

**Papel de los efectores tipo
III en la especificidad de
huésped de los patovares
de *Pseudomonas
savastanoi***



ALBA MORENO PÉREZ

Director: Cayo J. Ramos Rodríguez

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"
Universidad de Málaga – CSIC
Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



2020

Programa de Doctorado de
Biotecnología Avanzada



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alba Moreno Pérez

 <http://orcid.org/0000-0001-5089-8654>

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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Memoria presentada por

Alba Moreno Pérez

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga

Papel de los efectores tipo III en la especificidad de huésped de los patovares de *Pseudomonas savastanoi*

Director: Dr. Cayo J. Ramos Rodríguez

Catedrático. Área de Genética

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM)

Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Málaga, 2020



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

COMITÉ EVALUADOR

Presidente

Dra. Carmen R. Beuzón López

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología
Universidad de Málaga

Secretario

Dra. Patricia Bernal Guzmán

Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

Vocal

Dr. Alberto P. Macho Escribano

Shanghai Center for Plant Stress Biology
Chinese Academy of Sciences

Suplentes

Dr. Francisco Javier Ruiz Albert

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología
Universidad de Málaga

Dr. Francisco Javier López Baena

Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

Dra. Paula Salinas Salvo

Escuela de Biotecnología
Universidad de Santo Tomás



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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 **ALBA MORENO PÉREZ** ha realizado en este Departamento y bajo mi dirección el trabajo titulado “Papel de los efectores tipo III en la especificidad de huésped de los patovares de *Pseudomonas savastanoi*”, 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, extendiendo el presente informe.

En Málaga, a 20 de octubre de 2020.

Fdo: Cayo J. Ramos Rodríguez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



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

D./Dña ALBA MORENO PÉREZ

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: PAPEL DE LOS EFECTORES TIPO III EN LA ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED DE LOS PATOVARES DE PSEUDOMONAS SAVASTANOI

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.: ALBA MORENO PÉREZ





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi familia

A Chus



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

La primera culpable de que hoy esté escribiendo estos agradecimientos es la Genética Mendeliana, la cual me enamoró y despertó en mí una curiosidad y ganas de saber que nunca nada antes había despertado. Esto me llevó a estudiar biología, a pelear por entrar en el departamento de Genética y finalmente a realizar una Tesis Doctoral. Si tuviese que definir que ha sido la Tesis Doctoral para mí, diría que ha sido como una subida a una montaña. Cuando empiezas no ves la cima, pero la energía y la ilusión de algo nuevo te empuja hacia arriba. Hay veces que el camino es fácil y te permite ver la belleza que te rodea, otras veces el cansancio no te deja ver más allá de tus pies y hasta que no llegas a un mirador que te permite descansar no eres capaz de apreciar la verdadera belleza que tienes a tu alrededor. Lo mejor de este recorrido es que no lo he hecho sola, sino que a lo largo de este camino son muchas las personas que me han enseñado, ayudado y apoyado para hacer que mi llegada a la cima fuese posible.

En primer lugar, quiero dar las gracias a Cayo Ramos, mi director de Tesis, y sin el cual este camino no habría comenzado. Muchas gracias por animarme, por los consejos durante la carrera y por abrirme las puertas de tu laboratorio. Gracias por la confianza depositada en mí para realizar una Tesis Doctoral, por tu tiempo y dedicación en este proyecto, por tu paciencia, por tu apoyo hasta cuando las cosas se atascaban y por haber sabido sacar a la científica que llevaba dentro. Gracias también por esos días que llegabas con churros sin avisar y por esas comidas de grupo en las que tantas batallitas hemos compartido. Aquí también, quiero agradecer a Araceli por haberme puesto en contacto contigo cuando aún no sabía si estudiaría biología.

A mis compañeros del Cayo's Lab, con los que tantas horas he compartido y que tanto me han ayudado en este proceso. Gracias a Meli e Isa Matas por su sabiduría y por estar siempre dispuestas a ayudar. A Pilar por transmitirme toda su experiencia en el tipo III y siempre responder a todas mis dudas. A Isabel Aragón, mi maestra en el Lab, por todo lo que me enseñó, por su paciencia, por sus consejos y por estar siempre dispuesta a ayudarme con todo. A Isa P. (La Pepa) por transmitir siempre esa alegría y positividad, y por acogerme en casa esas noches de cena que se convertían en desayunos. A Super Eloy, que le tocó ser padre soltero de dos cachorros preguntones, muchas gracias por ayudarme, por tu paciencia, por los motes y por esas canciones con las que siempre aparecías cantando por el Lab. A Marta, por estar siempre dispuesta a ayudar, por los consejos, por el apoyo y por esas noches de salsa. A Carla, mi tocaya de cumple y la pezuqueña del Lab, gracias por contagiarme con tu música y por los momentos vividos. A Luis, el último en llegar, muchas gracias por tu experiencia. A las visitantes de fuera Maite, Paola y Diana, gracias. A todos los alumnos

internos que han pasado por el Lab estos años, Kim, Fran, Jesús, Antonio, los Manueles, Antonio (Xena), Guille, Miguel, Hilario y Nacho, por las ganas e ilusión renovadas que traéis al Lab. Y por último agradecer a la persona con la que más he compartido, Adrián, juntos hemos comenzado esta aventura y junto vamos a terminarla, gracias por tu apoyo y ayuda, por entenderme tan bien, por las risas y miradas cómplices, por el pavo descontrolado y por esos bailes de reguetón y momentos vividos (¡Arriba el matrimonio Calva-Calvillo!). Muchísimas gracias a todos os habéis convertido en algo más que compañeros de trabajo...amigos.

A los que formabais parte del Carmen's Lab, Adela, Inma, Ainhoa y Spy...muchas gracias por ayudarme en mis comienzos. A Carmen por estar dispuesta a resolver todas mis dudas científicas y de doctorado, y por la carta de recomendación a Gitta. A Josico, por toda la ayuda y consejos que me has dado, y por dejarme robar tu vida en Davis. A Dieguín por estar siempre dispuesto a echarme un cable. A Nieves por tener siempre esas ganas y energía para todo que se contagian. A Javi por poner un toque fitness al Lab y por las croquetas de tu madre. A Ángel y Laura, los últimos en llegar al Carmen's Lab por su energía y entusiasmo. A Luis, el chico del fondo friki, por tus bromas y por las risas compartidas en las comidas, y a Lau, Darío, Eva y Marina que ya se han compartido en parte del grupo. A los genéticos y bioquímicos de la torre por las excursiones a la Pepa, los días de salsa, las cervezas de los jueves y ese loco día de PaintBall: Karen, Bea, Pepe, Jessi, Delphine, Blanca, Ana Luna, Tábata, Álvaro, Mario, José y Carlos. En especial gracias a Bego, compañera de piso y amiga por esas comidas en la facultad y por tu continuo apoyo. A Enrique y Ana por hacerme participe del proyecto "El joven rostro de la ciencia", a Eduardo por estar siempre dispuesto a gestionar cualquier problema y a ayudar a resolverlo, y al resto de profesores del Área de Genética, Javi, Araceli, Julia, Jesús y Guillermo por todo lo que he podido aprender de vosotros como profesores y científicos. A los técnicos Mayte, Silvia, Jessi, Rocío, Marina, y en especial a Pablo por su trabajo día a día, sus dibujos en el tablón y su alegría. A Eli, Lucía y Javi por la producción y cuidado de las plantas. A Pepi y Rocío por la secuenciación y análisis bioinformático del *RNAseq*. Muchísimas gracias a todos.

A todos los jefes del grupo de Microbiología, Antonio de Vicente, Francis, Alejandro, Torés, Lola y Diego. A todos los que se fueron y llegaron durante mi tesis: Nacho, Víctor, David, Eva, Jesús Martínez, Carmen, Jesús Cámara, Conchita, Joaquín, Jesús Hierrezuelo, Irene, Marisa, María, Zahira, Saray, Sandra, Alejandra, Ana María, Carlos, Mariluz, Rafa, Montse. A Guti, France y Alvarito por las charlas y los momentos fuera del lab. Muchas gracias a todos por los consejos en los seminarios de los jueves, por estar siempre dispuestos a ayudar y por las risas y los bailes compartidos en los congresos.

Many thanks to Gitta Coaker for giving me the opportunity to work within her group, for treating me as a member of her group and for all the knowledge She transmit during the four months I stayed there. Many thanks to all the people from the Coaker lab for making me feel at home, for always being willing to help and for the beers after work: Tanya, Tania, Signe, Paola, Lei, Bardo, Shree, Dani, Jessica, Stephen, DongHyuk and Qingyang.

También agradecer a mi pequeña familia americana, Honza, Barbora, Martin y el pequeño Tomi, por acogerme en su casa, por tratarme como una más y por mostrarme el lado más salvaje y natural de California. A Ana, por hacer que desde el primer momento me sintiera como en casa, a Joni por las cenas cuando tocaba trabajar en el Lab hasta las tantas, a María por las escapadas en bici y al resto de gente tan maravillosa con la que viví momentos de risas, alegrías y aventuras en Davis que nunca olvidaré: Sara, Nando, Javi, Mateo, Nuria, Edu, Jesús, Antonio, Marisa y el Club Internacional Davis (Thank you Jay).

A mis amigos de fuera del laboratorio, a los que si nombro uno por uno tendría que dedicar un libro entero. Gracias por las charlas, los consejos, la ayuda, las risas, los campings, las noches de jueguitos, las cervezas, los bailes en el Varsovia, las cenitas y todo el apoyo que me habéis dado durante todos estos años. ¡Os quiero! Thank you very much to my teacher Sandra for making me able to defend myself in English and for all her corrections.

A toda mi familia. En primer lugar, gracias a mis padres por todo el esfuerzo que han tenido que hacer todos estos años para que hoy yo esté aquí escribiendo estos agradecimientos, gracias por como sois, por la educación que me habéis dado, por luchar siempre por mí y por apoyarme con los ojos cerrados cuando decidí que quería ser científica. A mi hermano Yiyo por su apoyo incondicional y por siempre sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba. A mis primas, Pepo y Evita, por las escapadas y esos momentos de risas que me hacían olvidar cualquier experimento fallido, y por presentarme a Laura (gracias Laura). A la familia Cazorla Sánchez por acogerme como una más y por todo el apoyo que me han dado estos años. A mis abuelos que echo mucho de menos y a todos aquellos que habéis estado siempre ahí apoyándome durante este camino. Muchas gracias, os quiero mucho a todos.

