias fitopatógenas, aunque se especula que la función predominante de la conjugación de IAA es el control de las concentraciones de IAA libre, la presencia de IAA-Asp en el medio de cultivo de Psv NCPPB 3335, sugiere un papel similar de este conjugado en la degradación del IAA. Sin embargo, en *P. savastanoi*, se desconocen enzimas con capacidad de hidrolizar la unión del IAA a un conjugado. En bacterias, únicamente se han descrito enzimas con actividad hidrolasa para los conjugados IAA-Asp e IAA-Ala, en *Enterobacter agglomerans* y *Arthrobacter llicis*, respectivamente (Chou and Huang, 2005; Chou et al., 1996). Por lo tanto, Psv NCPPB 3335 podría presentar en su genoma enzimas con capacidad de metabolizar el IAA-Lys producido, así como el resto de conjugados descritos en este trabajo.

| DISCUSIÓN GENERAL |

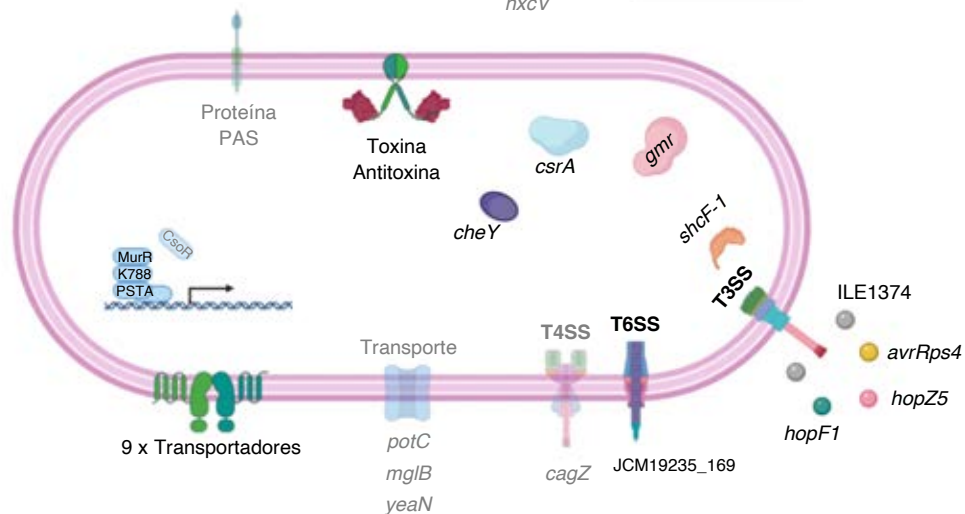
DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de los últimos años, la especie *Pseudomonas savastanoi* se ha propuesto como un modelo excelente para el estudio de las interacciones moleculares que intervienen en la infección de huéspedes leñosos por bacterias fitopatógenas. Nuestro grupo de investigación históricamente ha trabajado principalmente con la cepa modelo *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335, patógena de olivo (Caballo-Ponce et al., 2017a; Ramos et al., 2012). En trabajos recientes, hemos caracterizado la sintomatología causada por 20 cepas de *P. savastanoi* pertenecientes a 4 de los patovares de esta especie de huéspedes leñosos, delimitando sus rangos de huéspedes e identificando una colección de genes presentes exclusivamente en cepas capaces de causar tumores (Moreno-Pérez et al., 2020). El Capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral, contiene resultados adicionales a los mostrados en la publicación antes mencionada, que amplían el análisis genómico comparativo realizado incluyendo el genoma de la cepa Ph3 aislada de *Mandevilla sanderi*, y que apoyan la evolución conjunta de esta cepa junto a las cepas de *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) y la definición del nuevo patovar *P. savastanoi* pv. *mandevillae* (Psm) (Eltlbany et al., 2012). Las poderosas herramientas de genómica comparativa disponibles actualmente, nos han permitido la construcción de una filogenia robusta utilizando el conjunto de genes presentes en las 21 cepas de *P. savastanoi* analizadas en este trabajo, demostrando una correspondencia entre la evolución genética de las diferentes cepas y la especificidad de huésped de los diferentes patovares. Además, mediante el uso de dos estrategias complementarias, se ha identificado un repertorio de genes específicos de patovar que podrían estar relacionados con la especificidad de huésped en las cepas de *P. savastanoi* (Figura 1). De todos los elementos identificados, el repertorio de efectores del T3SS es el único identificado como uno de los determinantes más relevantes del rango de huésped en el complejo *P. syringae* (Baltrus et al., 2011).

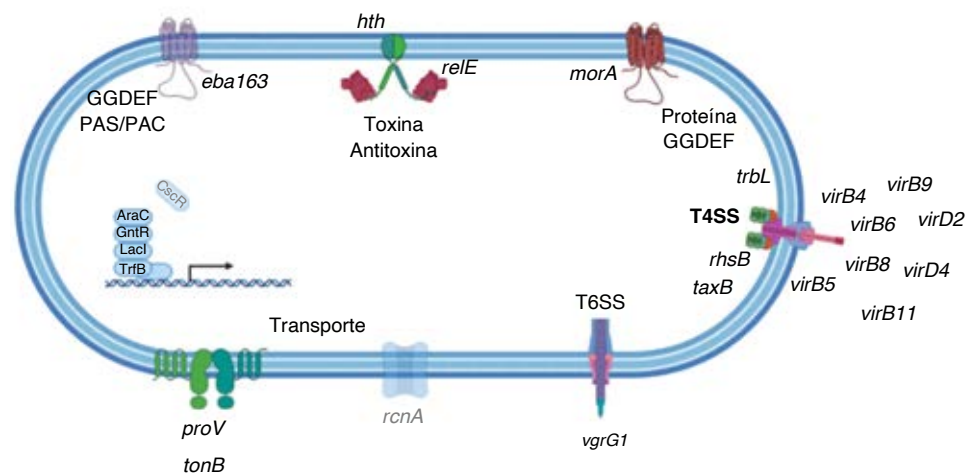
Psf



Psr



Psm



Psn-Psm

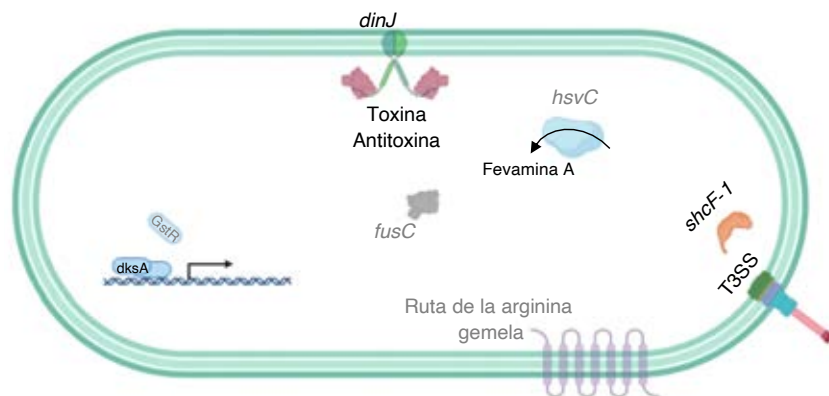


Figura 1. Representación esquemática de los genes exclusivos presentes (negro) y ausentes exclusivos (gris) identificados mediante genómica comparativa en los patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos. Psf, Psr y Psm, *P. savastanoi* pv. *fraxini*, *retacarpa* y *mandevillae*, respectivamente. T2SS, Sistema de secreción tipo II; T3SS, Sistema de secreción tipo 3; T4SS, Sistema de secreción tipo 4; T6SS, Sistema de secreción tipo 6. MCP, del inglés, *Methyl-accepting chemotaxis protein*; GGDEF, diguanilato ciclase fosfodiesterasa; IAA, ácido indol-3-acético; Trp, triptófano. Figura creada con BioRender.com.

Sin embargo, también se identificaron otros factores que podrían estar implicados en virulencia y especificidad de huésped, como la presencia exclusiva de diferentes genes *vir* formando un T4SS casi completo en Psm, o de genes reguladores (exclusivos o ausentes) en los patovares de *P. savastanoi*, como proteínas encargadas de la transducción de señales o factores de transcripción entre. Por otro lado, también destaca la presencia/ausencia exclusiva de transportadores de 8 familias diferentes en ciertos patovares, así como la ausencia exclusiva en las cepas de Psn y Psm del gen *hsvC*, que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de la fitotoxina fevamina A.

Por último, la identificación de genes ausentes en los genomas de las cepas no tumorigénicas de *P. savastanoi*, pertenecientes al patovar *fraxini* (Psf) e inductoras de excrecencias, nos ha permitido generar hipótesis sobre factores novedosos que podrían estar implicados en la formación de tumores por las cepas incluidas en los otros 4 patovares. De acuerdo con estudios anteriores (Gardan et al., 1992a; Iacobellis et al., 1998), hemos determinado que las cepas no tumorigénicas carecen del operón *iaaMH*, implicado en la biosíntesis de indol-3-acético (IAA), un factor de patogenicidad requerido para la formación de tumores por las cepas de Psv y Psn (Aragón et al., 2014; Comai et al., 1982). Además, el gen *ptz*, implicado en la producción de citoquininas, tampoco se encontró en las cepas de Psf, al igual que en algunos genomas de Psv y Psn. Sin embargo, trabajos recientes han descrito que cepas de Psn carentes del gen *ptz* inducían en plantas de olivo la formación de tumores similares a los producidos por cepas de Psn portadoras del gen *ptz*, sugiriendo que las citoquininas podrían no ser imprescindibles para la inducción de síntomas completos por Psn (Moreno-Pérez et al., 2020). Las cepas de Psf también

presentan hasta 5 factores de transcripción exclusivos de las cepas de este patovar y carecen de dos genes implicados en la producción de rizobitoxina, presentes en el resto de patovares. Por lo tanto, proponemos su producción como un nuevo determinante involucrado en la formación de tumores en las cepas tumorigénicas de *P. savastanoi*.

La mayoría de las cepas del complejo *P. syringae* producen IAA a partir del triptófano (Trp) utilizando diferentes rutas. Sin embargo, en muchas de las cepas productoras de IAA se desconocen los genes relacionados con la biosíntesis de esta fitohormona, como es el caso de las cepas de Psv (Glickmann et al., 1998). Trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de investigación, demostraron que un mutante de los dos operones *iaaMH* de Psv NCPPB 3335 (Psv $\Delta iaaMH1-2$), muestra una reducción significativa de la producción de IAA, aunque continúa detectándose una producción basal de IAA en cultivos de esta cepa (Aragón et al., 2014). El Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral ha abordado, mediante estrategias genómicas, transcriptómicas y metabolómicas, la producción de IAA en Psv $\Delta iaaMH1-2$. El uso de estas técnicas ha permitido demostrar que proteínas con dominios aldehído deshidrogenasa (ALD) se encuentran implicadas en el metabolismo del IAA en Psv $\Delta iaaMH1-2$, de acuerdo con trabajos anteriores en los que se demostró que estas enzimas son las responsables de la mayoría del IAA producido a partir de indol-3-acetaldehído (IAAld) en la bacteria patógena Pto DC3000 (McClerklin et al., 2018). Sin embargo, los mutantes ALD construidos en Psv en esta Tesis Doctoral y en Pto (McClerklin et al., 2018) no reducen completamente los niveles de IAA. En este trabajo se han identificado múltiples proteínas con dominios aldehído deshidrogenasa, cuya función principal podría ser independiente de la biosíntesis de IAA. Nuestros datos sugieren que en la producción de IAA por bacterias del complejo *P. syringae*, incluida *P. savastanoi*, podrían intervenir múltiples proteínas con actividad aldehído deshidrogenasa, que en presencia de Trp, producen cantidades detectables de IAA. Trabajos recientes han demostrado que diferentes enzimas, como las oxidoreductasas dependientes de NADP, pueden actuar como aldehído deshidrogenasas (Koppaka et al., 2012;

Napora-Wijata et al., 2014), por lo que estas proteínas podrían estar también implicadas en la biosíntesis de IAA. Por lo tanto, además de a través de la ruta de la indol-3-acetamida, la síntesis de IAA en *P. savastanoi* podría realizarse a través de la conversión del Trp en IAAld, mediante la cadena lateral de oxidación del Trp (TSO) y, posteriormente, el IAAld podría transformarse en IAA mediante la acción de aldehído deshidrogenasas y/o oxidoreductasas dependientes de NADP.