Y, por último, tengo que agradecer a Chus, el amor de mi vida. Tu mejor que nadie sabes lo que han supuesto para mí estos años de Tesis. Gracias por recorrer este camino conmigo, hacerme ver siempre el lado positivo de las cosas, animarme a continuar siempre hacia delante, apoyarme incondicionalmente, hacerme olvidar de todo tras las largas jornadas de trabajo y por, en definitiva, hacerme tan feliz. Por todos los momentos que hemos vivido juntos y por los que quedan por venir. Muchas gracias. Te quiero.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas,
ahora sabemos que está en nuestros genes”*

James Watson



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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 Personal Investigador (FPI) BES-2015-074847.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas y Acrónimos	23
Abstract	27
Introducción General	45
1. El complejo <i>Pseudomonas syringae</i>	47
2. <i>Pseudomonas savastanoi</i>	48
3. El sistema de secreción tipo III	54
Objetivos	69
Materiales y Métodos Generales	73
Capítulo I	85
Especificidad de huésped en <i>Pseudomonas savastanoi</i>: patogenicidad cruzada en huéspedes leñosos y análisis genómico de sistemas de secreción	85
INTRODUCCIÓN	87
MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
RESULTADOS.....	96
DISCUSIÓN	114
Capítulo II	123
El regulón HrpL de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335: análisis transcriptómico y predicción <i>in silico</i>	123
INTRODUCCIÓN	125
MATERIAL Y MÉTODOS.....	129
RESULTADOS.....	139
DISCUSIÓN	159
Capítulo III	167
Efectores del sistema de secreción tipo III implicados en el rango de huésped de <i>Pseudomonas savastanoi</i>	167
INTRODUCCIÓN	169
MATERIAL Y MÉTODOS.....	172
3.1 Efectores del T3SS de <i>P. savastanoi</i> asociados a huéspedes leñosos	182
RESULTADOS	182
DISCUSIÓN	199
3.2 Estudio del papel en el rango de huésped de los efectores AvrPto1, AvrRps4, HopF1 y HopZ5 de <i>P. savastanoi</i>	207
RESULTADOS	207
DISCUSIÓN	216
ANEXO CAPÍTULO III.....	221
Discusión General	227
Conclusiones	239
Conclusions	243
Bibliografía	247
Anexo I: Publicaciones	267



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas y Acrónimos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A

AHL: *N*-acil homoserina lactona
ANOVA: Análisis de la variancia
Ap: ampicilina
A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

B

BLAST: *Basic local alignment search tool*

C

cDNA: DNA complementario
CDS: región codificante
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
CFBP: *Collection Française de Bactéries Phytopathogènes*
Ch: cicloheximida
Cm: cloranfenicol
Core: conjunto de ortólogos compartidos entre todos los genomas

D

DAPP: *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia* (Perugia, Italia)
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidad óptica
dpi: días posinoculación

E

E. coli: *Escherichia coli*
ED: genes expresados diferencialmente en el estudio RNAseq
ETI: *Effector-Triggered Immunity*
ETS: *Effector-Triggered Susceptibility*

F

FG: filogrupo
FPKM: fragmentos por kilobase de fragmentos de gen por millón de lecturas

G

GFP: proteína verde fluorescente
Gm: gentamicina

H

h: hora(s)
Hop: *hrp outer protein*
HR: respuesta de hipersensibilidad
hrc: *hypersensitive response and conserved*
hrp: *hypersensitive response and pathogenicity*

I

IAA: ácido indol-3-acético
ICMP: *International Collection of Microorganisms from Plants*

K

Kb: Kilobase
KB: medio *King's Broth*
Km: kanamicina

L

LB: medio *Lysogenic Broth*

M

M: Molar
MAMP: *Microbial-associated Molecular Patterns*
min: minuto(s)
MLSA: *Multilocus sequence analysis*
ml: mililitros
mM: millimolar

N

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*
NCPPB: *National Collection of Plant Pathogenic Bacteria*
Nf: nitrofurantoina

ng: nanogramos

NLR: *nucleotide-binding and leucine-rich repeat*

nt: nucleótidos

O

o/n: durante toda la noche

ORF: marco abierto de lectura

P

PAMP: *Pathogen-associated Molecular Patterns*

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Pph: *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola

PRR: *Pattern Recognition Receptors*

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*

PTI: *Pattern-Triggered Immunity*

Pto: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

pv.: patovar

R

Rif: rifampicina

RNA: ácido ribonucleico

R-PAI: T3SS rizhobial

rpm: revoluciones por minuto

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: PCR de transcripción inversa

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

S

SDC: sistema de dos componentes

SOB: medio *Super Optimal Broth*

Sp: espectinomicina

T

T3E: efector del sistema de secreción tipo III

T3SS: sistema de secreción tipo III

T4SS: sistema de secreción tipo IV

T6SS: sistema de secreción tipo VI

TBE: tampón Tris/Borato EDTA

T-PAI: T3SS canónico

U

UFC: unidades formadoras de colonias

W

WHOP: Woody host and *Pseudomonas*

Abstract



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The *Pseudomonas syringae* complex, a group of Gram (-) bacteria considered to be the most relevant group of plant pathogens from a scientific and economic point of view (Mansfield *et al.*, 2012). It comprises at least 13 phylogroups (PG) encompassing 15 different species of *Pseudomonas* associated with plants and the water cycle (Berge *et al.*, 2014; Gomila *et al.*, 2017). The complex is also divided at an infrasubspecific level into approximately 65 pathovars based on characteristic plant host ranges (Bull and Koike, 2015). The wide host range of the *P. syringae* complex contrasts with the host specialization of most agricultural crop isolates. In contrast, environmental isolates show a wider host range (Morris *et al.*, 2013; Berge *et al.*, 2014; Monteil *et al.*, 2016). Additionally, a recent study showed that *P. syringae* strains form an overlapping continuum of host range potential with an equal representation of narrow, moderate, and broad host ranges (Morris *et al.*, 2019). Understanding this complexity at different levels requires the establishment of appropriate pathosystems, facilitating integration of phenotypic, genomic and evolutionary data. Due to this, the *P. syringae* complex has become one of the most relevant models to study host specificity in bacterial plant pathogens (Vinatzer *et al.*, 2014; Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b).

One of the most studied virulence factors of the *P. syringae* complex is the type III secretion system (T3SS), a macromolecular protein complex that allows pathogens to directly inject specialized proteins, called T3SS effectors (T3Es), from the bacterial cell to the host cytoplasm. T3SS is encoded and regulated by the product of the *hrp* genes (hypersensitive response and pathogenicity) and *hrc* genes (hypersensitive response and conserved), which are part of a pathogenicity island with other genes that encode T3Es (Alfano *et al.*, 2000). The main regulator of T3SS and its T3Es is the alternative sigma factor HrpL, which recognizes a well-preserved sequence (GGAACC-N_{15/16}-CCACNNA), known as the “hrp box” (Xiao and Hutcheson, 1994). The induction of *hrpL* transcription requires another alternative sigma factor, RpoN (σ 54), and two transcription activators, HrpR and HrpS. The HrpR and HrpS activators form a heterodimer that binds to the σ 54-dependent *hrpL* promoter and induces its transcription (Hendrickson *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001). A recent study revealed that HrpL imposes

autogenous control via the shared intergenic region with *hrpJ*, in which the association of the polymerase RNA complex and *hrpL* with *hrpJ* promoter-RNA prevents the HrpRS dimer from accessing the *hrpL* promoter binding site and activate its transcription (Waite *et al.*, 2017). In addition to the usual regulatory mechanisms of a prokaryotic cell, the T3SS in *P. syringae* is regulated by a group of environmental factors: T3SS is activated in nutrient-defective, low osmotic and acidic conditions (such as Hrp medium), but suppressed under high-pH, high-osmolarity and nutrient-rich media (such as King's B medium, KB) *in vitro* (Xie *et al.*, 2019a). Furthermore, in recent years thanks to the popularity and power of genome-wide mutant screening and high-throughput sequencing, new regulatory proteins (such as RhpR, AefR, AlgU and CvsR) and proteases (such as Lon and RhpP) have been identified as T3SS regulators in *P. syringae* pathovars (Xie *et al.*, 2019a).

Translocation of T3Es to T3SS by pathogenic bacteria is a key element in the establishment of infection. In plant pathogenic bacteria, these proteins primarily interfere with the plant immune system in two main lines of defense, pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI), avoiding recognition of the pathogen (Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006). That is why T3SS and its T3Es are considered the primary determinants of host specificity in the *P. syringae* complex at both the pathovar-species and race-cultivar levels (Fouts *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011). An example is the interaction of the nine described breeds of *P. syringae* pv. phaseolicola in its interaction with eight differential cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* and *P. acutifolius*) involving the interaction between five resistance (R) host genes and five T3Es genes (Jenner *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1996; Mansfield *et al.*, 1997; Tsiamis *et al.*, 2000). Recently, with the aim of studying the role of the ETI immune response in the determination of host specificity, a systematic study of ETI prevalence against the diversity of T3Es of *P. syringae* in *Arabidopsis thaliana* was carried out (Laflamme *et al.*, 2020). Although most of the studies have been conducted in strains isolated from herbaceous hosts, several woody pathosystems have currently been used as

models for the study of the role of T3Es and other virulence factors in the specialization and emergence of diseases in woody hosts (McCann *et al.*, 2013; Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b; Hulin *et al.*, 2018).

The *Pseudomonas savastanoi* species consists of four well-defined pathovars isolated from woody hosts, pv. *savastanoi* (Psv), pv. *nerii* (Psn), pv. *fraxini* (Psf) and pv. *retacarpa* (Psr), which correspond to strains isolated from the woody hosts olive, oleander, ash and Spanish broom, respectively (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). In addition, *P. savastanoi* has recently been identified as the causal agent of spot on leaves and stem of dipladenia (*Mandevilla* spp.), whose host range is different from the pathovars already established within this species (Eltlbany *et al.*, 2012), and that is why it has been proposed its inclusion within a new pathovar of *P. savastanoi*, pv. *mandevillae* (Psm) (Caballo-Ponce, 2017). The host range of the four well-defined pathovars of *P. savastanoi* has been clearly differentiated by cross-pathogenicity tests: Artificial inoculations of Psv strains induce tumor formation in olive (*Olea europaea*) and ash but not in oleander (*Nerium oleander*); while Psn strains can infect all three hosts; and Psr only in broom (*Retama sphaerocarpa*). In turn, Psf induces symptoms both in ash and olive (Janse, 1982; 1991; Álvarez *et al.*, 1998; Iacobellis *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2012; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). With respect to dipladenia isolates, Eltlbany *et al.*, (2012) mentioned that they induce symptoms in dipladenia and oleander, but not in olive or privet, however, in pathogenicity tests carried out in our research group, it was found that, in addition to dipladenia, these isolates also induce symptoms in olive and ash, but not in broom or oleander (Caballo-Ponce, 2017). Although the observed differences could be due to the use of different olive and oleander cultivars in both tests, as it has been shown in artificial inoculations of *P. savastanoi* in olive trees (Penyalver *et al.*, 2006), the differences observed in the host range of the dipladenia isolates in relation to the other four pathovars have allowed the inclusion of the dipladenia isolates in a new pathovar, which has been called pv. *mandevillae* (Psm) (Caballo-Ponce, 2017). Therefore, the availability of good delineation in the host range of *P. savastanoi* isolates supports

the use of these pathosystems to study the basis for host specificity in tumor-forming pathogenic bacteria in woody hosts.

The *P. savastanoi* strains also encode a complete and functional T3SS, which is phylogenetically related to that of other strains of the *P. syringae* complex (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Tegli *et al.*, 2011; Matas *et al.*, 2014; Baltrus *et al.*, 2017; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a; Moreno-Pérez *et al.*, 2020). In the Psv and Psn pathovars, knot formation in their respective hosts, as well as the hypersensitive response (HR) induction in resistant hosts, it depends on the presence of a functional T3SS that allows the translocation of effectors during the invasion process (Sisto *et al.*, 2004; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014; Biancalani *et al.*, 2016; Cerboneschi *et al.*, 2016). *In silico* analyses of several *P. savastanoi* strains have identified a pool of putative T3Es encoded by Psv NCPPB 3335, Psn ICMP 16943 and Psf ICMP 7711, which are composed of 31, 28, and 34 proteins, respectively (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). A more thorough characterization of the T3Es repertoire has been made in Psv NCPPB 3335, resulting in the demonstration of the translocation to the plant cells of eight proteins that exhibit homology with previously described *P. syringae* T3Es (i.e., AvrRpm2, HopA1, HopAA1, HopAF1-1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2, HopAZ1) and three effectors belonging to two novel T3Es families (i.e., HopBK1, HopBL1, and HopBL2) (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Interference with early plant defense responses has been reported for all these eleven Psv NCPPB 3335 T3Es. Furthermore, five of these proteins, HopAZ1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2, and HopBL1, also inhibit ETI. In addition, HrpL-dependent transcription has been made for seven of these (i.e., HopAF1-1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2, HopBK1, HopBL1, and HopBL2) (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b).

The main objective of this Thesis is to delve into the role of the genes regulated by the HrpL transcription factor (T3SS, T3Es and other virulence genes) in the

host specificity of the *P. savastanoi* pathovars isolated from woody hosts.

In the Chapter I of this Thesis, we performed comparative genomics analyses of 21 *P. savastanoi* genomes from strains isolated from olive, oleander, ash, broom, and dipladenia, covering all four well-defined *P. savastanoi* pathovars of woody hosts and the new pathovar Psm, i.e. Psv (six genomes), Psn (six genomes), Psr (three genomes), Psf (five genomes) and Psm (one genome). Cross-pathogenicity tests on a selection of sequenced *P. savastanoi* strains were performed to correlate the results of the genomics analyses with host specificity.

Pathogenicity of Psv strains NCPPB 3335 (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a) and DAPP-PG722 (Hosni *et al.*, 2011) in olive plants has been extensively reported. Other strains used in this study whose pathogenicity in their host of isolation was previously demonstrated include Psv ICMP 1411 (NCPPB 1344) (Pérez-Martínez *et al.*, 2007), Psn ESC23 (Tegli *et al.*, 2011; Cerboneschi *et al.*, 2016), Psf NCPPB 1006 (Janse, 1981; 1991; Iacobellis *et al.*, 1998), Psf CFBP 5062 (ICMP 7711) (Iacobellis *et al.*, 1998), Psr CECT 4861 (Álvarez *et al.*, 1998) and Psm Ph3 (Eltlbany *et al.*, 2012; Caballo-Ponce, 2017). However, results from artificial infections are not available for the remaining 13 strains used in this study, which were assigned to a *P. savastanoi* pathovar based on their host of isolation and, in some cases, to their performance on biochemical tests. All 10 *P. savastanoi* strains whose genomes were available in 2017 were included in cross-pathogenicity assays in all five hosts in order to compare their host range with results previously reported for *P. savastanoi* pathovars. The cross-pathogenicity tests reported here for nine *P. savastanoi* strains in olive, oleander, ash and broom plants agree with the host range reported for the four well-established *P. savastanoi* pathovars of woody hosts. Psm Ph3 strain and its isolation host, the dipladenia plant, were also included in the cross-pathogenicity tests, observing a unique host range for this strain. This supports using their genomes for comparative genomics analysis to identify candidate genes involved in host range definition.

In the phylogenetic analysis, the pathovars Psv, Psn, Psf and Psr corresponded with well-defined genetic lineages indicating distinct evolutionary events leading to host specialization, although it is necessary to make two considerations. First, the Psv genomes are distributed in two separated clades, clustering with either Psr or Psn genomes. Although intriguing, the occurrence of different genetic lineages for a given pathovar is not new nor surprising (Gironde and Manceau, 2012; Martín-Sanz *et al.*, 2012; Martín-Sanz *et al.*, 2013; Hulin *et al.*, 2018), because pathovars are defined for causing distinctive disease syndromes and not necessarily for their genetic relatedness (Young *et al.*, 1992). A second relevant consideration is the clustering with Psv strains of two putative Psn strains. These two strains were more like Psv than Psn for several characteristics, such as their pattern of T3E genes, including the truncated versions of the T3Es. Nevertheless, the ability of strains 0485-9 and ICMP 13786 to cause knots in olive but not in oleander, and their better survival in olive than in oleander tissues warrants their unequivocal classification as Psv strains (Janse, 1982).

Codification of structural and regulatory components of the T3SS, type IV secretion system (T4SS) and type 6 secretion system (T6SS) in *P. savastanoi* genomes was investigated using the web-based tool T346 Hunter (Martínez-García *et al.*, 2015a). The complete set of T4SS-A genes (*virB1-virB11* and *virD4*) carried by plasmid pPsv48B (Bardaji *et al.*, 2011b) was found in 13 genomes. Additionally, all 20 strains carried incomplete sets of T4SS-B genes (*tra* and/or *trb* genes) and T4SS-C genes (*tfc* genes). The T4SS-C is involved in propagation of genomic islands (Juhas, 2015), and has not been previously described in the *P. syringae* complex. Further investigations are required to determine the role of the *P. savastanoi* T4SSs in plasmid conjugation and mobilization and the delivery of protein effectors into host cells. As described for Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010), *P. savastanoi* strains encode two different T6SS clusters, one highly similar to that found in *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A and a second homologous to the T6SS *hcp1* cluster of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Considering the composition of both T6SS clusters and additional chromosomal

genes, all 21 genomes contains 12 of the 13 genes constituting the T6SS core (Boyer *et al.*, 2009), only lacking that encoding the forkhead-associated (FHA) domain-containing protein VCA0112. This gen is essential for T6SS activation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* but dispensable for T6SS functionality in *Acinetobacter baylyi* and *Edwardsiella tarda* (Ho *et al.*, 2014). Although in *P. syringae* pv. tomato DC3000 the T6SS is primarily used to inject toxins into bacterial competitors, this system also confers growth advantages against eukaryotic microbes (Haapalainen *et al.*, 2012). Considering the high homology and synteny of the T6SS *hcp1* cluster in *P. savastanoi* and *P. syringae* pv. tomato DC3000, it is likely that this system plays a similar role in both pathogens.

The 21 *P. savastanoi* genomes encodes two different T3SS clusters, as describe for Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010), the tripartite pathogenicity island (T-PAI) or canonical system, the most prevalent T3SS among sequenced strains of the *P. syringae* complex (Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b), and an additional T3SS resembling that found in *Rhizobium* species (R-PAI), which role during the life cycle of *P. syringae* complex strains remains to be elucidated dilucidar (Joardar *et al.*, 2005; Martínez-García *et al.*, 2015b; Dillon *et al.*, 2019b). The T-PAI T3SS cluster is essential for knot formation and for the induction of a visible hypersensitive response (HR) by Psv and Psn strains (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). The role of Psm Ph3 T3SS in the production of HR in tobacco was verified by the heterologous expression of *avrRpt2* (Caballo-Ponce, 2017). Although in Psf and Psr strains the functionality of this system has not been experimentally demonstrated, considering the high homology shown by the T-PAI T3SS cluster in all 21 genomes, a similar role in pathogenesis could be also expected in these two pathovars.

We also investigated the distribution of known T3E families across all 21 *P. savastanoi* genomes using *ad hoc* pipelines. The corresponding effectorome encodes 43 T3Es, including truncated genes, distributed in 37 T3E families from the Hop database (www.pseudomonas-syringae.org) and 33 of the new merged families (Dillon *et al.*, 2019a). Similarly, *P. savastanoi* strains encode 28 to 35 T3Es

genes. As expected, the only three core T3E genes of the *P. syringae* complex primary PGs (*avrE1*, *hopAA1* and *hopAJ2*) and the broadly distributed *hopM1* (Dillon *et al.*, 2019b), are also *P. savastanoi* core T3Es. *P. savastanoi* strains also encoded several T3E genes associated with pathogenicity on woody hosts, *i.e.* the core members *hopAO1*, *hopBL1* and, as well as *hopAY1*, *hopH3*, *hopZ5* and *hopAF1-1 hopBL2* (Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Hierarchical clustering based on T3E content of *P. savastanoi* genomes is similar to the core genome phylogeny indicating that the four pathovars contain characteristic sets of T3Es, which are thus likely contributing to define their pathogenicity profile. We found two novel T3E candidates not homologous to known T3Es but preceded by a *hrp* box promoter, characteristic of genes regulated by HrpL (Fouts *et al.*, 2002), and contain a N-terminal T3SS secretion signals (Lindeberg *et al.*, 2005). The gene coding for WP_032074452 was found in all 21 *P. savastanoi* genomes, whereas that for WP_057446723 was exclusively found in Psr genomes. We found allelic variants encoded by specific pathovars, and therefore could be involved in host specificity, include those only found in all Psn (*avrPto1*, *hopAT1* and *hopA2*), Psm Ph3 (*hopAS1*, *hopBL1* and *hopBL2*) or Psv strains (*hopAF1-2*). We therefore searched for exclusive T3E genes present/absent in specific pathovars. All three Psv genomes lack *hopG1* and encode *avrRps4*, *hopF1*, *hopZ5* and the putative novel T3E gene B7R56_RS15315. In this Chapter, a series of T3Es that may be involved in the host range of *P. savastanoi* have been identified by comparative genomics. Future studies with these T3Es could validate these predictions and confirm the role of these T3Es in defining the host range of *P. savastanoi*.

In the Chapter II of this Doctoral Thesis, with the aim of further studying the role of T3SS in Psn, Psm, Psv and Psv pathovars, mutants of loss of function of the HrpL regulator have been built in a model strain of each of them. With these mutants, pathogenicity tests have been conducted in their respective hosts and HR assays in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. The results show that, like the one described above in Psv (Matas *et al.*, 2014), in Psn, Psm, Psv and Psv pathovars, the positive regulator of the HrpL, is

also essential for both the formation of knots or excrecences in their respective hosts, and for the induction of an HR in tobacco and tomato plants. This is the first time that the Psm, Psf and Psr strains have been proved to have a T3SS which is active and functional.

In addition, in this Chapter, a characterization of the HrpL regulon of the Psv NCPPB 3335 has been performed, as well as a comparative transcriptomic analysis (RNA-seq) between the HrpL mutant and the wild strain. The *P. syringae* complex strains virulence requires the expression of genes induced by the HrpL transcription factor, but the HrpL regulon has only been studied so far using microarrays and RNAseq in pathogenic strains of herbaceous hosts (Ferreira *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). In this Chapter, the identification of HrpL-regulated genes in Psv NCPPB 3335 strain has been performed, a woody host pathogen, through two different approaches: (i) comparative transcriptomic analysis (RNAseq) between the $\Delta hrpL$ mutant and the wild type strain in Hrp medium, (ii) bioinformatics prediction of HrpL-dependent genes in Psv NCPPB 3335 genome.

Under our RNAseq comparative study conditions, a total of 53 genes have been identified whose expression is altered in the absence of the HrpL transcriptional factor, in particular 49 genes whose expression is induced by HrpL and 4 genes whose expression is repressed. The categories with a higher number of differentially expressed genes were integrated into the T3SS *pili*/chaperones, known/hypothetical T3E and hypothetical proteins categories, which coincides with what was previously described for other HrpL regulons identified in other strains of the *P. syringae* complex (Mucyn *et al.*, 2014). The largest number of genes that undergo a reduction in their expression in the $\Delta hrpL$ mutant with respect to the wild strain are genes encoding T3SS structural proteins, indicating that the absence of the HrpL regulator mostly causes an alteration of this system. The only structural gene in the T3SS cluster which was found overexpressed in the $\Delta hrpL$ mutant was the *hrpK* gene, which contrasts with the results published in other *P. syringae* complex strains in which it is

repressed in $\Delta hrpL$ mutants (Mucyn *et al.*, 2014). This gene in Psv NCPPB 3335 forms an operon with *shcA* (PSA3335_RS10690) and *hopA2* (*hopPsyB*) (PSA3335_RS10695), both of which are also overexpressed in the $\Delta hrpL$ mutant. Other genes associated with T3SS identified by RNAseq and/or bioinformatics prediction in Psv NCPPB 3335 are *hopAK1*, *hrpW1*, *hrpH*, *shcV*, *shcF* and *shcM*, all of them identified in the HrpL regulon of at least one of the six *P. syringae* strains analyzed so far by RNAseq (Mucyn *et al.*, 2014).

In this study, from the 31 T3Es of the T3E repertoire of Psv NCPPB 3335 a total of 16 encoding genes, 12 of them identified in the RNA-seq analysis and Nine bioinformatically identified, have been identified as part of the HrpL regulon. Among these 16 genes, *hopA2*, whose expression is overexpressed in the $\Delta hrpL$ mutant, has not been included, indicating that HrpL represses its expression. For these 16 genes, except for *avrRpm2*, their dependence on HrpL had previously been experimentally demonstrated in *P. syringae* complex strains and/or Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). The *avrRpm2* gene forms an operon with the *shcF* chaperone gene (PSA3335_RS25240), which is the first gene of the operon and its expression was also found repressed in the $\Delta hrpL$ mutant strain.