Por otro lado, el análisis metabólico realizado en Psv *ΔiaaMH1-2* ha demostrado la presencia de otros compuestos intermediarios del metabolismo del IAA en el sobrenadante de cultivos de esta cepa, para los cuales no se han descrito genes implicados en su síntesis, como indol-3-acetamida (IAM) o indol-3-acetonitrilo (IAN). La presencia de IAM en esta cepa es sorprendente, ya que carece de los genes *iaaM* encargados de su síntesis. Por lo tanto, el IAM se estaría produciendo a través de enzimas no descritas hasta la fecha, o de manera indirecta como subproducto del metabolismo de otros compuestos. En Psv tampoco se ha descrito la presencia de genes encargados de la síntesis de IAN, sugiriendo que su producción podría llevarse a cabo a través de rutas independientes del Trp, ya que: 1) trabajos anteriores han descrito la pérdida de los genes implicados en su síntesis en múltiples cepas de *P. syringae* procedentes de cultivos agrícola (Howden et al., 2009), 2) los niveles de IAN no aumentaron tras incubar la cepa Psv *ΔiaaMH1-2* en presencia de Trp, y 3) en plantas se ha propuesto que el IAN podría metabolizarse en IAA a través de rutas independientes del Trp utilizando como intermediario la molécula de indol (Nonhebel, 2015; Wang et al., 2015), la cual también se acumula en Psv *ΔiaaMH1-2*.

Por lo tanto, la construcción de dobles, triples, cuádruples (*aldA*, *aldB*, *aldC* y *aldD*) y sucesivos mutantes en genes anotados como aldehído deshidrogenasa en Psv NCPPB 3335, podrá arrojar nuevas perspectivas sobre la implicación de estas proteínas en la producción de IAA. Sin embargo, la presencia de múltiples intermediarios de la síntesis de IAA producidos en Psv *ΔiaaMH1-2*, cuyos genes

de biosíntesis se desconocen, pone en entredicho la posibilidad de obtener un mutante de producción nula de IAA en estas bacterias, reforzando el papel de esta fitohormona en la interacción de bacterias fitopatógenas con sus huéspedes.

Hasta la fecha, la regulación génica por IAA en bacterias se ha abordado en diferentes trabajos (Bianco et al., 2006a; Bianco et al., 2006b; Donati et al., 2013; Van Puyvelde et al., 2011; Yang et al., 2007; Yuan et al., 2008), siguiendo un planteamiento similar al realizado en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, en el cual se utilizó la cepa Psv *ΔiaaMH1-2*, cuya producción de IAA se encuentra reducida más del 90% con respecto a la cepa silvestre. En este análisis, hemos identificado la presencia repetida de una secuencia corta (TGTCNT) presente en el 86% y en el 40% de los promotores de los genes sobreexpresados y reprimidos, respectivamente, en la cepa Psv *ΔiaaMH1-2*. En plantas, se ha descrito la existencia de factores de respuesta a auxinas (ARF) que, mediante la unión a estas secuencias, actúan como reguladores transcripcionales positivos o negativos en respuesta a la concentración de IAA (Hagen and Guilfoyle, 2002). Hasta la fecha, estas cajas únicamente habían sido descritas en bacterias en dos promotores de genes relacionados directamente con la síntesis de IAA (Cerboneschi et al., 2016; Vande Broek et al., 1999), por lo que la presencia de estas cajas de regulación en el promotor de más genes bacterianos no relacionados con la producción de IAA, abre la posibilidad de que se produzca una regulación similar a la de plantas en bacteria. Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha ningún ARF en bacterias. Por otro lado, en el análisis transcriptómico también incluido en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, se ha identificado la secuencia de un pequeño RNA no codificante (sRNA) reprimido a bajas concentraciones de IAA. Estos sRNA son transcritos, aunque no se traducen a proteínas, y participan en la regulación de diversas funciones, habiéndose descrito su capacidad de regular la expresión de factores de virulencia (Massé et al., 2003; Wassarman, 2002). La mayoría de los sRNA funcionan interactuando directamente con proteínas o alterando la transcripción, la traducción o la estabilidad del RNA mensajero (Storz, 2002). Por lo tanto, el

sRNA identificado podría actuar regulando la expresión de otros genes, activando o reprimiendo la traducción de los transcritos o dirigiendo la degradación del RNA mensajero de éstos. Mediante análisis bioinformático, se han identificado múltiples dianas posibles, aunque no perfectas, de este ncRNA, lo cual concuerda con trabajos anteriores en los que se ha demostrado que en bacterias los ncRNA no suelen complementar de manera perfecta con el RNA mensajero diana, permitiéndole así potencialmente regular múltiples genes (Waters and Storz, 2009). Entre las posibles dianas identificadas para este ncRNA se identificaron genes reguladores o transportadores, sugiriendo un papel relevante en la regulación de genes regulados por auxinas, aunque futuros trabajos serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

El análisis transcriptómico realizado en el Capítulo 3 utilizando la comparativa de la cepa Psv *ΔiaaMH1-2* con la cepa silvestre, identificó una pequeña proporción del genoma alterado, encontrándose el 0.2% de los genes sobreexpresados, mientras que únicamente el 0.7% de los genes se encontraban reprimidos. De manera similar, en *A. brasilense* se alteró la expresión del 2.63% del genoma en la comparativa de una cepa mutante en el gen *ipdC* y su cepa silvestre (Van Puyvelde et al., 2011). Por lo tanto, la obtención de un mutante de producción nula en IAA podría ser esencial para identificar todos los genes regulados por el IAA endógeno producido por Psv, ya que la pequeña cantidad basal de IAA presente en esta cepa, podría ser suficiente para mantener la regulación producida por IAA sobre otros genes no identificados en este trabajo.

La relevancia del IAA endógeno en el mantenimiento de un correcto funcionamiento metabólico en Psv y en la regulación de genes implicados en diversas funciones, podría estar relacionada con que la síntesis de este compuesto se realice a través de múltiples rutas, específicas e inspecíficas, lo cual dificulta la obtención de un mutante de producción cero de IAA mediante mutaciones de pérdida de función.

En este capítulo, también se ha demostrado que, además de controlar la regulación interna del transcriptoma en función de los niveles de IAA, las cepas de Psv también tienen la capacidad de percibir los niveles de IAA exógenos y provocar una respuesta global a nivel transcripcional en esta bacteria. Mediante la adición exógena de IAA al medio de cultivo, hemos demostrado que hasta el 10% del transcriptoma de Psv NCPPB 3335 se modifica, encontrándose entre los genes alterados genes claves de patogenicidad y virulencia, como genes del T3SS, la región WHOP específica de cepas de *P. syringae* que infectan huéspedes leñosos, toxinas o producción de fitohormonas (Figura 2).

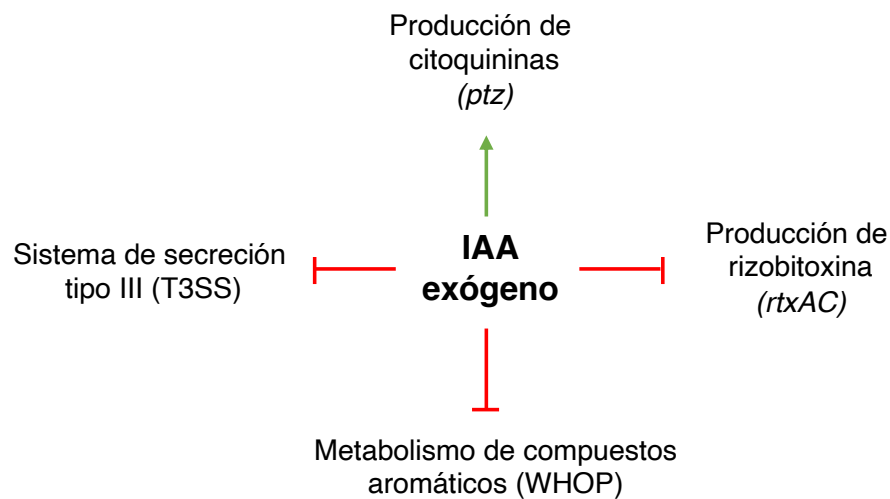


Figura 2. Esquema de la regulación por IAA exógeno de diferentes factores de virulencia descritos en Psv NCPPB 3335. Rojo, represión de la expresión; verde, aumento de la expresión.

De este modo, queda patente que Psv tiene la capacidad de percibir los niveles de IAA exógenos, producidos por ella misma o por la planta, induciéndose cambios en la regulación de otros genes de virulencia. Sin embargo, cabe hacer dos apreciaciones: 1) la represión de genes del T3SS, así como de genes relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos, sugiere que la planta podría atenuar la virulencia de Psv a través de la producción de IAA, ya que, ambos factores de virulencia se han demostrado esenciales en el proceso de infección (Caballo-Ponce et al., 2017a), o 2) los cambios observados en la regulación de los diferentes factores de virulencia, podrían deberse a que el IAA

producido por Psv NCPPB 3335 sería el principal protagonista encargado de la regulación del proceso de infección, mediante la activación y represión secuencial a lo largo del tiempo de los diferentes factores de virulencia utilizados por Psv durante la infección.

El control de los niveles de IAA disponibles en el interior celular parece ser un proceso esencial para las bacterias fitopatógenas. En el Capítulo 4 de esta Tesis Doctoral, se ha analizado la distribución del gen *iaaL* en *P. savastanoi*, el cual se encarga de la transformación del IAA en el conjugado aminoacídico IAA-Lisina, una molécula biológicamente menos activa. El papel del gen *iaaL* durante el proceso de infección es incierto, ya que mutantes de este gen en Pto DC3000 mostraron una virulencia reducida, mientras que en la cepa de Psn ESC23 su virulencia aumentó, observando un aumento en los niveles de IAA libre producidos por esta cepa (Castillo-Lizarro et al., 2015; Cerboneschi et al., 2016). Sin embargo, se especula que el gen *iaaL* podría ser clave en el control de los niveles de IAA libre, lo que provocarían cambios en la virulencia de la cepa, ya que hasta la fecha no se ha identificado el papel del IAA-Lys producido por estas bacterias.