In addition to the T3Es described, in the RNAseq analysis the PSA3335_RS02560 pseudogen was identified as repressed in the $\Delta hrpL$ mutant, encoding a protein similar to Xanthomonas T3E XopAD (Moreira *et al.*, 2010) and a gene encoding for a hypothetical protein (PSA3335_RS07405), in whose coding proteins, the N-terminal sequence of translocation through the T3SS has also been detected, suggesting that they could be new T3Es of Psv NCPPB 3335. In addition, by bioinformatics prediction of the hrp box, the encoding gene of another hypothetical protein (PSA3335_RS11510), previously identified in the genomic analysis of Chapter I, in which the N-terminal translocation sequence has also been detected through T3SS, suggesting that another new T3E of Psv NCPPB 3335 could be treated. In order to demonstrate whether these are three new T3Es, it would be necessary to study their translocation and interference

with the plant defense responses, as well as, their distribution within the *P. syringae* complex. Therefore, taking into account the previous publications of Psv NCPPB 3335 and the results obtained in this Chapter, we could say that the HrpL regulon of Psv NCPPB 3335 today is composed of at least 21 of the 31 T3Es encoding genes previously described in this strain, as well as three new possible T3Es. For those T3Es not detected in this study or in previous studies, we cannot affirm that they are not regulated by HrpL, as it is known that the translocation of T3Es through the T3SS is not the same for all T3Es and there is a spatiotemporal regulation of their expression and translocation (Büttner, 2016; Henry *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017; Castiblanco *et al.*, 2018; McAtee *et al.*, 2018; Bian *et al.*, 2019).

In the other functional categories, the first operon gene involved in the synthesis of the toxin phevamine A (*hsvA*) has also been identified under the regulation of HrpL, as well as the coding of a TonB-dependent siderophore receptor, a hypothetical protein that presents homology with an *N*-acylhomoserine lactone synthase, and an FMN transferase. Phevamine A has not been identified so far in *P. savastanoi*, but it has been reported as contributing to the virulence of *P. syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis*, suppressing the flagellin-induced immune response, and which has a role in the virulence of *Erwinia amylovora* in apple tree shoots (Oh and Collmer, 2005; O'Neill *et al.*, 2018). The phevamine A operon is composed of three genes, *hsvA*, *hsvB* and *hsvC*, which also appear to form an operon in the Psv NCPPB 3335 genome, although only HrpL dependence on *hsvA* has been demonstrated in this RNAseq. It would be interesting to study the distribution of the phevamine A operon synthesis in this *P. savastanoi* and the role it could play in the virulence of its strains.

In addition, by bioinformatics prediction of HrpL-dependent genes, based on the presence of a *hrp* box in the promoter region of the genes regulated by this transcription factor, 26 more genes have been identified in the genome of the Psv NCPPB 3335 strain whose regulation was not identified by RNAseq. Among these genes, it is worth highlighting the two *iaaL* alleles described in Psv NCPPB

3335 whose dependence on HrpL has been previously described in other *P. syringae* strains (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014; Castillo-Lizardo *et al.*, 2015).

In summary, in Psv NCPPB 3335 the transcription factor HrpL induces the expression of at least 53 genes, of which 49 have been identified by RNAseq in this work and eight by RT-qPCR in previously published studies (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b), and represses the expression of four genes. Within the HrpL regulon of this strain structural and regulatory genes of T3SS, T3E genes and genes not related to T3SS are found, which coincides with what was previously published for other strains of *P. syringae* (Mucyn *et al.*, 2014). There are still to be studied those genes whose HrpL-dependent regulation has been previously published in other strains but which has not been detected in our study, and the 26 genes exclusively identified bioinformatically. This work shows the integration of next-generation transcriptomic data with genomic data, with the aim of identifying new genes of Psv NCPPB 3335 that may play a possible role in the virulence of this pathogen.

In Chapter III, a further study of some of the T3Es has been conducted with a possible role in the host range of the pathovars of *P. savastanoi* isolated from woody hosts identified in Chapter I of this Doctoral Thesis. This Chapter has been divided into two sections, the first includes the phylogenetic analyses of *P. savastanoi* T3Es associated with woody hosts, as well as the functional characterization and virulence assays related to two of these T3Es, HopBL1 and HopBL2, and the second section includes the bioinformatics analyses and virulence and host range assays related to AvrPto1, AvrRps4, HopF1 and HopZ5.

In the first section, considering that translocation, HrpL-dependence and interference with the defense systems of HopBL1 and HopBL2 plant has been previously described in Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014), in this work we have also studied its role in the virulence of Psv and Psn in olive and oleander plants. In addition, and taking into account that these two effectors and HopAO1 are part of the core of T3Es of *P. savastanoi* (Chapter I, Moreno-Pérez *et al.*, 2020) and have been associated with woody hosts (Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016),

analysed in this Chapter the distribution of these three T3Es in *P. syringae* complex and HopAO2, another T3E of the HopAO family identified in *P. savastanoi*. It has been found that there is a diversification of HopAO1 sequence dependent on the herbaceous/woody nature of the isolation host, and that the HopBL family is only encoded in isolated strains from woody hosts, which suggests a relevant role of these three T3Es in interaction with woody hosts. In the case of HopAO2, this partnership is not so obvious.

HopBL effectors present a C-terminal SUMO peptidase domain (Kim *et al.*, 2011; Matas *et al.*, 2014) that could be involved in the initial inhibition of the pathogen recognition. PsvA, a HopBL1 homologous present in *P. syringae* pv. *eriobotryae* NAE 6, is essential for the pathogenicity of this strain in loquat tree, while XopD, a homologous present in *Xhantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), does not seem to be essential for the virulence of this strain in tomato and pepper (Kamiuntten, 1999; Noël *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Individual loss of function mutants of *hopBL1* and *hopBL2* genes were made in the Psv NCPPB 3335, Psn ESC23 and Psn CFBP5067 strains by integration of a plasmid that breaks the open reading frame of these genes. It was observed that the role of these T3Es in the virulence of *P. savastanoi* was strain and host dependent, highlighting the role of HopBL1 in the virulence and survival of Psn ESC23 in olive and oleander, and HopBL2 in the virulence of Psn ESC23 and Psn CFBP 5067 strains in olive. In addition, the subcellular localization of HopBL2 has been studied and it has been shown that it locates in the nucleus where it could act of repressor/activator of host gene transcription like XopD (Hotson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013; Kim and Mudgett, 2019). This hypothesis is reinforced by the fact that HopBL2 contains a DNA-binding domain at its N-terminus. Furthermore, it has been observed that it could be using the microtubules and plasmodesmata of the plant cell to move intra and intercellularly within the plant, as has been demonstrated for other effectors or viral proteins (Hardham, 2013; Cheval and Faulkner, 2018).

Furthermore, taking into account that HopBL1 and HopBL2 open reading frames are specifically truncated in the Psm Ph3 strain, these two effectors were also selected to analyze their role in the host range of this strain. It has been shown that the independent expression of the full Psv versions of these T3Es in Psm Ph3 does not affect the virulence of this strain in dipladenia. The effect of these T3Es may be important on the natural infection process and when performing an artificial inoculation, we are masking it. So, setting up an infection test similar to one that occurs naturally could be interesting to study the role of these T3Es in the natural process of infection of Psm.

In the second section, a more in-depth study of the possible role in the host range of AvrPto1 has been conducted, truncated exclusively in all the analyzed strains infecting oleander (the 4 strains of Psn and Psm Ph3), as well as AvrRps4, HopF1 and HopZ5, three exclusive T3Es of Psr strains, the only ones capable of infecting broom. The heterologous expression of the full version of AvrPto1 of Psv in Psn strains, containing a truncated version, has been shown to cause a decrease in virulence in oleander. This result corroborates our hypothesis that the C-terminus of AvrPto1 could be recognized by the defense system in oleander, as it happens in tobacco plants (Shan *et al.*, 2000).

Regarding the exclusive Psr effectors (AvrRps4, HopF1 and HopZ5), it has been shown that the heterologous expression of these three T3Es in strains of the rest of *P. savastanoi* pathovars is not enough to confer the ability to infect broom. These strains possess HopAF1-2 and HopG1, which are absent or truncated in Psr strains, and which may be being recognized by the defense systems of the broom and preventing the development of the disease (Jones and Dangl, 2006). On the other hand, the expression of these three T3Es is sufficient to inhibit the induction of symptoms in oleander and ash, produce a different symptomatology in dipladenia and reduce the survival of all strains that carry it in oleander, ash, dipladenia and olive. The recognition of these T3Es by the defense systems of these hosts explains why the host range of Psr strains is so narrow, reducing it almost exclusively to broom.

In the work carried out during this Doctoral Thesis it has been shown that T3SS is essential for the pathogenesis of all pathovars of *P. savastanoi* isolated from woody hosts and the repertoire of T3Es presented by these strains has diversified in the process of adaptation to the hosts being determining elements in the definition of its host range.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción General

Parte de los contenidos de esta Introducción se han incluido en la siguiente publicación:

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. *Frontiers in Plant Science* 8, 1089. doi: 10.3389/fpls.2017.01089 (Anexo I).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. El complejo *Pseudomonas syringae*

Las bacterias Gram (-) pertenecientes al complejo *Pseudomonas syringae* constituyen un grupo de patógenos considerados, por la revista *Molecular Plant Pathology*, como el grupo de patógenos de plantas más relevante desde el punto de vista económico y científico. Esto es debido a su virulencia, ubicuidad y habilidad de causar enfermedad en un amplio rango de los cultivos comerciales más importantes (Mansfield *et al.*, 2012). Las cepas del complejo *P. syringae* presentan una gran variabilidad en cuanto a su supervivencia epífita y a su rango de huésped, infectando tanto plantas herbáceas como leñosas. Los síntomas que producen son muy diversos, pudiendo inducir podredumbre de frutos, moteados y necrosis en hojas y chancros en tallos, entre otros (Hirano and Upper, 2000; Agrios, 2005).

El complejo *P. syringae* se definió tras realizar un análisis filogenético de los genes *gyrB* y *rpoD* a una colección de 125 cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Yamamoto *et al.*, 2000). La taxonomía del complejo ha cambiado drásticamente a lo largo de los años y hoy día sigue siendo un tema altamente discutido. Actualmente, el complejo está constituido por 15 especies de *Pseudomonas* asociadas con plantas y el ciclo del agua (Gomila *et al.*, 2017). Estas especies inicialmente se clasificaron en 9 genomoespecies, obtenidas mediante hibridaciones DNA-DNA (Gardan *et al.*, 1999), y posteriormente en 13 filogrupos (FG), obtenidos mediante la tipificación multilocus de secuencias. La clasificación en FG concuerda con las genomoespecies, aunque presentan pequeñas diferencias (Berge *et al.*, 2014). Recientes análisis filogenéticos y de recombinación revelaron que este complejo se subdivide en FG primarios y secundarios. Los FG primarios están constituidos por cepas aisladas de cultivos agrícolas y entre ellos se incluyen los FG monofiléticos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10. Por el contrario, los FG secundarios están compuestos por cepas aisladas del medio ambiente y entre ellos se incluyen los FG 7, 8, 9, 11, 12 y 13, cuya ramificación es anterior (Dillon *et al.*, 2019b). El complejo también se divide en un nivel inferior a la especie, en aproximadamente 65 patovares según su rango de huésped y

origen de aislamiento (Bull and Koike, 2015).

2. *Pseudomonas savastanoi*

La especie *P. savastanoi* pertenece al FG3, el único FG del complejo *P. syringae* que incluye bacterias que causan sobrecrecimientos del tejido vegetal (tumores) en huéspedes leñosos, y que son *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) y *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (Psr), *P. meliae*, *P. tremae* y los patovares *cerasicola*, *daphniphylli*, *dendropanacis*, *myricae* y *rhaphtolepidis* de *P. syringae* (Lamichhane *et al.*, 2014; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). La especie *P. savastanoi* está constituida por cuatro patovares bien definidos aislados de huéspedes leñosos, que son, Psv (aislados de olivo), Psn (aislados de adelfa), Psr (aislados de retama) y *P. savastanoi* pv. *fraxini* (Psf, aislados de fresno) (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). Además, recientemente se ha identificado a *P. savastanoi* como el agente causal del moteado en hojas y tallo de la dipladenia (*Mandevilla* spp.), cuyo rango de huésped es diferente al de los patovares ya establecidos dentro de esta especie (Eltlbany *et al.*, 2012), y es por ello que se ha propuesto su inclusión dentro de un nuevo patovar de *P. savastanoi*, el pv. *mandevillae* (Psm) (Caballo-Ponce, 2017). Los síntomas generados por *P. savastanoi* incluyen la formación de tumores o excrecencias en troncos, ramas, brotes y, con menor frecuencia e intensidad, en las hojas, raíces y frutos de las plantas infectadas (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a) (Figura 1).