Todas las cepas de *P. savastanoi* analizadas en este capítulo produjeron IAA en cultivo, describiendo por primera vez su producción en la cepa Psm Ph3. Además, no se encontró correlación entre la cantidad de IAA-Lys e IAA producido, ya que cepas no tumorigénicas como Psf, produjeron pequeñas concentraciones de IAA y una gran cantidad de IAA-Lys, por lo que la producción del conjugado podría no ser esencial para el desarrollo tumoral. Además, mediante ensayos biológicos utilizando *A. thaliana* y mediante la expresión heteróloga de los diferentes alelos en Psv NCPPB 3335, se ha correlacionado la producción del conjugado IAA-Lys con la presencia de un alelo *iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psf-3} o *iaaL*_{Pto}. Sin embargo, en algunas cepas tumorigénicas, productoras de altas concentraciones de IAA y con alguno de los alelos funcionales 100% conservados, no se detectó producción del conjugado, por lo que las diferencias en los niveles de expresión de los genes *iaaL* identificados en estas cepas en

comparación con sus homólogos en cepas productoras podrían ser las responsables de la ausencia de producción del conjugado. Es posible que el gen *iaaL*, regulado por el regulador positivo *hrpL*, no se encuentre inducido en las condiciones ensayadas en estas cepas, pese al elevado grado de conservación de su región promotora en *P. savastanoi*. Sin embargo, la regulación del gen *hrpL* es compleja y se encuentra controlado por diferentes mecanismos moleculares, así como por las condiciones ambientales, por lo que cambios en el ambiente o en la regulación de los genes que participan en procesos e incluso cambios en la misma proteína *hrpL* podrían estar condicionando la expresión del gen *iaaL* y con ella la producción del conjugado.

Entre los genes identificados como esenciales para el proceso de producción de IAA-Lys destaca el alelo *iaaL*_{Psf-3} el cual pertenece a un nuevo alelo, descrito por primera vez en este trabajo, y exclusivo de cepas de Psf, productoras de bajos niveles de IAA y no tumorigénicas, incrementando así la variabilidad alélica del gen *iaaL* en el complejo *P. syringae*. Las secuencias pertenecientes a los grupos *laaL*_{Psn}, *laaL*_{Psf} o *laaL*_{Pto}, los cuales contribuyen a la producción de IAA-Lys, agrupan en una rama monofilética, mientras que las secuencias de *laaL*_{Psv} agrupan en una rama independiente. La caracterización bioquímica de las 3 aloenzimas analizadas en este capítulo ha identificado diferencias en la actividad específica por el IAA, la velocidad máxima y la eficiencia catalítica de la aloenzima *laaL*_{Psf-3} en comparación con la aloenzima *laaL*_{Psn-1}. Las secuencias de proteínas del grupo *laaL*_{Psf} presentaron cambios exclusivos en 2 residuos que, dependiendo de la posición, podrían provocar cambios en la actividad catalítica de estas enzimas. Por lo tanto, futuros experimentos para resolver la estructura tridimensional de las proteínas *laaL* mediante cristalización, serían necesarios con el fin de analizar el impacto de estos cambios. La mayor actividad de las proteínas *laaL*_{Psf} contrasta con la menor concentración de IAA producido por las cepas de Psf las cuales estarían procesando rápidamente el IAA libre convirtiéndolo en su versión conjugada con lisina, por lo que el IAA-Lys podría ser necesario para el correcto desarrollo del proceso de infección. Sin embargo,

algunas cepas no productoras de IAA-Lys, como Psv NCPPB 3335 presentan un desarrollo tumoral completo.

Por otro lado, no se detectó actividad ni producción de IAA-Lys en ninguna de las proteínas $iaaL_{Psv}$ analizadas, lo que sugiere que estas proteínas podrían ser inactivas. Además, la mayor variabilidad observada en las secuencias de las aloenzimas $iaaL_{Psv}$ que forman parte de este grupo, sugiere que se ha producido la acumulación de múltiples cambios en su secuencia que han tenido como resultado la inactivación del alelo. Se desconoce si la inactivación de este alelo $iaaL_{Psv}$ resulta beneficiosa o no para la supervivencia de Psv en ciertos cultivares, pese a que se ha descrito la presencia de varias repeticiones del triplete TAC (Tirosina) en la secuencia de sus alelos $iaaL_{Psv}$ (Matas et al., 2009), lo cual se ha demostrado en este capítulo que provoca la inactivación de la enzima. Por lo tanto, los cambios exclusivos y las diferencias presentes en las aloenzimas $iaaL$ descritas en *P. savastanoi*, refuerzan la hipótesis de una obtención mediante transferencia horizontal del gen $iaaL$, permitiendo una evolución independiente de sus secuencias, que tendrían como consecuencia una mayor adaptación a los diferentes niveles de IAA producidos por las diferentes cepas de *P. savastanoi*.

Por último, la detección por primera vez de conjugados aminoacídicos diferentes de IAA-Lys en Psv NCPPB 3335 en presencia de Trp en el medio abre nuevos horizontes, surgiendo la necesidad de identificar las enzimas encargadas de su síntesis en Psv y de entender la función biológica en el metabolismo bacteriano o durante el proceso de infección de toda la batería de conjugados producidos, incluidos el IAA-Lys. La existencia de estos conjugados en planta sugiere una función similar en Psv, funcionando como reserva temporal de IAA o como marcaje previo al inicio del proceso catabólico. Además, también existe la posibilidad de que estos conjugados aminoacídicos pudiesen ser utilizados por la bacteria como una herramienta para la modificación del comportamiento de la planta e interferir en su respuesta de defensa, favoreciendo el proceso de infección. Por lo tanto, futuros análisis bioinformáticos y experimentales serán

necesarios para determinar las enzimas encargadas de la síntesis de estos conjugados, así como de su función biológica.

| CONCLUSIONES |

1. Los 21 genomas de cepas de *Pseudomonas savastanoi* disponibles actualmente delimitan un pangenoma casi cerrado compuesto por 7953 familias génicas.
2. La filogenia de *P. savastanoi* agrupa a las cepas aisladas de adelfa 0485_9 e ICMP 13786 en una rama monofilética con cuatro cepas aisladas de olivo, con las que comparten más genes exclusivos que con otras cepas aisladas de adelfa.
3. La filogenia de *P. savastanoi* agrupa a la cepa aislada de dipladenia Ph3 en una rama monofilética con cuatro cepas de *P. savastanoi* pv. *nerii*, compartiendo todas ellas genes exclusivos, aunque la cepa Ph3 también codifica genes exclusivos no presentes en las cepas de los otros cuatro patovares de *P. savastanoi*.
4. Se ha identificado la presencia o ausencia exclusiva de genes relacionados con la producción de fitohormonas, toxinas, componentes del sistema de secreción tipo III y IV, factores transcripcionales o con el transporte de compuestos, en los diferentes patovares de *P. savastanoi*.
5. La cepa Psv $\Delta iaaMH1-2$, carente de la ruta de la indol-3-acetamida, produce metabolitos intermediarios de la biosíntesis de indol-3-acético (IAA), como indol-3-acetamida, indol-3-acetonitrilo e indol-3-acetaldehído, que podrían estar implicados en nuevas rutas biosintéticas no caracterizadas hasta la fecha en *P. savastanoi*.
6. La producción de IAA en Psv $\Delta iaaMH1-2$ se induce por L-Trp y es dependiente, al menos parcialmente, de las proteínas con dominios aldehído deshidrogenasa AldA, AldB, AldC y AldD, pudiendo estar también implicadas otras proteínas con este dominio identificadas en el genoma de Psv NCPPB 3335.
7. Los niveles de IAA endógeno y exógeno modulan la expresión génica global a nivel transcripcional en Psv NCPPB 3335, estando posiblemente implicados en este proceso cajas promotoras AuxRE similares a las codificadas en los genomas de plantas y un pequeño RNA (sRNA).

8. La respuesta de Psv NCPPB 3335 al IAA a nivel transcripcional incluye la regulación de genes codificantes de factores de patogenicidad y virulencia, como son el sistema de secreción tipo III, la región WHOP implicada en el metabolismo de compuesto aromáticos, la producción de citoquininas y de rizobitoxina.
9. Las cepas de *P. savastanoi* pv. *fraxini*, codifican un alelo del gen *iaaL* (*iaaL_{Psf}*) diferente a los identificados previamente en otras cepas del complejo *P. syringae*.
10. La síntesis de 3-indol-acetil- ϵ -L-lisina (IAA-Lys) en *P. savastanoi* y *P. syringae* es dependiente de los alelos del gen *iaaL* codificados por cada cepa, habiéndose identificado como funcionales los alelos *iaaL_{Psn-1}*, *iaaL_{Psf-3}* e *iaaL_{Pto}*, mientras que el alelo *iaaL_{Psv-1}* es inactivo, no contribuyendo a la formación del conjugado.
11. Las aloenzimas *iaaL_{Psf-3}* e *iaaL_{Psn-1}* muestran diferencias en su actividad específica por IAA, su velocidad máxima y su eficiencia catalítica por los sustratos IAA y L-Lys, siendo la primera más veloz, y mostrando mayor actividad específica y eficiencia catalítica por ambos sustratos que la segunda.
12. Además de IAA-Lys, Psv NCPPB 3335 sintetiza otros conjugados de IAA con los aminoácidos alanina, triptófano, aspartato, isoleucina y fenilalanina.

| CONCLUSIONS |

1. The 21 genomes of *Pseudomonas savastanoi* strains currently available delimit a nearly closed pangenome composed of 7953 gene families.
2. The phylogeny of *P. savastanoi* groups the oleander strains 0485_9 and ICMP 13786 into a monophyletic branch with four olive strains and they share exclusively more genes than with other isolates of oleander.
3. The phylogeny of *P. savastanoi* groups the dipladenia strain Ph3 in a monophyletic branch with four strains of *P. savastanoi* pv. *nerii*, all of which share exclusive genes, although the Ph3 strain also encodes exclusive genes not present in the strains of the other four *P. savastanoi* pathovars.
4. The presence or exclusive absence of genes related to the biosynthesis of IAA and cytokinins, toxins, type III and IV secretion system elements, transcriptional factors or transport has been identified in the different pathovars of *P. savastanoi*.
5. The strain Psv $\Delta iaaMH1-2$, lacking the indole-3-acetamide pathway, produces intermediate metabolites of indole-3-acetic (IAA) biosynthesis, such as indole-3-acetamide, indole-3-acetonitrile and indole-3-acetaldehyde, which could be involved in new biosynthetic pathways not characterized to date in *P. savastanoi*.
6. IAA production in Psv $\Delta iaaMH1-2$ is induced by L-Trp and is dependent, at least partially, on the proteins with aldehyde dehydrogenase domains AldA, AldB, AldC and AldD, other proteins with this domain identified in the genome of Psv NCPPB 3335 may also be involved.
7. Endogenous and exogenous IAA levels modulate global gene expression at the transcriptional level in Psv NCPPB 3335, with AuxRE promoter boxes similar to those encoded in plant genomes and a small RNA (sRNA) possibly being involved in this process.
8. The response of Psv NCPPB 3335 to IAA at the transcriptional level includes the regulation of genes encoding pathogenicity/virulence factors, such as the type III secretion system, the WHOP region involved in the metabolism of aromatic compounds, the production of cytokinin and rhizobitoxin.

9. The strains of *P. savastanoi* pv. *fraxini*, encode a new *iaaL* allele (*iaaLPsf*) different from those previously identified in other strains of the *P. syringae* complex.
10. The synthesis of 3-indole-acetyl- ϵ -L-lysine (IAA-Lys) in *P. savastanoi* and *P. syringae* is dependent on the *iaaL* alleles presents in each strain, the *iaaL*_{Psn-1}, *iaaL*_{Psf-3} e *iaaL*_{Pto} alleles have been identified as functional, while the *iaaL*_{Psv-1} allele is inactive, not contributing to the formation of the conjugate.
11. The alloenzymes *iaaL*_{Psf-3} and *iaaL*_{Psn-1} show differences in their specific activity by IAA, their maximum speed and their catalytic efficiency for the substrates IAA and L-Lys, the former being faster, and showing greater specific activity and catalytic efficiency for both substrates than the second.
12. In addition to IAA-Lys, Psv NCPPB 3335 synthesizes other conjugates of IAA with the amino acids alanine, tryptophan, aspartate, isoleucine and phenylalanine.

| BIBLIOGRAFÍA |

- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., et al. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research* 44, W3–W10. doi:10.1093/nar/gkw343.
- Alexa, A., and Rahnenfuhrer, J. (2020). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*. R package version 2.40.0. Available at: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>.
- Alfano, J. R., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Badel, J. L., Petnicki-Ocwieja, T., Van Dijk, K., et al. (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, 4856–4861. doi:10.1073/pnas.97.9.4856.
- Almeida, N. F., Shuangchun, Y., Rongman, C., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaads, N. W., et al. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* 100, 208–215. doi:10.1094/PHYTO-100-3-0208.
- Alvarez, F., de los Ríos, J. E. G., Jimenez, P., Rojas, A., Reche, P., and Troya, M. T. (1998). Phenotypic variability in different strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* isolated from different hosts. *European Journal of Plant Pathology* 104, 603–609. doi:10.1023/A:1008604011154.
- Añorga, M., Pintado, A., Ramos, C., De Diego, N., Ugena, L., Novak, O., et al. (2020). Genes *ptz* and *idi*, Coding for Cytokinin Biosynthesis Enzymes, Are Essential for Tumorigenesis and In Planta Growth by *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. *Front. Plant Sci.* 11. doi:10.3389/fpls.2020.01294/full.
- Aragón, I. M., Pérez-Martínez, I., Moreno-Pérez, A., Cerezo, M., and Ramos, C. (2014). New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. 356, 184–192. doi:10.1111/1574-6968.12413.
- Aragón, I. M., Pérez-Mendoza, D., Gallegos, M.-T., and Ramos, C. (2015a). The c-di-GMP phosphodiesterase BifA is involved in the virulence of bacteria from the *Pseudomonas syringae* complex. *Molecular Plant Pathology* 16, 604–615. doi:10.1111/mpp.12218.
- Aragón, I. M., Pérez-Mendoza, D., Moscoso, J. A., Faure, E., Guery, B., Gallegos, M.-T., et al. (2015b). Diguanylate cyclase DgcP is involved in plant and human *Pseudomonas* spp. infections. 17, 4332–4351 doi:10.1111/1462-2920.12856.
- Baltrus, D. A., McCann, H. C., and Guttman, D. S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in Bacterial

- Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology* 18, 152–168. doi:10.1111/mpp.12506.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Dougherty, K. M., Biswas, S., Mukhtar, M. S., Vicente, J., et al. (2012). The molecular basis of host specialization in bean pathovars of *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 25, 877–888. doi:10.1094/MPMI-08-11-0218.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., et al. (2011). Dynamic Evolution of Pathogenicity Revealed by Sequencing and Comparative Genomics of 19 *Pseudomonas syringae* Isolates. *PLoS Pathog* 7, e1002132–22. doi:10.1371/journal.ppat.1002132.
- Bardaji, L., Añorga, M., Echeverría, M., Ramos, C., and Murillo, J. (2019). The toxic guardians — multiple toxin- antitoxin systems provide stability, avoid deletions and maintain virulence genes of *Pseudomonas syringae* virulence plasmids. *Mobile DNA* 10, 1–17. doi:10.1186/s13100-019-0149-4.
- Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Rodríguez-Palenzuela, P., Sundin, G. W., Ramos, C., et al. (2011). Sequence and role in virulence of the three plasmid complement of the model tumor-inducing bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. 6, e25705. doi:10.1371/journal.pone.0025705.
- Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R. C., and Weiler, E. W. (1994). Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: Key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6021–6025. doi:10.1073/pnas.91.13.6021.
- Bartoli, C., Carrere, S., Lamichhane, J. R., Varvaro, L., and Morris, C. E. (2015). Whole-Genome Sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* Strains Representing Different Host Range Spectra. *Genome Announc* 3. doi:10.1128/genomeA.00379-15.
- Basu, M. M., González-Carranza, Z. H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A. A., and Roberts, J. A. (2013). The manipulation of auxin in the abscission zone cells of *Arabidopsis* flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiol.* 162, 96–106. doi:10.1104/pp.113.216234.
- Bentley, J. A., Farrar, K. R., Housley, S., Smith, G. F., and Taylor, W. C. (1956). Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. *Biochem. J.* 64, 44–49. doi:10.1042/bj0640044.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., et al. (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, e105547–15. doi:10.1371/journal.pone.0105547.

- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62, 293–300.
- Bhosale, G., Sharpe, J. A., Sundier, S. Y., and Duchon, M. R. (2015). Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1350, 107–116. doi:10.1111/nyas.12885.
- Biancalani, C., Cerboneschi, M., Tadini-Buoninsegni, F., Campo, M., Scardigli, A., Romani, A., et al. (2016). Global analysis of type three secretion system and quorum sensing inhibition of *Pseudomonas savastanoi* by polyphenols extracts from vegetable residues. *PLoS ONE* 11, e0163357. doi:10.1371/journal.pone.0163357.
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Pucci, P. and Defez, R. (2006a) Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Microbiology* 152, 2421–2431. doi:10.1099/mic.0.28765-0.
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., et al. (2006b). Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Arch. Microbiol.* 185, 373–382. doi:10.1007/s00203-006-0103-y.
- Bichara, M., Wagner, J., and Lambert, I. B. (2006). Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 598, 144–163. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.01.020.
- Bodman, von, S. B., Bauer, W. D., and Coplin, D. L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41, 455–482. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095652.
- Boivin, S., Fonouni-Farde, C., and Frugier, F. (2016). How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Front. Plant Sci.* 7, 1240. doi:10.3389/fpls.2016.01240.
- Bozkurt, I. A., Soyulu, S., Mirik, M., Ulubas Serce, C., and Baysal, Ö. (2014). Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: A new host of the pathogen. *Lett Appl Microbiol* 59, 520–527. doi:10.1111/lam.12309.
- Bradbury, J. F. (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria*. Wallingford: CAB International.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- Brandl, M. T., and Lindow, S. E. (1996). Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid

- synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4121–4128. doi:10.1128/AEM.62.11.4121-4128.1996.
- Bronstein, P. A., Filiatrault, M. J., Myers, C. R., Rutzke, M., Schneider, D. J., and Cartinhour, S. W. (2008). Global transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* DC3000 to changes in iron bioavailability in vitro. *BMC Microbiology* 8, 209–15. doi:10.1186/1471-2180-8-209.
- Bull, C. T., Clarke, C. R., Cai, R., Vinatzer, B. A., Jardini, T. M., and Koike, S. T. (2011). Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101, 847–858. doi:10.1094/PHTO-11-10-0318.
- Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., plant, G. F. J. O., 2010 (2010). Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *JSTOR*. doi:10.2307/41998846.
- Büttner, D. (2016). Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol Rev* 40, 894–937. doi:10.1093/femsre/fuw026.
- Büttner, D., and He, S. Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 150, 1656–1664. doi:10.1104/pp.109.139089.
- Caballo-Ponce, E. (2017). Host specificity and virulence of the phytopathogenic bacteria *Pseudomonas savastanoi*.
- Caballo-Ponce, E., and Ramos, C. (2016). First Report of *Dipladenia* (*Mandevilla* spp.) Leaf and Stem Spot Caused by *Pseudomonas savastanoi* in Spain. *Plant Disease* 100, 2319–2319. doi:10.1094/PDIS-03-16-0334-PDN.
- Caballo-Ponce, E., Meng, X., Uzelac, G., Halliday, N., Cámara, M., Licastro, D., et al. (2018). Quorum Sensing in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Erwinia toletana*: Role in Virulence and Interspecies Interactions in the Olive Knot. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 807–18. doi:10.1128/AEM.00950-18.
- Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., and Ramos, C. (2017a). Knots Untie: Molecular Determinants Involved in Knot Formation Induced by *Pseudomonas savastanoi* in Woody Hosts. *Front. Plant Sci.* 8, 1089–16. doi:10.3389/fpls.2017.01089.
- Caballo-Ponce, E., van Dillewijn, P., Wittich, R.-M., and Ramos, C. (2017b). WHOP, a Genomic Region Associated With Woody Hosts in the *Pseudomonas syringae* Complex Contributes to the Virulence and Fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Plants. *MPMI* 30, 113–126. doi:10.1094/MPMI-11-16-0233-R.

- Caponero, A., Contesini, A. M., and Iacobellis, N. S. (1995). Population diversity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander. *Plant Pathology* 44, 848–855. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02744.x.
- Casimiro-Soriguer, C.S., Muñoz-Mérida, A. and Pérez-Pulido, A.J. (2017) Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *Proteomics*, 17.
- Castañeda-Ojeda, M. P., López-Solanilla, E., and Ramos, C. (2017a). Differential modulation of plant immune responses by diverse members of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* HopAF type III effector family. *Molecular Plant Pathology* 18, 625–634. doi:10.1111/mpp.12420.
- Castañeda-Ojeda, M. P., Moreno-Pérez, A., Ramos, C., and López-Solanilla, E. (2017b). Suppression of Plant Immune Responses by the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 Type III Effector Tyrosine Phosphatases HopAO1 and HopAO2. *Front. Plant Sci.* 8, 60–15. doi:10.3389/fpls.2017.00680.
- Castillo-Lizardo, M. G., Aragón, I. M., Carvajal, V., Matas, I. M., Pérez-Bueno, M. L., Gallegos, M.-T., et al. (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. 15, 165. doi:10.1186/s12866-015-0503-8.
- Cerboneschi, M., Decorosi, F., Biancalani, C., Ortenzi, M. V., Macconi, S., Giovannetti, L., et al. (2016). Indole-3-acetic acid in plant-pathogen interactions: a key molecule for in planta bacterial virulence and fitness. *Research in Microbiology* 167, 774–787. doi:10.1016/j.resmic.2016.09.002.
- Chalupowicz, L., Barash, I., Panijel, M., Sessa, G., and Manulis-Sasson, S. (2009). Regulatory interactions between quorum-sensing, auxin, cytokinin, and the Hrp regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophillae*. *MPMI* 22, 849–856. doi:10.1094/MPMI-22-7-0849.
- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., and Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Nature Publishing Group*, 1–10. doi:10.1038/srep24373.
- Chou, J.-C., and Huang, Y.-B. (2005). Induction And Characterization of an Indole-3-acetyl-L-alanine Hydrolase From *Arthrobacter llicis*. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 11–18. doi:10.1007/s00344-005-0013-2.
- Chou, J.-C., Kuleck, G. A., Cohen, J. D., and Mulbry, W. W. (1996). Partial purification and characterization of an inducible indole-3- acetyl-L-aspartic acid hydrolase from *Enterobacter agglomerans*. *Plant Physiol.* 112, 1281–1287. doi:10.1104/pp.112.3.1281.