El rango de huésped de los cuatro patovares bien definidos de *P. savastanoi* ha sido claramente diferenciado mediante pruebas de patogenicidad cruzada (Janse, 1982; 1991; Álvarez *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2012; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a) (Tabla 1). La mayoría de aislados infectan más de un huésped, como es el caso de las cepas de Psn que inducen la formación de tumores en olivo, adelfa y fresno, mientras que las cepas de Psv solo en olivo y fresno. Por otro lado, las cepas de Psf, no tumorigénicas, producen unas protuberancias denominadas excrecencias en olivo y fresno. En contraste, el rango de huésped de las cepas de Psr parece estar restringido a la retama (Tabla 1). Con respecto a los aislados de dipladenia,



Tuberculosis del olivo
P. savastanoi pv. *savastanoi* (Psv)



Tuberculosis de la adelfa
P. savastanoi pv. *nerii* (Psn)



Chancro del fresno
P. savastanoi pv. *fraxini* (Psf)



Tuberculosis de la retama
P. savastanoi pv. *retacarpa* (Psr)



Necrosis bacteriana de la dipladenia
P. savastanoi pv. *mandevillae* (Psm)

Figura 1. Síntomas característicos producidos por las cepas de los patovares de *P. savastanoi* en olivo, adelfa, fresno, retama y dipladenia. Las imágenes de los síntomas se han obtenido de <https://www.flickr.com/> (Psv y Psr), de Eltlbany *et al.* (2012) (Psm), de <https://subbuteo-hadlow.blogspot.com/2013/05/dene-on-16th.html> (Psf). La imagen de los síntomas de Psn se realizó en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Eltlbany *et al.* (2012) mostraron que inducen síntomas en dipladenia y adelfa, pero no en olivo ni alheña. Sin embargo, en ensayos de patogenicidad realizados en nuestro grupo de investigación se observó que, además de en dipladenia, estos aislados también inducen síntomas en olivo y fresno, pero no en retama ni adelfa (Caballo-Ponce, 2017). Estas diferencias pueden deberse a la utilización de cultivares distintos de olivo y fresno en estos estudios, puesto que, como se ha demostrado previamente, algunos aislados de Psn y Psv no producen síntomas en inoculaciones artificiales realizadas en ciertos cultivares de adelfa y olivo, respectivamente (Janse, 1981; Penyalver *et al.*, 2006). Además, en el estudio de patogenicidad realizado en nuestro grupo de investigación, se observó que de los cuatro patovares bien definidos de *P. savastanoi*, solo algunas cepas de Psn eran capaces de inducir síntomas en dipladenia (Caballo-Ponce, 2017). Por lo tanto, las diferencias observadas en el rango de huésped de los aislados de dipladenia en relación con los otros cuatro patovares han permitido la inclusión de los aislados de dipladenia en un nuevo patovar, al que se ha denominado pv. *mandevillae* (Caballo-Ponce, 2017).

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

Patovar	Huésped ^a			
	Olivo	Adelfa	Fresno	Retama
savastanoi	T	-	T/E	-
nerii	T/E	T	T/E	-
fraxini	Ex/-	-	Ex	-
retacarpa	-	-	-/E	T
dipladenia	T/-	T/-	T/E	-

^aOlivo, *Olea europea*; Adelfa, *Nerium oleander*; Fresno, *Fraxinus* spp.; Retama, *Retama sphaerocarpa*; T, tumor; E, engrosamiento; Ex, excrecencia; -, no se producen síntomas visibles. Adaptada de Ramos *et al.* (2012), Caballo-Ponce (2017) y Eltlbany *et al.* (2012).

2.1 Ciclo de vida de *P. savastanoi*

El ciclo de vida de *P. savastanoi* se ha estudiado en mayor profundidad en las cepas de Psv, las cuales tienen un ciclo de vida epífita/patógeno. Psv vive de forma epífita sobre la superficie de las hojas y tallos, alcanzando las mayores densidades poblacionales durante los meses más cálidos y lluviosos del año (Quesada *et al.*, 2007). Se ha observado que la población epífita de Psv se disemina a corta distancia y que existe una relación directa entre el número de bacterias epífitas y el número de tumores desarrollados en los árboles infectados (Quesada *et al.*, 2009). Psv cambia su ciclo de vida a endófito o patógeno cuando consigue penetrar en el tejido vegetal a través de lesiones producidas en la planta por cambios climáticos o por las prácticas agrícolas. En esta etapa *P. savastanoi* induce la hipertrofia e hiperplasia del tejido vegetal, lo que conduce generalmente a la formación de un tumor, excepto en el caso de las infecciones producidas por las cepas de Psf en fresno, en las que se produce la formación de pequeñas protuberancias llamadas excrecencias (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). En la etapa de patógeno, Psv se multiplica en los tejidos vegetales alcanzando diferentes densidades poblacionales en función de la susceptibilidad del cultivar (Varvaro and Surico, 1978; Penyalver *et al.*, 2006).

2.3 Factores de virulencia de *P. savastanoi* diferentes del sistema de secreción tipo III

Los factores moleculares implicados en la interacción de *P. savastanoi* con sus huéspedes no se habían estudiado tan exhaustivamente como en otros patovares de *P. syringae*, a pesar de que hace más de un siglo que es conocido que la

enfermedad de la tuberculosis del olivo es de origen bacteriano (Savastano, 1886). Pero recientemente, con la emergente idea de que hay factores específicos de patogenicidad y virulencia que son necesarios para la colonización de huéspedes leñosos, se está poniendo una especial atención al estudio de las bases moleculares de las enfermedades bacterianas asociadas a huéspedes leñosos. Además del sistema de secreción tipo III (T3SS), en cuyo análisis se centra esta Tesis Doctoral y que se describe en detalle más adelante, en *P. savastanoi* se ha descrito un amplio número de factores implicados en la virulencia y formación de tumores. En la Figura 2 se muestran todos los factores de virulencia identificados y estudiados hasta la fecha en las cepas de *P. savastanoi*.

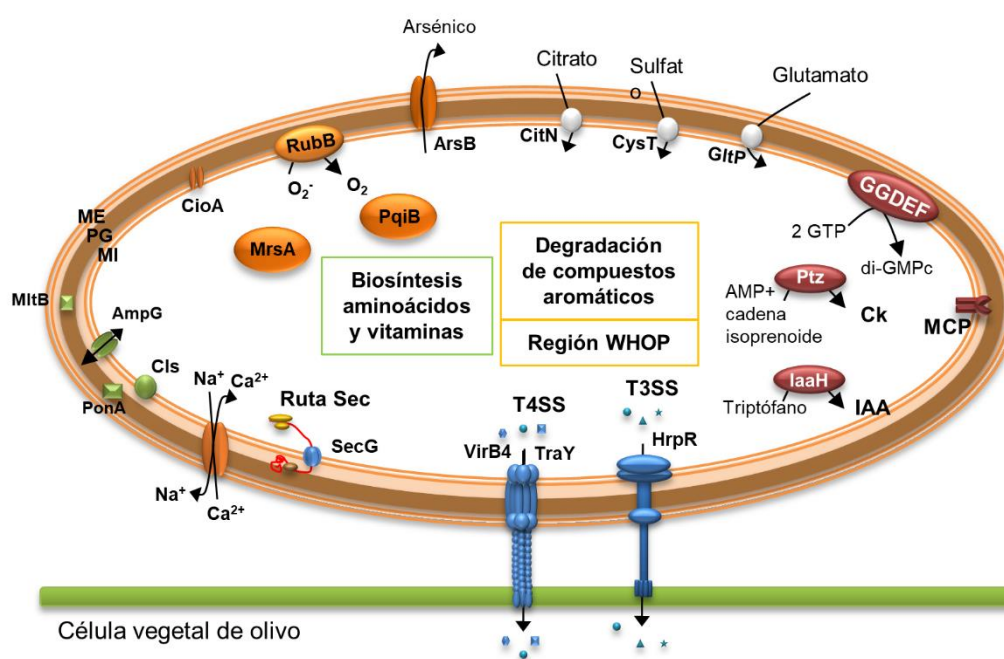


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de virulencia en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Las categorías funcionales están representadas en diferentes colores: azul, sistemas de secreción; verde, estructuras de la superficie celular; naranja, tolerancia a estrés; gris, transportadores; y rojo, otros. ME, membrana externa; PG, peptidoglicano; MI, membrana interna; T3SS, sistema de secreción tipo III; T4SS, sistema de secreción tipo IV; MCP, quimiorreceptores; GGDEF, proteínas con dominio GGDEF/EAL; IAA, ácido indol-3-acético. Adaptada de Matas *et al.* (2012) y actualizada con otros estudios (Surico *et al.*, 1985a; Surico *et al.*, 1985b; Iacobellis *et al.*, 1994; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Aragón *et al.*, 2015a; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a; Caballo-Ponce *et al.*, 2017b; Moretti *et al.*, 2019).

2.3.1 Fitohormonas: auxinas y citoquininas

La producción y secreción de las fitohormonas ácido indol-3-acético (IAA) y

Citoquininas (Ck), por parte de la bacteria, inducen la división del tejido infectado, así como la diferenciación de células del parénquima hacia elementos traqueales del xilema y tubos cribosos del floema (Smidt and Kosuge, 1978; Comai and Kosuge, 1980; 1982; Surico *et al.*, 1985a; Morris, 1986; Iacobellis *et al.*, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009; Bardaji *et al.*, 2011b). La producción de IAA es esencial para la patogénesis, pues mutantes deficientes en la biosíntesis de IAA de cepas de Psv y Psn pierden la capacidad de inducir la formación de tumores en sus respectivos huéspedes, mientras que, cepas de Psn que sobreproducen IAA inducen la formación de tumores más grandes que los producidos por la cepa silvestre (Smidt and Kosuge, 1978; Surico *et al.*, 1985b; Aragón *et al.*, 2014). Las Cks, por el contrario, parecen no ser esenciales en la formación de tumores, aunque contribuyen a la virulencia siendo necesarias para la expresión completa de los síntomas de la enfermedad (Bardaji *et al.*, 2011b; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). Además, se ha descrito que en la cepa Psv NCPPB 3335, el IAA actúa como una molécula señalizadora, dado que su adición exógena a un cultivo de esta cepa produce un aumento de la expresión del sistema de secreción tipo VI (T6SS) y una disminución de la expresión de genes del T3SS (Aragón *et al.*, 2014).

2.3.2 di-GMP cíclico

La síntesis del segundo mensajero di-GMP cíclico esta mediada por la acción de diguanilato ciclasas (DGCs), mientras que su degradación se produce por fosfodiesterasas (PDEs). En la cepa Psv NCPPB 3335 se ha observado que el c-di-GMP cíclico tiene un papel en la virulencia de esta cepa en olivo, en la movilidad tipo *swimming*, en la formación de biopelículas y probablemente en la producción de exopolisacáridos (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Aragón *et al.*, 2015a; Aragón *et al.*, 2015b).

2.3.3 Quorum sensing

El sistema de regulación *quorum sensing* (QS) está constituido por una proteína de la familia LuxI, que produce la síntesis de una molécula señal, y una proteína de la familia LuxR que reconoce esa molécula señal y modifica la transcripción

de genes específicos. Se ha visto que el papel en la virulencia de Psv de este sistema es dependiente de cepa, siendo esencial para la formación de tumores en la cepa Psv DAPP-PG722, mientras que no lo es en la cepa Psv NCPPB 3335 (Hosni *et al.*, 2011; Caballo-Ponce *et al.*, 2018). Aunque en las inoculaciones individuales de Psv NCPPB 3335 este sistema no tiene un papel en la virulencia, se ha demostrado que es necesario para la comunicación, mediada por homoserinas lactonas (AHL), que se produce entre Psv y *Erwinia toletana*, bacteria comensal endófito presente en olivo. El resultado de esta interacción produce un aumento de la severidad de la enfermedad en el olivo (Passos da Silva *et al.*, 2014; Caballo-Ponce *et al.*, 2018).

2.3.4 Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

En la cepa Psv DAPP-PG722 se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} está mediada por un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y que se produce en condiciones de baja energía similares a las encontradas en el apoplasto vegetal. El calcio funciona como una “señal del huésped” que permite y promueve la patogenicidad de Psv en olivo, pues mutantes de este intercambiador pierden la capacidad de producir tumores en olivo y de inducir una respuesta de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco (Moretti *et al.*, 2019).

2.3.5 Región WHOP (*Woody host and Pseudomonas spp.*)

Es una región de 15 kb que solo se ha encontrado en cepas de *P. syringae* aisladas de huéspedes leñosos y codifica varios operones y genes transcritos individualmente relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos. En la cepa Psv NCPPB 3335 se ha observado una reducción de la virulencia en mutantes de los operones *antABC* (implicado en el catabolismo de antranilato), *catBCA* (implicado en el catabolismo de catecol) o *ipoABC* (que presenta actividad oxigenasa sobre compuestos aromáticos) en plantas de olivo (Caballo-Ponce *et al.*, 2017b).

2.3.6 Otros

En un estudio STM (*signatura-tagged mutagenesis*) realizado en la cepa Psv

NCPPB 3335 se identificaron un gran número de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos y de vitaminas, así como genes que codifican supuestos quimiorreceptores (*Methyl-accepting chemotaxis proteins*), transportadores de citrato, sulfato y aminoácidos, todos ellos implicados en la virulencia de Psv en olivo. Además, también se identificaron genes implicados en estrés oxidativo, y en los sistemas de secreción tipo II (T2SS) y tipo IV (T4SS) como esenciales para la formación de tumores (Matas *et al.*, 2012).

3. El sistema de secreción tipo III

El T3SS, que está presente en la mayoría de las bacterias Gram (-) patógenas de plantas y animales, es uno de los factores de patogenicidad más versátiles que se han descubierto. Consiste en un complejo macromolecular proteico que permite a los patógenos inyectar directamente proteínas especializadas, denominadas efectores del T3SS (T3E), desde la célula bacteriana al citoplasma de la célula huésped (Figura 3A). Estas proteínas, en muchos casos, son las principales armas utilizadas por los patógenos para defenderse de las respuestas de defensa del huésped. El T3SS está ampliamente distribuido tanto entre los patógenos de plantas más comunes, como son, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum* y las especies de *Xanthomonas* y *Erwinia*, como entre patógenos de animales muy estudiados, como son, *Yersinia* spp., *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae* (McCann and Guttman, 2008). Además, se ha descrito que el T3SS no solo se encuentra en bacterias patógenas, sino que es esencial en la interacción simbiótica entre *Rhizobium* y las leguminosas, siendo necesario para la formación adecuada del nódulo (Fauvart and Michiels, 2008; López-Baena *et al.*, 2008; Büttner, 2012).

En las bacterias fitopatógenas, el T3SS es requerido tanto para el desarrollo de la enfermedad en huéspedes sensibles, como para la inducción de la muerte celular programada, denominada HR, en huéspedes resistentes (Galan and Collmer, 1999; Büttner and He, 2009). En el complejo *P. syringae* se han descrito cuatro tipos de T3SS en base a la organización de los genes que lo codifican, entre

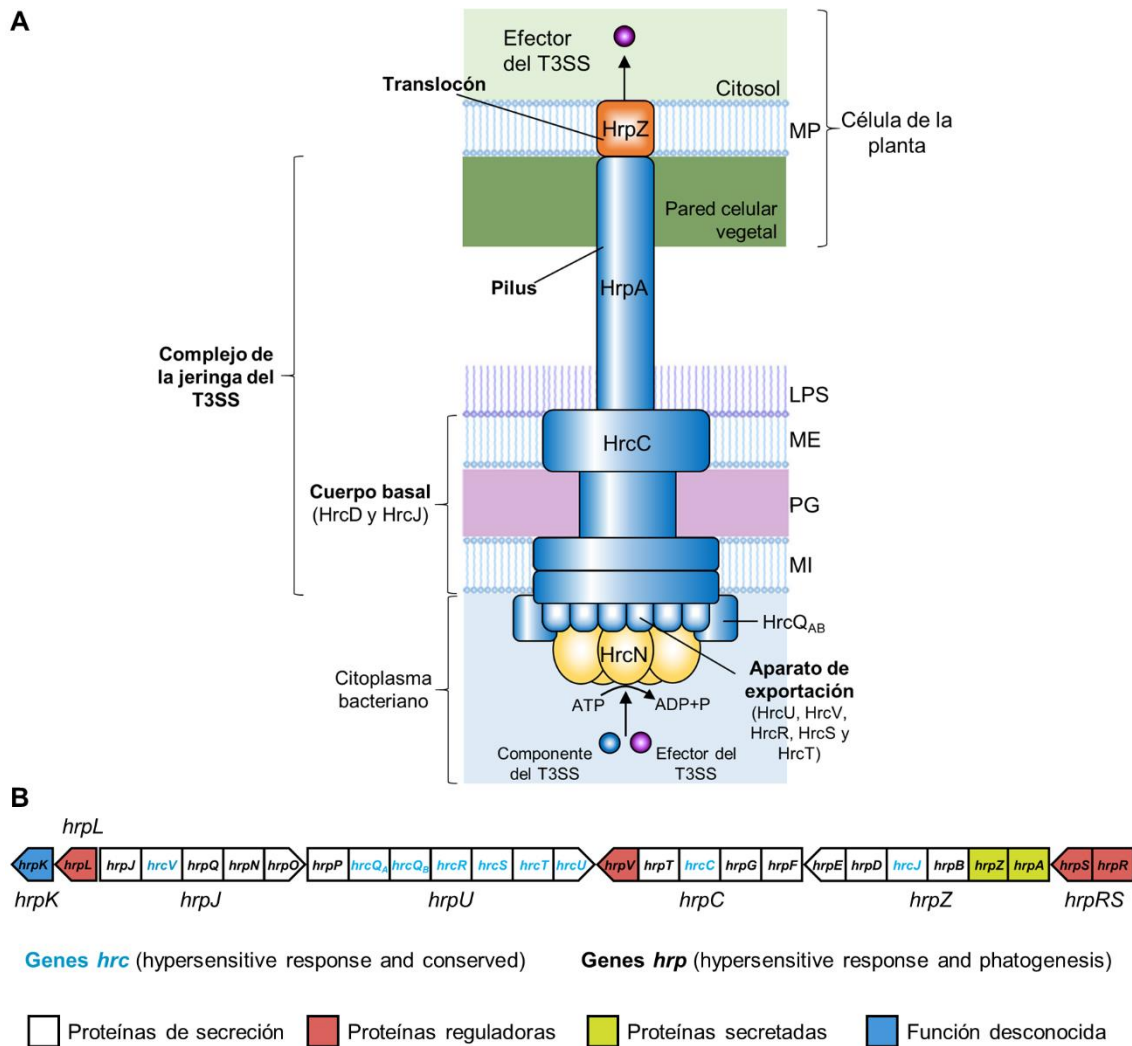


Figura 3. Esquema representativo de la estructura del sistema de secreción tipo III en *P. syringae*. (A) Modelo del complejo multiproteico que constituye el T3SS. MP, membrana plasmática; LPS, lipopolisacárido; ME y MI, membrana externa e interna, respectivamente; PG, peptidoglicano. Adaptado de Büttner (2012). (B) Distribución de los genes *hrp/hrc* en *P. syringae*. Modelo del clúster *hrp* de la cepa *P. syringae* pv. *syringae* 61, cuya organización es idéntica al de las cepas *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *syringae* B728A. Encima del clúster se indica el nombre de los genes que se expresan de forma independiente y debajo el nombre de los operones. Adaptada de Alfano *et al.* (2000).

los que se incluyen, el T3SS denominado canónico, que constituye una isla de patogenicidad tripartita (T-PAI), el T3SS atípico, que constituye una isla de patogenicidad atípica (A-PAI), el T3SS único, que constituye una única isla de patogenicidad (S-PAI) y el T3SS rhizobial, que constituye una isla de patogenicidad similar a la presente en *Rhizobium* (R-PAI) (Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b). En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio del T3SS canónico (Figura 3), ampliamente distribuido en el complejo *P. syringae*, destacándose su codificación en cepas de los FG primarios y su ausencia en la

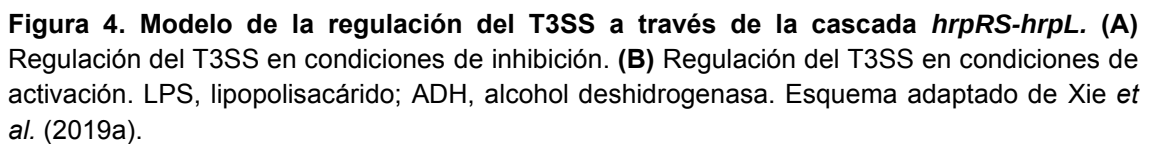
mayoría de las cepas de los FG secundarios (Dillon *et al.*, 2019b).

En el complejo *P. syringae*, los genes que codifican el T3SS canónico se organizan en un clúster, denominado clúster *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), incluido dentro de una isla de patogenicidad generalmente localizada en el cromosoma bacteriano (Figura 3B). Este clúster está compuesto por 27 genes estructurales y reguladores organizados en cinco operones (*hrpRS*, *hrpZ*, *hrpC*, *hrpU* y *hrpJ*) y dos genes independientes (*hrpK* y *hrpL*) (Jackson *et al.*, 1999; Alfano *et al.*, 2000; Collmer *et al.*, 2000) (Figura 3B). En el clúster *hrp*, hay un conjunto de genes conservados en patógenos de plantas y animales a los que se denomina genes *hrc* (*hypersensitive response and conserved*) (Bogdanove *et al.*, 1996) (Figura 3B).

3.1 La regulación del T3SS en *P. syringae*

El T3SS está regulado tanto por factores endógenos como por factores ambientales (Ortíz-Martín *et al.*, 2010; Ortiz-Martín *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2019a). Se ha descrito que la expresión del T3SS se activa en condiciones de baja concentración de nutrientes, pH ácido y baja presión osmótica (como en medio de inducción Hrp (Huynh *et al.*, 1989) o *in planta*), y se reprime, en condiciones de pH alto, de alta osmolaridad o en medio rico en nutrientes (como es el medio *King's Broth*, KB) (Xie *et al.*, 2019a).

Con respecto a la regulación endógena, en una revisión reciente se indica que existe una red altamente compleja implicada en la regulación del T3SS de *P. syringae*, en la que se incluyen al menos 20 factores (Xie *et al.*, 2019a) (Figura 4). Entre estos factores, el principal regulador del T3SS y la mayoría de sus T3E es el factor sigma alternativo HrpL, codificado dentro del clúster *hrp* (Figura 3B). HrpL se une a una secuencia conservada presente en la región promotora de los genes que regula, denominada caja *hrp* (GGAACC-N15/16-CCACNNA), activándose su transcripción (Xiao and Hutcheson, 1994). La inducción por HrpL requiere a su vez de otro factor sigma alternativo, RpoN (σ^{54}), y de dos activadores transcripcionales, HrpR y HrpS. Estos dos últimos, se expresan en forma de operón (Figura 3B) y las proteínas que codifican forman un heterodímero que se



57

expresión, puede ayudar a minimizar la activación de los sistemas inmunes de las plantas y permitir que el patógeno evite el reconocimiento del huésped (Waite *et al.*, 2017). Existen otras proteínas intracelulares implicadas en la modulación de la transcripción de *hrpL*, como son, AefR (regulador bifuncional del T3SS y del sistema QS), el sistema de dos componentes (SDC) CorRS (implicado en la producción de coronatina) y la proteína PsrA, que producen la inducción de *hrpL*, mientras que, la lipoproteína HrpT inhibe su expresión (Xie *et al.*, 2019a) (Figura 4).

Además de la regulación de la transcripción de *hrpL*, se da una regulación del heterodímero HrpRS a dos niveles, por un lado, RhpRS, CvsRS, GacAS, AlgU y HrpA modulan la inducción del operón *hrpRS*, y por el otro, las proteínas HrpG, HrpV, HrpJ y HrpF modulan la formación del heterodímero. Entre estos, cabe destacar el SDC RhpRS que, tras detectar cambios en las señales ambientales, desempeña un papel clave tanto en la regulación directa del T3SS a través de HrpRS, como en la regulación de otras rutas relacionadas con la virulencia (Xie *et al.*, 2019a; Xie *et al.*, 2019b) (Figura 4).