- Christie, P. J., and Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Mol. Membr. Biol.* 22, 51–61. doi:10.1080/09687860500063316.
- Cinelli, T., Marchi, G., Cimmino, A., Marongiu, R., Evidente, A., and Fiori, M. (2014). Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). *Plant Pathology* 63, 277–289. doi:10.1111/ppa.12096.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., et al. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8770–8777. doi:10.1073/pnas.97.16.8770.
- Comai, L., and Kosuge, T. (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology* 143, 950–957.
- Comai, L., Surico, G., and Kosuge, T. (1982). Relation of Plasmid DNA to Indoleacetic Acid Production in Different Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Microbiology* 128, 2157–2163. doi:10.1099/00221287-128-9-2157.
- Costacurta, A., Keijers, V., and Vanderleyden, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243, 463–472. doi:10.1007/BF00280477.
- Coutinho, B. G., Mitter, B., Talbi, C., Sessitsch, A., Bedmar, E. J., Halliday, N., et al. (2013). Regulon Studies and In Planta Role of the Bral/R Quorum-Sensing System in the Plant-Beneficial Burkholderia Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4421–4432. doi:10.1128/AEM.00635-13.
- Cruz, L. F., Cobine, P. A., and La Fuente, De, L. (2012). Calcium Increases *Xylella fastidiosa* Surface Attachment, Biofilm Formation, and Twitching Motility. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1321–1331. doi:10.1128/AEM.06501-11.
- Cunnac, S., Lindeberg, M., and Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology* 12, 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, 323–327. doi:10.1128/aem.51.2.323-327.1986.
- Danhorn, T., and Fuqua, C. (2007). *Biofilm formation by plant-associated bacteria*. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093316.

- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., et al. (2005). Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins. *Developmental Cell* 9, 109–119. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.014.
- Dillon, M. M., Almeida, R. N. D., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B. S., Desveaux, D., et al. (2019a). Molecular Evolution of *Pseudomonas syringae* Type III Secreted Effector Proteins. *Front. Plant Sci.* 10, 418. doi:10.3389/fpls.2019.00418.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N. D., Wang, P. W., Weir, B. S., and Guttman, D. S. (2019b). Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol.* 20, 1–28. doi:10.1186/s13059-018-1606-y.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., and Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212, 153–162. doi:10.1023/A:1004658000815.
- Domínguez, D. C., Guragain, M., and Patrauchan, M. (2015). Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium* 57, 151–165. doi:10.1016/j.ceca.2014.12.006.
- Donati, A. J., Lee, H.-I., Leveau, J. H. J., and Chang, W.-S. (2013). Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE* 8, e76559–11. doi:10.1371/journal.pone.0076559.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., and Glick, B. R. (2014a). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 85–125. doi:10.1007/s10482-013-0095-y.
- Duca, D., Rose, D. R., and Glick, B. R. (2014b). Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas* sp. strain UW4 that converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4640–4649. doi:10.1128/AEM.00649-14.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Ehmann, A. (1977). The van URK-Salkowski reagent - a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J. Chromatogr.* 132, 267–276. doi:10.1016/S0021-9673(00)89300-0.
- Eltbany, N., Prokscha, Z. Z., Castaneda-Ojeda, M. P., Krogerrecklenfort, E., Heuer, H., Wohanka, W., et al. (2012). A New Bacterial Disease on *Mandevilla sanderi*, Caused by *Pseudomonas savastanoi*: Lessons Learned

- for Bacterial Diversity Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8492–8497. doi:10.1128/AEM.02049-12.
- Engl, C., Waite, C. J., McKenna, J. F., Bennett, M. H., Hamann, T., and Buck, M. (2014). Chp8, a Diguanylate Cyclase from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000, Suppresses the Pathogen-Associated Molecular Pattern Flagellin, Increases Extracellular Polysaccharides, and Promotes Plant Immune Evasion. *mBio* 5, 155. doi:10.1128/mBio.01168-14.
- Epstein, E. (1982). Levels of free and conjugated indole-3-acetic acid in ethylene-treated leaves and callus of olive. *Physiol Plant* 56, 371–373. doi:10.1111/j.1399-3054.1982.tb00355.x.
- Evidente, A., Surico, G., Iacobellis, N. S., and Randazzo, G. (1985). α -N-Acetyl-indole-3-acetyl- ϵ -l-lysine: a metabolite of indole-3-acetic acid from *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi. *Phytochemistry* 24, 1499–1502. doi:10.1016/s0031-9422(00)81053-5.
- Evidente, A., Surico, G., Iacobellis, N. S., and Randazzo, G. (1986). 1'-methylzeatin, an additional cytokinin from *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi. *Phytochemistry* 25, 525–526. doi:10.1016/S0031-9422(00)85515-6.
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., and Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet* 379, 2489–2499. doi:10.1016/S0140-6736(11)61752-2.
- Ferrante, P., and Scortichini, M. (2014). Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae in Actinidia chinensis and A. deliciosa plants. *Plant Pathology* 63, 12–19. doi:10.1111/ppa.12070.
- Figueiredo, M. V. B., Martinez, C. R., Burity, H. A., and Chanway, C. P. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1187–1193. doi:10.1007/s11274-007-9591-4.
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., et al. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44, D279–D285. doi:10.1093/nar/gkv1344.
- Fishman, M. R., Zhang, J., Bronstein, P. A., Stodghill, P., and Filiatrault, M. J. (2018). Ca²⁺-Induced Two-Component System CvsSR Regulates the Type III Secretion System and the Extracytoplasmic Function Sigma Factor AlgU in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Journal of Bacteriology* 200, 155–62. doi:10.1128/JB.00538-17.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090913.

- Gaffney, T. D., Silva, O. E., and Yamada, T. (1990). Indoleacetic acid operon of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*: transcription analysis and promoter identification. *Journal of Bacteriology* 172, 5593–5601. doi:10.1128/jb.172.10.5593-5601.1990.
- Gamir, J., Pastor, V., Kaeffer, A., Cerezo, M., and Flors, V. (2014). Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant Journal* 78, 227–240. doi:10.1111/tpj.12465.
- Gardan, L., Bollet, C., and Ghorrah, M. A. (1992a). DNA Relatedness among the Pathovar Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and Proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 606–612. doi:10.1099/00207713-42-4-606.
- Gardan, L., David, C., Morel, M., Glickmann, E., Abu-Ghorrah, M., Petit, A., et al. (1992b). Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1780–1783.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., and Grimont, P. A. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 2, 469–478. doi:10.1099/00207713-49-2-469.
- Gayte, I. G., Moreno, R. B., Zonjic, P. S., and Claros, M. G. (2017). DEgenes Hunter - A Flexible R Pipeline for Automated RNA-seq Studies in Organisms without Reference Genome. *Genomics and Computational Biology* 3, e31–e31. doi:10.18547/gcb.2017.vol3.iss3.e31.
- Gironde, S., and Manceau, C. (2012). Housekeeping Gene Sequencing and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis To Identify Subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* That Correlate with Host Specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3266–3279. doi:10.1128/AEM.06655-11.
- Glass, N. L., and Kosuge, T. (1986). Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology* 166, 598–603.
- Glass, N. L., and Kosuge, T. (1988). Role of indoleacetic acid-lysine synthetase in regulation of indoleacetic acid pool size and virulence of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology* 170, 2367–2373.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., et al. (1998). Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 11, 156–162. doi:10.1094/MPMI.1998.11.2.156.

- Gode-Potratz, C. J., Chodur, D. M., and McCarter, L. L. (2010). Calcium and Iron Regulate Swarming and Type III Secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 192, 6025–6038. doi:10.1128/JB.00654-10.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. (2017). Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis. *Frontiers in Microbiology* 8, 208–13. doi:10.3389/fmicb.2017.02422.
- González, N., Heeb, S., Valverde, C., Kay, E., Reimann, C., Junier, T., et al. (2008). Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species. *BMC Genomics* 9, 167–14. doi:10.1186/1471-2164-9-167.
- Gottesman, S., McCullen, C. A., Guillier, M., Vanderpool, C. K., Majdalani, N., Benhammou, J., et al. (2006). Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 1–11. doi:10.1101/sqb.2006.71.016.
- Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* 49, 373–385. doi:10.1023/A:1015207114117.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Hartmann, A., Singh, M., and Klingmüller, W. (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29, 916–923. doi:10.1139/m83-147.
- Hosni, T., Moretti, C., Devescovi, G., Suarez-Moreno, Z. R., Fatmi, M. B., Guarnaccia, C., et al. (2011). Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *ISME J* 5, 1857–1870. doi:10.1038/ismej.2011.65.
- Howden, A. J. M., Rico, A., Mentlak, T., Miguet, L., And Preston, G. M. (2009). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. *Molecular Plant Pathology* 10, 857–865. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00595.x.
- Hulin, M. T., Armitage, A. D., Vicente, J. G., Holub, E. B., Baxter, L., Bates, H. J., et al. (2018). Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* reveals convergent gene gain and loss associated with specialization onto cherry (*Prunus avium*). *New Phytol* 219, 672–696. doi:10.1111/nph.15182.
- Hutcheson, S. W., and Kosuge, T. (1985). Regulation of 3-indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Purification and properties of tryptophan 2-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 260, 6281–6287.

- Hutcheson, S. W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S., and Pak, K. (2001). Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *Journal of Bacteriology* 183, 5589–5598. doi:10.1128/JB.183.19.5589-5598.2001.
- Hutzinger, O., and Kosuge, T. (1968). Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. 3. The isolation and characterization of indole-3-acetyl-epsilon-L-lysine. *Biochemistry* 7, 601–605. doi:10.1021/bi00842a013.
- 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. doi:10.1126/science.2781284.
- Hwang, H.-H., Yang, F.-J., Cheng, T.-F., Chen, Y.-C., Lee, Y.-L., Tsai, Y.-L., et al. (2013). The Tzs protein and exogenous cytokinin affect virulence gene expression and bacterial growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* 103, 888–899. doi:10.1094/PHYTO-01-13-0020-R.
- Hwang, M. S. H., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., and Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic Characterization of Virulence and Resistance Phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5182–5191. doi:10.1128/AEM.71.9.5182-5191.2005.
- Iacobellis, N. S., Caponero, A., and Evidente, A. (1998). Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. savastanoi strains isolated from ash. *Plant Pathology* 47, 73–83. doi:10.1046/j.1365-3059.1998.00202.x.
- Iacobellis, N. S., Sisto, A., Surico, G., Evidente, A., and DiMaio, E. (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi Mutants Defective in Phytohormone Production. *Journal of Phytopathology* 140, 238–248. doi:10.1111/j.1439-0434.1994.tb04813.x.
- Imperlini, E., Bianco, C., Lonardo, E., Camerini, S., Cermola, M., Moschetti, G., et al. (2009). Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Appl Microbiol Biotechnol* 83, 727–738. doi:10.1007/s00253-009-1974-z.
- Islam, M. S. (2020). *Calcium Signaling*. ed.M. S. Islam Cham: Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-030-12457-1.
- Janse, J. D. (1981). The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi pv. Fraxini II. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology* 11, 425–438. doi:10.1111/j.1439-0329.1981.tb00115.x.
- Janse, J. D. (1982). *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the Bacterium Causing Excrescences on Oleaceae and Nerium oleander L. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, 166–169. doi:10.1099/00207713-32-2-166.

- Janse, J. D. (1991). Pathovar Discrimination within *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Using Whole Cell Fatty Acids and Pathogenicity as Criteria. *Systematic and applied microbiology* 14, 79–84. doi:10.1016/S0723-2020(11)80365-6.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M., et al. (2005). Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *Journal of Bacteriology* 187, 6488–6498. doi:10.1128/JB.187.18.6488-6498.2005.
- Jock, S., Jacob, T., Kim, W. S., Hildebrand, M., Vosberg, H. P., and Geider, K. (2003). Instability of short-sequence DNA repeats of pear pathogenic *Erwinia* strains from Japan and *Erwinia amylovora* fruit tree and raspberry strains. *Mol Gen Genomics* 268, 739–749. doi:10.1007/s00438-003-0814-6.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi:10.1038/nature05286.
- Jorth, P., Staudinger, B. J., Wu, X., Hisert, K. B., Hayden, H., Garudathri, J., et al. (2015). Regional Isolation Drives Bacterial Diversification within Cystic Fibrosis Lungs. *Cell Host and Microbe*, 1–13. doi:10.1016/j.chom.2015.07.006.
- Kaever, A., Landesfeind, M., Feussner, K., Mosblech, A., Heilmann, I., Morgenstern, B., et al. (2015). MarVis-Pathway: integrative and exploratory pathway analysis of non-targeted metabolomics data. *Metabolomics* 11, 1–14. doi:10.1007/s11306-014-0734-y.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A., and Denny, T. P. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology* 46, 427–437. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03187.x.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., et al. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7, 1511–1522. doi:10.1038/nprot.2012.085.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., and Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845–858. doi:10.1038/nprot.2015.053.
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O., and Yanofsky, C. (2000). DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan

- metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12170–12175. doi:10.1073/pnas.220414297.
- Kieffer, M., Neve, J., and Kepinski, S. (2010). Defining auxin response contexts in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 12–20. doi:10.1016/j.pbi.2009.10.006.
- Kim, S., Park, J., Choi, O., Kim, J., and Seo, Y.-S. (2014). Investigation of Quorum Sensing-Dependent Gene Expression in *Burkholderia gladioli* BSR3 through RNA-seq Analyses. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1609–1621. doi:10.4014/jmb.1408.08064.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M., and Shimizu, S. (1995). Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 714–718. doi:10.1073/pnas.92.3.714.
- Koga, J., Adachi, T., and Hidaka, H. (1991). Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Mol. Gen. Genet.* 226, 10–16. doi:10.1007/BF00273581.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., et al. (2012). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev* 64, 520–539. doi:10.1124/pr.111.005538.
- Kosuge, T., Heskett, M. G., and Wilson, E. E. (1966). Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. *J. Biol. Chem.* 241, 3738–3744.
- Krause, K., Henke, C., Asiimwe, T., Ulbricht, A., Klemmer, S., Schachtschabel, D., et al. (2015). Biosynthesis and Secretion of Indole-3-Acetic Acid and Its Morphological Effects on *Tricholoma vaccinum*-Spruce Ectomycorrhiza. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7003–7011. doi:10.1128/AEM.01991-15.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Lalucat, Mulet, Gomila, and García-Valdés (2020). Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. *Genes* 11, 139–18. doi:10.3390/genes11020139.

- Lambrecht, M., Vande Broek, A., Dosselaere, F., and Vanderleyden, J. (1999). The ipdC promoter auxin-responsive element of *Azospirillum brasilense*, a prokaryotic ancestral form of the plant AuxRE? *Molecular Microbiology* 32, 889–891. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01396.x.
- Lamichhane, J. R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.-M., and Morris, C. E. (2014). “Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: Seeing the forest for the trees,” in *Advances in Agronomy Advances in Agronomy*. (Elsevier), 235–295. doi:10.1016/B978-0-12-800132-5.00004-3.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. T., and Bartel, B. (2002). Characterization of a Family of IAA-Amino Acid Conjugate Hydrolases from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 20446–20452. doi:10.1074/jbc.M111955200.
- Lee, S. G., Harline, K., Abar, O., Akadri, S. O., Bastian, A. G., Chen, H.-Y. S., et al. (2020). The plant pathogen enzyme AldC is a long-chain aliphatic aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, jbc.RA120.014747–26. doi:10.1074/jbc.RA120.014747.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li, R., Li, Y., Kristiansen, K., and Wang, J. (2008). SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* 24, 713–714. doi:10.1093/bioinformatics/btn025.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2009). The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires. *Molecular Plant Pathology* 10, 767–775. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00587.x.
- Liu, H., and Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol* 8, 91–10. doi:10.1186/1472-6750-8-91.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Livny, J. (2006). Identification of 17 *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2. *Nucleic Acids Research* 34, 3484–3493. doi:10.1093/nar/gkl453.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943–950. doi:10.1242/dev.086363.

- Macdonald, E. M., Powell, G. K., Regier, D. A., Glass, N. L., Roberto, F., Kosuge, T., et al. (1986). Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin, and Ribosyl-1^{'''} - Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*: Plasmid-Coded Cytokinin Biosynthesis. *Plant Physiol.* 82, 742–747. doi:10.1104/pp.82.3.742.
- Macho, A. P., Ruiz Albert, J., Tornero, P., and Beuzón, C. R. (2009). Identification of new type III effectors and analysis of the plant response by competitive index. *Molecular Plant Pathology* 10, 69–80. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00511.x.
- Magie, A. R., Wilson, E. E., and Kosuge, T. (1963). Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indolacetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. *Science* 141, 1281–1282.
- Malhotra, M., and Srivastava, S. (2008). Organization of the ipdC region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of ipdC in strain SM. *Environ Microbiol* 10, 1365–1373. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01529.x.
- Mann, R. A., Smits, T. H. M., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E., et al. (2013). Comparative Genomics of 12 Strains of *Erwinia amylovora* Identifies a Pan-Genome with a Large Conserved Core. *PLoS ONE* 8, e55644–11. doi:10.1371/journal.pone.0055644.
- Mansfield, J. W. (2009). From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrpdelivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology* 10, 721–734. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00576.x.
- Mansfield, J., Genin, S., MAGORI, S., CITOVSKEY, V., SRIARIYANUM, M., RONALD, P., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 614–629. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M. T., Lindow, S. E., and Barash, I. (1998). Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *MPMI* 11, 634–642. doi:10.1094/MPMI.1998.11.7.634.
- Marcelletti, S., and Scortichini, M. (2014). Definition of Plant-Pathogenic *Pseudomonas* Genomespecies of the *Pseudomonas syringae* Complex Through Multiple Comparative Approaches. *Phytopathology* 104, 1274–1282. doi:10.1094/PHYTO-12-13-0344-R.
- Marchi, G., Sisto, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Cipriani, M. G., Evidente, A., et al. (2006). Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology* 55, 614–624. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01449.x.

- Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L., and Surico, G. (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112, 101–112. doi:10.1007/s10658-005-0804-0.
- Martín-Sanz, A., la Vega, de, M. P., Murillo, J., and Caminero, C. (2013). Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from Pea Are Phylogenetically and Pathogenically Diverse. *Phytopathology* 103, 673–681. doi:10.1094/PHYTO-08-12-0196-R.
- Martín-Sanz, A., Pérez de la Vega, M., Murillo, J., and Caminero, C. (2012). Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisistrains*. *Plant Pathology* 61, 1063–1072. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02604.x.
- Martínez-García, P. M., López-Solanilla, E., Ramos, C., and Rodríguez-Palenzuela, P. (2016). Prediction of bacterial associations with plants using a supervised machine-learning approach. *Environ Microbiol* 18, 4847–4861. doi:10.1111/1462-2920.13389.
- Martínez-García, P. M., Rodríguez-Palenzuela, P., Arrebola, E., Carrión, V. J., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Pérez-García, A., et al. (2015). Bioinformatics Analysis of the Complete Genome Sequence of the Mango Tree Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 Reveals Traits Relevant to Virulence and Epiphytic Lifestyle. *PLoS ONE* 10, e0136101. doi:10.1371/journal.pone.0136101.
- Marvig, R. L., Dolce, D., Sommer, L. M., Petersen, B., Ciofu, O., Campana, S., et al. (2015). Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Italian cystic fibrosis patients. *BMC Microbiology*, 1–13. doi:10.1186/s12866-015-0563-9.
- Massé, E., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6, 120–124. doi:10.1016/S1369-5274(03)00027-4.
- Matas, I. M., Castañeda-Ojeda, M. P., Aragón, I. M., Antúnez-Lamas, M., Murillo, J., Rodríguez-Palenzuela, P., et al. (2014). Translocation and Functional Analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 Type III Secretion System Effectors Reveals Two Novel Effector Families of the *Pseudomonas syringae* Complex. *MPMI* 27, 424–436. doi:10.1094/MPMI-07-13-0206-R.
- Matas, I. M., Lambertsen, L., Rodríguez-Moreno, L., and Ramos, C. (2012). Identification of novel virulence genes and metabolic pathways required for full fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive (*Olea europaea*) knots. *New Phytol* 196, 1182–1196. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04357.x.

- Matas, I. M., Perez-Martinez, I., Quesada, J. M., Rodriguez-Herva, J. J., Penyalver, R., and Ramos, C. (2009). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Contains Two *iaaL* Paralogs, One of Which Exhibits a Variable Number of a Trinucleotide (TAC) Tandem Repeat. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1030–1035. doi:10.1128/AEM.01572-08.
- McClerklin, S. A., Lee, S. G., Harper, C. P., Nwumeh, R., Jez, J. M., and Kunkel, B. N. (2018). Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathog* 14, e1006811–24. doi:10.1371/journal.ppat.1006811.
- Merino, E., Jensen, R. A., and Yanofsky, C. (2008). Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Current Opinion in Microbiology* 11, 78–86. doi:10.1016/j.mib.2008.02.005.
- Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001). *Quorum sensing in bacteria*. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165.
- Minamisawa, K., and Fukai, K. (1991). Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bradyrhizobium japonicum*: A Correlation with Genotype Grouping and Rhizobitoxine Production. *Plant and Cell Physiology* 32, 1–9.
- Mirik, M., Aysan, Y., and Sahin, F. (2011). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in Turkey and report of fontanesia as a new host. *Journal of Plant Pathology* 93, 263–270.
- Monteil, C. L., Yahara, K., STUDHOLME, D. J., Mageiros, L., Méric, G., Swingle, B., et al. (2016). Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens. *Microbial Genomics* 2, 385–16. doi:10.1099/mgen.0.000089.
- Moreno-Pérez, A., Pintado, A., Murillo, J., Caballo-Ponce, E., Tegli, S., Moretti, C., et al. (2020). Host Range Determinants of *Pseudomonas savastanoi* Pathovars of Woody Hosts Revealed by Comparative Genomics and Cross-Pathogenicity Tests. *Front. Plant Sci.* 11, 1–19. doi:10.3389/fpls.2020.00973.
- Moretti, C., Vinatzer, B. A., Onofri, A., Valentini, F., and Buonauro, R. (2016). Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology* 66, 595–605. doi:10.1111/ppa.12614.
- Moretti, C., Cortese, C., Passos da Silva, D., Venturi, V., Ramos, C., Firrao, G., et al. (2014). Draft Genome Sequence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strain DAPP-PG 722, Isolated in Italy from an Olive Plant Affected by Knot Disease. *Genome Announc* 2. doi:10.1128/genomeA.00864-14.
- Moretti, C., Hosni, T., Vandemeulebroecke, K., Brady, C., De Vos, P., Buonauro, R., et al. (2011). *Erwinia oleae* sp. nov., isolated from olive knots caused by

- Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2745–2752. doi:10.1099/ijs.0.026336-0.
- Morris, C. E., Lamichhane, J. R., Nikolić, I., Stanković, S., and Moury, B. (2019). The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex. *Phytopathol Res* 1, 1–16. doi:10.1186/s42483-018-0010-6.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., and 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.
- Mosquera-Rendón, J., Rada-Bravo, A. M., Cárdenas-Brito, S., Corredor, M., Restrepo-Pineda, E., and Benítez-Páez, A. (2016). Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* species. *BMC Genomics* 17, 1–14. doi:10.1186/s12864-016-2364-4.
- Mucyn, T. S., Yourstone, S., Lind, A. L., Biswas, S., Nishimura, M. T., Baltrus, D. A., et al. (2014). Variable Suites of Non-effector Genes Are Co-regulated in the Type III Secretion Virulence Regulon across the *Pseudomonas syringae* Phylogeny. *PLoS Pathog* 10, e1003807. doi:10.1371/journal.ppat.1003807.
- Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 12, 1513–1530. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Napora-Wijata, K., Strohmeier, G. A., and Winkler, M. (2014). Biocatalytic reduction of carboxylic acids. *Biotechnology Journal* 9, 822–843. doi:10.1002/biot.201400012.
- Naseem, M., Kaldorf, M., and Dandekar, T. (2015). The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J. Exp. Bot.* 66, 4885–4896. doi:10.1093/jxb/erv297.
- Nonhebel, H. M. (2015). Tryptophan-Independent Indole-3-Acetic Acid Synthesis: Critical Evaluation of the Evidence. *Plant Physiol.* 169, 1001–1005. doi:10.1104/pp.15.01091.
- Normanly, J. (2010). Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001594–a001594. doi:10.1101/cshperspect.a001594.
- Normanly, J. (1997). Auxin metabolism. *Physiol Plant* 100, 431–442. doi:10.1034/j.1399-3054.1997.1000304.x.

- Normanly, J., Cohen, J. D., and Fink, G. R. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 10355–10359. doi:10.1073/pnas.90.21.10355.
- Nowell, R. W., Green, S., Laue, B. E., and Sharp, P. M. (2014). The Extent of Genome Flux and Its Role in the Differentiation of Bacterial Lineages. *Genome Biol Evol* 6, 1514–1529. doi:10.1093/gbe/evu123.
- Nowell, R. W., Laue, B. E., Sharp, P. M., and Green, S. (2016). Comparative genomics reveals genes significantly associated with woody hosts in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Pathology* 17, 1409–1424. doi:10.1111/mpp.12423.
- O'Brien, H. E., Thakur, S., and Guttman, D. S. (2011). Evolution of Plant Pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A Genomics Perspective. *Annu Rev Phytopathol* 49, 269–289. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095242.
- O'Brien, J. A., and Benková, E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.* 4, 451. doi:10.3389/fpls.2013.00451.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E. A., Moussatche, P., Lund, S. T., Jones, J. B., and Klee, H. J. (2003). Susceptible to intolerance--a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant J.* 33, 245–257. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01619.x.
- O'Neill, E. M., Mucyn, T. S., Patteson, J. B., Finkel, O. M., Chung, E.-H., Baccile, J. A., et al. (2018). Phevamine A, a small molecule that suppresses plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E9514–E9522. doi:10.1073/pnas.1803779115.
- Oberhänsli, T., Defago, G., and Haas, D. (1991). Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: Role of tryptophan side chain oxidase. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2273–2279. doi:10.1099/00221287-137-10-2273.
- OH, C.-S., KIM, J. F., and Beer, S. V. (2005). The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. *Molecular Plant Pathology* 6, 125–138. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00269.x.
- Okoro, C. K., Barquist, L., Connor, T. R., Harris, S. R., Clare, S., Stevens, M. P., et al. (2015). Signatures of Adaptation in Human Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003611. doi:10.1371/journal.pntd.0003611.
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., et al. (2012). Intracontinental spread of human invasive

- Salmonella Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat Genet* 44, 1215–1221. doi:10.1038/ng.2423.
- Olatunji, D., Geelen, D., and Verstraeten, I. (2017). Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *IJMS* 18, 2587–29. doi:10.3390/ijms18122587.
- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Macho, A. P., Mansfield, J. W., and Beuzón, C. R. (2010a). Positive regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *MPMI* 23, 665–681. doi:10.1094/MPMI-23-5-0665.
- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Mansfield, J. W., and Beuzón, C. R. (2010b). Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *MPMI* 23, 682–701. doi:10.1094/MPMI-23-5-0682.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., et al. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. doi:10.1093/bioinformatics/btv421.
- Palm, C. J., Gaffney, T., and Kosuge, T. (1989). Cotranscription of genes encoding indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi. *Journal of Bacteriology* 171, 1002–1009. doi:10.1128/jb.171.2.1002-1009.1989.
- Palmer, B. R., and Marinus, M. G. (1994). The dam and dcm strains of *Escherichia coli* - a review. *Gene* 143, 1–12. doi:10.1016/0378-1119(94)90597-5.
- Paponov, I. A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J. A. H., et al. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 1, 321–337. doi:10.1093/mp/ssm021.
- Parker, J. K., Chen, H., McCarty, S. E., Liu, L. Y., and La Fuente, De, L. (2016). Calcium transcriptionally regulates the biofilm machinery of *Xylella fastidiosa* to promote continued biofilm development in batch cultures. *Environ Microbiol* 18, 1620–1634. doi:10.1111/1462-2920.13242.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. (2010). Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the rpoD locus. *Plant Pathology* 60, 338–344. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02366.x.
- Passos da Silva, D., Castañeda-Ojeda, M. P., Moretti, C., Buonauro, R., Ramos, C., and Venturi, V. (2014). Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease. *Microbiology (Reading, Engl.)* 160, 556–566. doi:10.1099/mic.0.074468-0.

- Patrauchan, M. A., Sarkisova, S. A., and Franklin, M. J. (2007). Strain-specific proteome responses of *Pseudomonas aeruginosa* to biofilm-associated growth and to calcium. *Microbiology* 153, 3838–3851. doi:10.1099/mic.0.2007/010371-0.
- Patten, C. L., and Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3795–3801. doi:10.1128/aem.68.8.3795-3801.2002.
- Patten, C. L., Blakney, A. J. C., and Coulson, T. J. D. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 395–415. doi:10.3109/1040841X.2012.716819.
- Patten, C. L., microbiology, B. G. C. J. O., 1996 (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *NRC Research Press* 42, 207–220. doi:10.1139/m96-032.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., et al. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* 18, 715–727. doi:10.1101/gad.289504.
- Perez-Martinez, I., Rodriguez-Moreno, L., Lambertsen, L., Matas, I. M., Murillo, J., Tegli, S., et al. (2010). Fate of a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Type III Secretion System Mutant in Olive Plants (*Olea europaea* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3611–3619. doi:10.1128/AEM.00133-10.
- Perez-Martinez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G. W., and Ramos, C. (2008). Global Genomic Analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Plasmids. *Journal of Bacteriology* 190, 625–635. doi:10.1128/JB.01067-07.
- Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Matas, I. M., and Ramos, C. (2007). Strain selection and improvement of gene transfer for genetic manipulation of *Pseudomonas savastanoi* isolated from olive knots. *Research in Microbiology* 158, 60–69. doi:10.1016/j.resmic.2006.09.008.
- Perley, J. E., and Stowe, B. B. (1966). On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. *Plant Physiol.* 41, 234–237.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al. (2004). UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084.
- Pérez-Mendoza, D., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.-T., et al. (2014). Responses to Elevated c-di-GMP Levels in Mutualistic and Pathogenic Plant-Interacting Bacteria. *PLoS ONE* 9, e91645–13. doi:10.1371/journal.pone.0091645.

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45–45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Pfeilmeier, S., Pfeilmeier, S., Caly, D. L., Caly, D. L., Malone, J. G., and Malone, J. G. (2016). Bacterial pathogenesis of plants: Future challenges from a microbial perspective. *Molecular Plant Pathology* 17, 1298–1313. doi:10.1111/mpp.12427.
- Pirc, M., Ravnikar, M., and Dreo, T. (2015). First Report of *Pseudomonas savastanoi* Causing Bacterial Leaf Spot of *Mandevilla sanderi* in Slovenia. *Plant Disease* 99, 415–415. doi:10.1094/PDIS-07-14-0672-PDN.
- Powell, G. K., and Morris, R. O. (1986). Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: homology with *Agrobacterium tumefaciens* tmr and tzs loci. *Nucleic Acids Research* 14, 2555–2565. doi:10.1093/nar/14.6.2555.
- Pradhan, B. B., Ranjan, M., and Chatterjee, S. (2012). XadM, a novel adhesin of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, exhibits similarity to Rhs family proteins and is required for optimum attachment, biofilm formation, and virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1157–1170. doi:10.1094/MPMI-02-12-0049-R.
- Putnam, M. L., Curtis, M., Serdani, M., 2010 (2010). *Pseudomonas savastanoi* found in association with stem galls on *Mandevilla*. *Phytopathology*.
- Rajagopal, S., and Ponnusamy, M. (2017). *Calcium Signaling: From Physiology to Diseases*. Singapore: Springer Singapore doi:10.1007/978-981-10-5160-9.
- Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., and Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology* 13, 998–1009. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x.
- Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., and Bartel, B. (2004). A Family of Auxin-Conjugate Hydrolases That Contributes to Free Indole-3-Acetic Acid Levels during Arabidopsis Germination. *Plant Physiol.* 135, 978–988. doi:10.1104/pp.104.039677.
- Rodríguez-Moreno, L., Barceló-Muñoz, A., and Ramos, C. (2008). In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology* 98, 815–822. doi:10.1094/PHYTO-98-7-0815.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I. M., Murillo, J., López-Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., et al. (2010). Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. 12, 1604–1620. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02207.x.

- Rohas, A. M., García de los Rios, J. E., Fischer-Le Saux, M., Jimenez, P., Reche, P., Bonneau, S., et al. (2004). *Erwinia toletana* sp. nov., associated with *Pseudomonas savastanoi*-induced tree knots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2217–2222. doi:10.1099/ijs.0.02924-0.
- Rojas, A. M., Rios, J. E. G. de L., Saux, M. F.-L., Jimenez, P., Reche, P., Bonneau, S., et al. (2004). *Erwinia toletana* sp. nov., associated with *Pseudomonas savastanoi*-induced tree knots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2217–2222. doi:10.1099/ijs.0.02924-0.
- Romano, C. P., Hein, M. B., and Klee, H. J. (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.* 5, 438–446.
- Ruiz Rosquete, M., Barbez, E., and Kleine-Vehn, J. (2012). Cellular auxin homeostasis: Gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant* 5, 772–786. doi:10.1093/mp/ssr109.
- Russell, D. W., and Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ryan, R. P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., et al. (2009). HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 11, 1126–1136. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01842.x.
- Ryu, R. J., and Patten, C. L. (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology* 190, 7200–7208. doi:10.1128/JB.00804-08.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431–449. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231.
- Santner, A., and Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459, 1071–1078. doi:10.1038/nature08122.
- Sarkar, S. F., and Guttman, D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1999–2012. doi:10.1128/aem.70.4.1999-2012.2004.
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Tumlinson, J. H., Block, A., and Alborn, H. T. (2004). The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *The Plant Journal* 39, 790–808. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02168.x.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.