Otros reguladores del T3SS son la proteasa Lon, que inhibe la expresión del T3SS mediante la degradación de HrpR, el operón *rhpPC*, en el que el efecto inhibitorio de RhpC sobre RhpP contribuye a la activación del T3SS, los segundos mensajeros (p)ppGpp y el di-GMP cíclico, que activan y reprimen el T3SS, respectivamente, entre otros (Ortiz-Martín *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019a) (Figura 4).

3.2 El T3SS y las respuestas de defensa de las plantas

La coevolución de la interacción entre patógenos y plantas huéspedes ha resultado en la evolución de sistemas complejos de ataque y defensa (Jones and Dangl, 2006) (Figura 5). La primera línea de defensa de las plantas se induce por el reconocimiento de “patrones moleculares conservados” en las bacterias potencialmente patógenas, como son, la flagelina, el factor Tu de elongación o el peptidoglicano. Este conjunto de moléculas se denomina PAMP o MAMP (*Pathogen- or Microbial-associated Molecular Patterns*), que son reconocidos por

receptores de membrana, denominados PRR (*Pattern Recognition Receptors*), localizados en la superficie de las células vegetales (Macho and Zipfel, 2014; Zipfel, 2014). Tras minutos del reconocimiento de los PAMP por los PRR, se inicia una cascada de señalización ramificada que promueve las respuestas de defensa locales y sistémicas de la planta, entre las que se incluyen rápidos cambios en el flujo de iones de la membrana plasmática, acompañados por el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) extracelulares. A su vez, se activan las cascadas de señalización de las proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} y de las proteínas quinasas activadas por mitógeno, que transportan la señal al núcleo y producen una reprogramación transcripcional que resulta en la producción de compuestos antimicrobianos o enzimas, refuerzo de barreras extracelulares (como la deposición de calosa en la pared celular) y síntesis de hormonas que pueden inducir ondas transcripcionales secundarias. Este mecanismo de defensa se denomina PTI (*Pattern-Triggered Immunity*), que tiene como objetivo detener la progresión del patógeno (Jones and Dangl, 2006; Couto and Zipfel, 2016; Xin *et al.*, 2018) (Figura 5). Las cepas de *P. syringae* consiguen evadir esta respuesta de defensa basal de la planta huésped mediante una colección de T3E que inhiben la PTI. Estos T3E pueden interferir en el reconocimiento de los PAMP por los PRR, en la traducción de señales o en el tráfico de vesículas inducido tras el reconocimiento de los PAMP, inhibiendo la PTI y produciendo como resultado una susceptibilidad del huésped denominada ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) (Jones and Dangl, 2006; Feng and Zhou, 2012; Couto and Zipfel, 2016) (Figura 5).

Por otro lado, en los huéspedes se han desarrollado mecanismos para reconocer la presencia o la actividad de los T3E. Este reconocimiento se produce por las proteínas R, proteínas intracelulares que contienen dominios NLR (*nucleotide-binding and leucine-rich repeat*), que desencadena una respuesta de defensa denominada ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones and Dangl, 2006; Khan *et al.*, 2016) (Figura 5). La ETI es una respuesta de defensa más rápida e intensa que la PTI, que tiene como consecuencia la inducción de una HR en la zona de infección. Sin embargo, la ETI puede ser inhibida por la actividad de

[illegible]

La interacción entre los T3E y el sistema inmune del huésped resulta en una carrera armamentística evolutiva, en la que, por un lado, los T3E de los patógenos evolucionan para evitar ser reconocidos al mismo tiempo que intentan mantener su papel en la virulencia, y por el otro, el sistema inmune del huésped evoluciona para poder reconocer la diversidad de T3E y las actividades que producen, manteniendo una clara distinción entre lo que pertenece al patógeno y lo que es el propio del huésped para evitar una respuesta autoinmune (Dillon *et al.*, 2019a).

60

inhibición de la ETI es una estrategia de virulencia esencial para lograr infectar un huésped y que, en el proceso de adaptación, se produce la pérdida y/o modificación de T3E que favorecen la virulencia y evitan la detección del patógeno (Laflamme *et al.*, 2020).

3.3 Efectores del sistema de secreción tipo III

Los T3E han sido reconocidos como los determinantes principales de la especificidad de huésped en *P. syringae*, tanto a nivel de especie-patovar como de raza-cultivar (Fouts *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011). Éstos son importantes en distintas fases de la interacción patógeno-huésped, porque promueven la penetración y permanencia del patógeno en el tejido del huésped, suprimen las respuestas de defensa de la planta y, facilitan el acceso a los nutrientes, la proliferación y el crecimiento del patógeno (Göhre and Robatzek, 2008; Macho, 2016).

Generalmente, los T3E del complejo *P. syringae* se denominan como Hop (*Hrp outer protein*) en base a su habilidad para translocarse a través del T3SS, aunque varios T3E se denominan como “Avr” porque fueron descubiertos en la era pregenómica por el fenotipo de avirulencia que causaban en cultivares resistentes de varios cultivos (Lindeberg *et al.*, 2012). Los T3E se caracterizan por contener una señal N-terminal específica que permite su translocación a través del T3SS (Lindeberg *et al.*, 2005). Esta señal no se conserva a nivel de aminoácidos, pero generalmente está asociada a un patrón o composición determinada de aminoácidos y su estructura terciaria está desordenada. La falta de estructura terciaria en esta señal de translocación podría facilitar la unión de otras proteínas, como son los componentes del T3SS involucrados en el reconocimiento de las proteínas que se secretan. Además, la translocación de muchos de estos T3E depende de la unión de chaperonas citoplasmáticas que los estabilizan y que promueven su translocación (Büttner, 2016). Otra característica común entre la mayoría de T3E es la presencia de una caja *hrp* corriente arriba de su codón de inicio, que permite su regulación por el factor de transcripción HrpL (Lindeberg *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha realizado una actualización del conjunto de criterios definidos para la identificación y denominación de los T3E acordados en Lindeberg *et al.* (2005) y que se venía utilizando desde entonces. Para ello, se ha realizado un estudio de la evolución molecular de los efectores del complejo *P. syringae* utilizando 494 genomas de cepas aisladas de más de 100 huéspedes, entre las que se incluyen representantes de todos los FG. Se han identificaron 70 familias de T3E, y aunque en la mayoría de los casos los T3E se clasificaron en las familias previamente establecidas, hubo excepciones, para las que se propuso la fusión de algunas familias de T3E que compartían una similitud local significativa, o la asignación de ciertos T3E previamente descritos a nuevas familias (Dillon *et al.*, 2019a). Como resultado de los análisis genómicos realizados en este estudio, se ha observado que los repertorios de T3E varían drásticamente entre las diferentes cepas del complejo *P. syringae*, incluso entre cepas aisladas de los mismos huéspedes, así como se ha identificado el importante papel que tienen la transferencia horizontal en la evolución conjunta de los T3E y los sistemas de defensa de los huéspedes (Dillon *et al.*, 2019a).

3.4 El T3SS en *P. savastanoi*

Las cepas de *P. savastanoi* también codifican un T3SS completo y funcional, relacionado filogenéticamente con el de otras cepas del complejo *P. syringae* (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Tegli *et al.*, 2011; Matas *et al.*, 2014; Baltrus *et al.*, 2017; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a; Moreno-Pérez *et al.*, 2020). En estas cepas, el clúster *hrp* tiene un tamaño de 23,8 Kb y está constituido por 27 genes que presentan la misma organización mencionada anteriormente para la cepa *P. syringae* pv. *syringae* 61 (Figura 3B) (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Tegli *et al.*, 2011). Este clúster está muy conservado en *P. savastanoi*, encontrándose solo nueve polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) diferentes entre los clústeres *hrp* de Psv ITM317, Psn ESC23 y Psf NCPPB 1006, de los cuales ocho están localizados en marcos abiertos de lectura (Tegli *et al.*, 2011). Además, las cepas de *P. savastanoi* también presentan un segundo clúster que codifica el T3SS similar al presente en cepas de *Rhizobium* (R-PAI), cuya función aún queda por dilucidar

(Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Martínez-García *et al.*, 2015b; Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b).

Con respecto a la regulación del T3SS en *P. savastanoi*, se realizó un estudio de la expresión de los genes *hrpA*, *hrpS*, *hrpL* y *hrpV* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en las cepas Psv ITM317, Psn ESC23 y Psf NCPPB 1006 cultivadas en medio de inducción Hrp a tres, seis, 18 y 24 h posinducción. Se observó un patrón de expresión específico de estos genes para cada una de las cepas, indicando que la regulación del T3SS podría ser específica de patovar. Además, se sugirió que, si esta regulación ocurriese también *in planta*, podría ser dependiente de las condiciones fisiológicas encontradas en el apoplasto o en el espacio extracelular de los tejidos de la planta huésped. Sin embargo, no se puede descartar que los patrones de expresión observados se deban única y exclusivamente a las distintas capacidades que presenta cada una de estas cepas para percibir y transducir los estímulos ambientales, ya que no existe información sobre los mecanismos de regulación que actúan aguas arriba del T3SS en estos patosistemas, como por ejemplo el SDC GacAS o el mediado por la proteasa Lon (Tegli *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que en la cepa Psn Psn23, los extractos polifenólicos procedentes del olivo, vid, alcachofa o árbol del té verde tienen una alta actividad inhibitoria del T3SS (Biancalani *et al.*, 2016).

En los patovares Psv y Psn se demostró que la formación de tumores en sus respectivos huéspedes depende de la presencia de un T3SS funcional que permita la translocación de efectores durante el proceso de invasión (Sisto *et al.*, 2004; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014; Biancalani *et al.*, 2016; Cerboneschi *et al.*, 2016) (Figura 6, Tabla 2). El primer trabajo donde se apunta al T3SS como factor de patogenicidad en una cepa de *P. savastanoi* se basó en la caracterización de un mutante con una inserción de un mini-Tn5 en el gen *hrcC* de la cepa de Psv ITM 317, la cual perdía su capacidad de inducir la formación de tumores en plantas de olivo adulta y de producir una HR en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Sisto *et al.*, 1999; Sisto *et al.*, 2004) (Tabla 2). Posteriormente, en nuestro grupo de investigación se construyó un mutante por

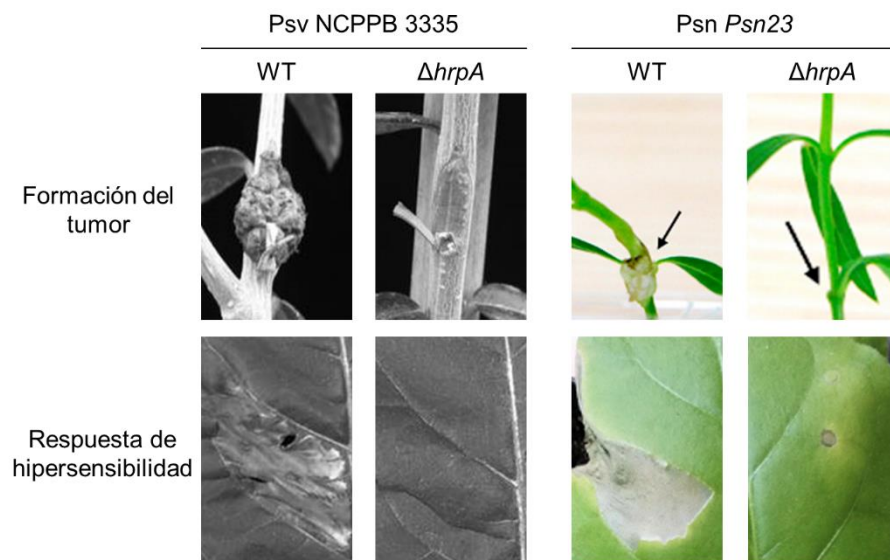


Figura 6. Papel de HrpA en la patogenicidad e inducción de la respuesta hipersensible en Psv NCPPB 3335 y Psn Psn23. A la izquierda, síntomas producidos por Psv NCPPB 3335 y su mutante $\Delta hrpA$ en plantas de olivo lignificadas a 90 días posinoculación (dpi), y HR inducida por estas cepas en hojas de *N. tabacum* var. Newdel 24 horas posinoculación (hpi). A la derecha, síntomas producidos por Psn Psn23 y su mutante $\Delta hrpA$ en plantas de adelfa micropropagadas *in vitro* a 21 dpi, y HR inducida por estas cepas en hojas de *N. tabacum* var. Burley White 48 hpi. WT, cepa silvestre. Adaptada de Pérez-Martínez *et al.* (2010) y Cerboneschi *et al.* (2016).