- Shukla, S. K., and Rao, T. S. (2013). Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: A confocal laser scanning microscopic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103, 448–454. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.11.003.
- Singletary, L. A., Karlinsey, J. E., Libby, S. J., Mooney, J. P., Lokken, K. L., Tsolis, R. M., et al. (2016). Loss of Multicellular Behavior in Epidemic African Nontyphoidal *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ST313 Strain D23580. *mBio* 7, 1–11. doi:10.1128/mBio.02265-15.
- Sisto, A., Cipriani, M. G., and Morea, M. (2004). Knot Formation Caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on Olive Plants Is hrp-Dependent. *Phytopathology* 94, 484–489. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.5.484.
- Sisto, A., Cipriani, M. G., Tegli, S., Cerboneschi, M., Stea, G., and Santilli, E. (2007). Genetic characterization by fluorescent AFLP of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from different host species. *Plant Pathology* 56, 366–372. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01567.x.
- Smidt, M., and Kosuge, T. (1978). The rôle of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiological Plant Pathology* 13, 203–213. doi:10.1016/0048-4059(78)90035-8.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. doi:10.1021/ac051437y.
- Soby, S., Kirkpatrick, B., and Kosuge, T. (1991). Chemotaxis of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Virulence Mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2918–2920.
- Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a001438. doi:10.1101/cshperspect.a001438.
- Spaepen, S., Das, F., Luyten, E., Michiels, J., and Vanderleyden, J. (2009). Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS Microbiol Lett* 291, 195–200. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01453.x.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31, 425–448. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.
- Staswick, P. E. (2005). Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *THE PLANT CELL ONLINE* 17, 616–627. doi:10.1105/tpc.104.026690.

- Storz, G. (2002). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* 296, 1260–1263. doi:10.1126/science.1072249.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- Sugawara, M., Okazaki, S., Nukui, N., Ezura, H., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2006). Rhizobitoxine modulates plant–microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnology Advances* 24, 382–388. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.01.004.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., et al. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5430–5435. doi:10.1073/pnas.0811226106.
- Sultan, S. Z., Pitzer, J. E., Boquoi, T., Hobbs, G., Miller, M. R., and Motaleb, M. A. (2011). Analysis of the HD-GYP Domain Cyclic Dimeric GMP Phosphodiesterase Reveals a Role in Motility and the Enzootic Life Cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 79, 3273–3283. doi:10.1128/IAI.05153-11.
- Surico, G., Iacobellis, N. S., and Sisto, A. (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology* 26, 309–320. doi:10.1016/0048-4059(85)90006-2.
- Taguchi, F., Inoue, Y., Suzuki, T., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., et al. (2014). Characterization of quorum sensing-controlled transcriptional regulator MarR and Rieske (2Fe-2S) cluster-containing protein (Orf5), which are involved in resistance to environmental stresses in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*6605. *Molecular Plant Pathology* 16, 376–387. doi:10.1111/mpp.12187.
- Taylor, J. D., Teverson, D. M., Allen, D. J., and Pastor-Corrales, M. A. (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathology* 45, 469–478. doi:10.1046/j.1365-3059.1996.d01-147.x.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., and Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 847–859. doi:10.1038/nrm2020.
- Tegli, Bini, Calamai, Cerboneschi, and Biancalani (2020). A MATE Transporter is Involved in Pathogenicity and IAA Homeostasis in the Hyperplastic Plant Pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. *Microorganisms* 8, 156–17. doi:10.3390/microorganisms8020156.

- Tegli, S., Gori, A., Cerboneschi, M., Cipriani, M. G., and Sisto, A. (2011). Type Three Secretion System in *Pseudomonas savastanoi* Pathovars: Does Timing Matter? *Genes* 2, 957–979. doi:10.3390/genes2040957.
- Tegli, S., Cerboneschi, M., Libelli, I. M., and Santilli, E. (2010). Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. *BMC Microbiology* 10, 156. doi:10.1186/1471-2180-10-156.
- Temsah, M., Hanna, L., and Saad, A. T. (2007a). Anatomical observations of *Pseudomonas savastanoi* on *Rhamnus alaternus*. *Forest Pathology* 37, 64–72. doi:10.1111/j.1439-0329.2007.00483.x.
- Temsah, M., Hanna, L., and Saad, A. T. (2007b). Histology of pathogenesis of *Pseudomonas savastanoi* on *Myrtus communis*. *Journal of Plant Pathology*.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., and Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology* 11, 472–477. doi:10.1016/j.mib.2008.09.006.
- Thakur, S., Weir, B. S., and Guttman, D. S. (2016). Phytopathogen Genome Announcement: Draft Genome Sequences of 62 *Pseudomonas syringae* Type and Pathotype Strains. *MPMI* 29, 243–246. doi:10.1094/MPMI-01-16-0013-TA.
- Thomashow, L. S., Reeves, S., and Thomashow, M. F. (1984). Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the Agrobacterium Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 5071–5075.
- Thornton, B., and Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 39, 145–154. doi:10.1002/bmb.20461.
- Ulmasov, T., Liu, Z. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *THE PLANT CELL ONLINE* 7, 1611–1623. doi:10.1105/tpc.7.10.1611.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971. doi:10.1105/tpc.9.11.1963.
- Van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., et al. (2011). Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microb. Ecol.* 61, 723–728. doi:10.1007/s00248-011-9819-6.
- Vande Broek, A., Gysegom, P., Ona, O., Hendrickx, N., Prinsen, E., Van Impe, J., et al. (2005). Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-

- 3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *MPMI* 18, 311–323. doi:10.1094/MPMI-18-0311.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., and Vanderleyden, J. (1999). Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 181, 1338–1342.
- Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., and Gallegos, M.-T. (2011). Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 1207–1219. doi:10.1094/MPMI-03-11-0077.
- Viana, D., Comos, M., McAdam, P. R., Ward, M. J., Selva, L., Guinane, C. M., et al. (2015). A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host tropism. *Nat Genet* 47, 361–366. doi:10.1038/ng.3219.
- Vinatzer, B. A., Monteil, C. L., and Clarke, C. R. (2014). Harnessing Population Genomics to Understand How Bacterial Pathogens Emerge, Adapt to Crop Hosts, and Disseminate. *Annu Rev Phytopathol* 52, 19–43. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045907.
- Waite, C., Schumacher, J., Jovanovic, M., Bennett, M., and Buck, M. (2017). Negative autogenous control of the master type III secretion system regulator HrpL in *Pseudomonas syringae*. *mBio* 8. doi:10.1128/mBio.02273-16.
- Wang, B., Chu, J., Yu, T., Xu, Q., Sun, X., Yuan, J., et al. (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 4821–4826. doi:10.1073/pnas.1503998112.
- Wassarman, K. M. (2002). Small RNAs in bacteria: Diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* 109, 141–144. doi:10.1016/S0092-8674(02)00717-1.
- Waters, L. S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136, 615–628. doi:10.1016/j.cell.2009.01.043.
- Weijers, D., Sauer, M., Meurette, O., Friml, J., Ljung, K., Sandberg, G., et al. (2005). Maintenance of Embryonic Auxin Distribution for Apical-Basal Patterning by PIN-FORMED-Dependent Auxin Transport in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* 17, 2517–2526. doi:10.1105/tpc.105.034637.
- Werthén, M., and Lundgren, T. (2001). Intracellular Ca²⁺ mobilization and kinase activity during acylated homoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia liquefaciens*. *J. Biol. Chem.* 276, 6468–6472. doi:10.1074/jbc.M009223200.
- Wright, P. R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D. A., Richter, A. S., Lott, S., et al. (2014). CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and

- interaction domains. *Nucleic Acids Research* 42, W119–W123. doi:10.1093/nar/gku359.
- Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., and Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research* 43, W251–W257. doi:10.1093/nar/gkv380.
- Xiao, Y., and Hutcheson, S. W. (1994). A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology* 176, 3089–3091. doi:10.1128/jb.176.10.3089-3091.1994.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y., and Hutcheson, S. W. (1994). Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 hrp and hrmA genes. *Journal of Bacteriology* 176, 1025–1036. doi:10.1128/jb.176.4.1025-1036.1994.
- Xie, B., Xu, K., Zhao, H. X., and Chen, S. F. (2005). Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 248, 57–63. doi:10.1016/j.femsle.2005.05.020.
- Xie, S.-X., Kato, Y., Komeda, H., Yoshida, S., and Asano, Y. (2003). A Gene Cluster Responsible for Alkylaldoxime Metabolism Coexisting with Nitrile Hydratase and Amidase in *Rhodococcus globerulus*A-4. *Biochemistry* 42, 12056–12066. doi:10.1021/bi035092u.
- Xie, Y., Shao, X., and Deng, X. (2019). Regulation of type III secretion system in *Pseudomonas syringae*. *Environ Microbiol* 21, 4465–4477. doi:10.1111/1462-2920.14779.
- Xin, X.-F., and He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomatoDC3000: 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.
- Xin, X.-F., Kvitko, B., and He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Publishing Group* 16, 1–13. doi:10.1038/nrmicro.2018.17.
- Yang, S., Zhang, Q., Guo, J., Charkowski, A. O., Glick, B. R., Ibekwe, A. M., et al. (2007). Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1079–1088. doi:10.1128/AEM.01770-06.
- Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L., and Stead, D. E. (1992). Changing Concepts in the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 30, 67–105. doi:10.1146/annurev.py.30.090192.000435.

- Yu, X.-L. (2019). Overexpression of OsIAAGLU reveals a role for IAA–glucose conjugation in modulating rice plant architecture. *Plant Cell Reports* 38, 731–739. doi:10.1007/s00299-019-02402-4.
- Yuan, Z.-C., Haudecoeur, E., Faure, D., Kerr, K. F., and Nester, E. W. (2008). Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*–plant co-evolution. *Cell. Microbiol.* 10, 2339–2354. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01215.x.
- Yue, M., Han, X., Masi, L. D., Zhu, C., Ma, X., Zhang, J., et al. (2015). Allelic variation contributes to bacterial host specificity. *Nature Communications* 6, 8754–11. doi:10.1038/ncomms9754.
- Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., et al. (2019). The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules* 24, 1411–14. doi:10.3390/molecules24071411.
- Zhao, Y. (2010). Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 49–64. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112308.
- Zheng, Z., Guo, Y., Novák, O., Chen, W., Ljung, K., Noel, J. P., et al. (2016). Local auxin metabolism regulates environment- induced hypocotyl elongation. *Nature Plants* 2, 1–9. doi:10.1038/nplants.2016.25.
- Zhou, G., Li, L.-J., Shi, Q.-S., Ouyang, Y.-S., Chen, Y.-B., and Hu, W.-F. (2014). Efficacy of metal ions and isothiazolones in inhibiting *Enterobacter cloacae* BF-17 biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* 60, 5–14. doi:10.1139/cjm-2013-0492.
- Zhou, J.-M., and Chai, J. (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current Opinion in Microbiology* 11, 179–185. doi:10.1016/j.mib.2008.02.004.