inserción de un mini-Tn5 en el gen *hrpR* (proteína reguladora), y mutantes de remplazamiento génico con un gen de resistencia a kanamicina de los genes *hrpA* (proteína estructural) y *hrpL* (regulador) en la cepa de referencia Psv NCPPB 3335 (Figura 6, Tabla 2). Todos estos mutantes están afectados en la formación de tumores en plantas de olivo cultivadas *in vitro* y en plantones adultos con tejidos leñosos (Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014). Además del efecto observado en las plantas de olivo, los mutantes *hrpA* y *hrpL* fueron incapaces de inducir una HR en plantas de tabaco (Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2014) (Figura 6, Tabla 2). Por otro lado, la observación, mediante técnicas de microscopia de epifluorescencia, de los tumores producidos en las plantas de olivo cultivadas *in vitro* por los mutantes *hrpA* (cepa T3-GFP) y *hrpR* (cepa FAM-117), marcadas con GFP, reveló que las células mutantes no son capaces de colonizar el tejido tumoral, quedando limitadas al punto de inoculación (Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012). De igual forma, trabajos recientes han demostrado que un mutante *hrpA* de la cepa Psn Psn23 no induce ni HR en hojas de tabaco, ni tumores o engrosamientos en plantas de

adelfa cultivadas *in vitro* o en explantos de adelfas adultas (Biancalani *et al.*, 2016; Cerboneschi *et al.*, 2016) (Figura 6, Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las mutaciones del T3SS y su repertorio de T3E descritas en los patovares de *P. savastanoi*.

Gen	Patovar	Función	Formación del tumor	Otros fenotipos	Referencia
<i>hrcC</i>	savastanoi	Proteína de poro de la ME ^a	Ausencia de tumor	No HR ^b en <i>Nicotiana tabacum</i>	Sisto <i>et al.</i> (2004)
<i>hrpA</i>	savastanoi	Proteína del <i>pili</i>	Ausencia de tumor	No se multiplica en el tejido vegetal No HR ^b en <i>Nicotiana tabacum</i>	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2010)
	nerii	Proteína del pilus	Ausencia de tumor	No HR ^a en <i>Nicotiana tabacum</i> y menor engrosamiento en explantos de adelfa	Cerboneschi <i>et al.</i> (2016) Biancalani <i>et al.</i> (2016)
<i>hrpR</i>	savastanoi	Regulador transcripcional	Ausencia de tumor	No se multiplica en el tejido vegetal	Matas <i>et al.</i> (2012)
<i>hrpL</i>	savastanoi	Regulador transcripcional	Ausencia de tumor	No HR ^b en <i>Nicotiana tabacum</i>	Matas <i>et al.</i> (2014)
<i>hopAO1</i>	savastanoi	Fosfatasa	Reducción de la virulencia e incremento de la necrosis	Reducción de la Competitividad en plantas de olivo.	Castañeda-Ojeda <i>et al.</i> (2017a)

^aME, membrana externa

^bHR, respuesta de hipersensibilidad

3.5 Repertorio de efectores del T3SS en *P. savastanoi*

En *P. savastanoi* se ha realizado la predicción bioinformática del repertorio de T3E de las cepas Psv NCPPB 3335, Psn CFBP 5067 y Psf CFBP 5062, compuestos por 31, 28 y 34 T3E, respectivamente (Figura 7) (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). En un estudio reciente, en el que se ha analizado la evolución molecular de los efectores de *P. syringae*, se ha realizado la identificación de T3E en las 494 cepas de este complejo secuenciadas hasta el momento, entre las que se incluyen cepas de *P. savastanoi* (Dillon *et al.*, 2019a). Estas cepas no se han incluido en la Figura 7, puesto que para poder hacerlo habría que realizar una curación manual de las secuencias identificadas, aspecto que se ha incluido en los objetivos de esta Tesis Doctoral.

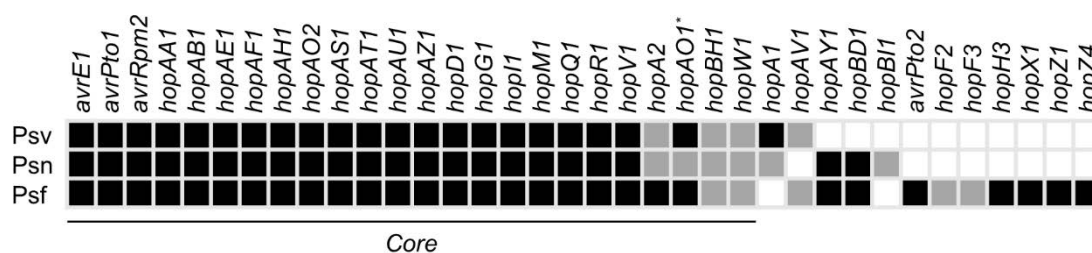


Figura 7. Predicción de efectores del T3SS (T3E) identificados en Psv NCPPB 3335 (Psv), Psn CFBP 5067 (Psn) y Psf CFBP 5062 (Psf) (Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Los colores negro, gris y blanco indican presencia, posible truncamiento y ausencia de la secuencia del gen correspondiente en el genoma de las cepas, respectivamente. La palabra *core* se refiere al conjunto de T3E compartidos entre las tres cepas (incluyendo los genes de T3E posiblemente truncados). La presencia de cinco de los T3E identificados en Psv NCPPB 3335 (*hopAF1-2**, *hopAH2*, *hopBK1*, *hopBL1* y *hopBL2*) no se había investigado aún en Psn CFBP 5067 y Psf CFBP 5062, pero se ha analizado en esta Tesis Doctoral. Los asteriscos indican T3E localización plasmídica en Psv NCPPB 3335. Adaptada de Caballo-Ponce *et al.* (2017a).

El repertorio de T3E más estudiado de *P. savastanoi* es el de la cepa Psv NCPPB 3335, del que se ha demostrado la translocación a las células vegetales a través su T3SS de ocho proteínas que presentan homología con T3E de *P. syringae* previamente descritos (AvrRpm2, HopA1, HopAA1, HopAF1-1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2, HopAZ1) y de otros tres efectores pertenecientes a dos nuevas familias de T3E descritas por vez primera en esta cepa (HopBK1, HopBL1 y HopBL2). De estos tres últimos, se estudió su distribución en el complejo *P. syringae*, cabiendo destacar que los T3E HopBL1 y HopBL2 solo se identificaron en una colección de 31 cepas de Psv aisladas en diferentes países y en otras cepas de *P. syringae* aisladas de huéspedes leñosos, lo que indica un papel relevante de la familia HopBL en las interacciones bacterianas con plantas de olivo y otros huéspedes leñosos. En el Capítulo III de esta Tesis Doctoral, se ha profundizado también en este aspecto, utilizando el mayor número de genomas del complejo *P. syringae* disponibles en la actualidad. También se ha observado que estos 11 T3E contienen una caja *hrp* en la región promotora de los genes que los codifican, y se ha demostrado la dependencia de su transcripción de HrpL, mediante análisis comparativos RT-qPCR realizados en la cepa silvestre y un mutante *hrpL* derivado de la misma, de siete de ellos (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b).

Por otro lado, se ha estudiado la interferencia de estos 11 T3E de Psv NCPPB

3335 con la respuesta PTI. En estos estudios, se observó que todos ellos provocan una disminución significativa de la producción de ROS en hojas de *N. tabacum* var. Xhanti y que todos, excepto HopA1 y HopAF1-1, inducen una reducción significativa de la deposición de calosa en este mismo huésped. Asimismo, cinco de estas proteínas, HopAZ1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2 y HopBL1, también inhiben parcial o completamente la respuesta ETI (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Además, de acuerdo con su papel en la supresión de las defensas tempranas de la planta, se ha demostrado que HopAF1-1 y HopAF1-2 se localizan en la membrana plasmática de las células vegetales, para lo cual resulta esencial la integridad de sus motivos de miristoilación (Myr) codificados en sus extremos N-terminales (Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a). También se ha descrito que HopAO1 y HopAO2 de Psv NCPPB 3335 poseen la actividad fosfatasa característica de los miembros de la familia HopAO, así como que HopAO1 tiene un papel en la virulencia de esta cepa. Mutantes *hopAO1* derivados de NCPPB 3335 inducen tumores de menor tamaño y menos necróticos que la cepa silvestre, así como sobreviven peor que ésta en los tejidos de olivo (Tabla 3) (Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b).

La identificación de los repertorios de T3E de las cepas de *P. savastanoi* aisladas de diferentes huéspedes y la determinación de su papel en virulencia y en el rango de huésped requiere llevar a cabo análisis bioinformáticos y funcionales adicionales de este conjunto de proteínas, objetivo central de esta Tesis Doctoral.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Comparar la secuencia de los genes que codifican el sistema de secreción tipo III (T3SS) y sus efectores (T3E) en los genomas de cepas pertenecientes a los cinco patovares de *Pseudomonas savastanoi* de huéspedes leñosos.
2. Estudiar la funcionalidad del T3SS en los patovares fraxini, retacarpa y mandevillae de *P. savastanoi* y caracterizar el regulón HrpL de la cepa *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.
3. Estudiar la relación con huéspedes leñosos y el papel en el rango de huésped de efectores del T3SS de los patovares de *P. savastanoi*.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Materiales y Métodos Generales



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El Material y Métodos Generales usados en los tres diferentes capítulos de esta Tesis Doctoral han sido descritos en esta sección. El Material y Métodos específico de cada capítulo está incluido dentro de los mismos.

1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y plásmidos generales utilizados en este estudio están descritos en la Tabla 1 y la Tabla 2. Los plásmidos específicos construidos aparecen en el capítulo correspondiente. Las cepas de *Pseudomonas savastanoi* se incubaron a 28 °C y las de *Escherichia coli* a 37 °C, en medio *Lysogenic Broth* (LB) (Bertani, 1951) al 0,5% de NaCl y sin glucosa o en medio *Super Optimal Broth* (SOB) (2% de triptona bacteriológica, 0.5% de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, ajustado a pH7 con NaOH, autoclavado para esterilizarlo y, antes de su utilización se le añadió MgCl₂ 20 mM) (Hanahan, 1983). Los medios líquidos y sólidos se suplementaron con los antibióticos apropiados cuando fue requerido (Tabla 3).

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en esta Tesis Doctoral.

Cepa ^a	Características relevantes ^b	Referencias
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>F</i> -, ϕ 80 <i>dlacZ</i> M15, (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> - <i>mk</i> -), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	Hanahan (1983)
GM2929	<i>F</i> -, <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>glnV44</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>recF143</i> (Sp ^R Cm ^R).	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>Pseudomonas savastanoi</i>		
pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335	Cepa silvestre aislada de olivo	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2007)
pv. <i>nerii</i> ESC23	Cepa silvestre aislada de adelfa	Tegli <i>et al.</i> (2011)
pv. <i>mandevillae</i> Ph3	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Eltlbany <i>et al.</i> (2012)
pv. <i>fraxini</i> NCPPB 1006	Cepa silvestre aislada de fresno	Janse (1981)
pv. <i>retacarpa</i> CECT 4861	Cepa silvestre aislada de retama	Álvarez <i>et al.</i> (1998)

^apv., patovar

^bSp^R y Cm^R, resistencia a espectinomicina y cloranfenicol, respectivamente

Tabla 2. Plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Nombre	Descripción ^a	Referencias
pGEM-T <i>Easy</i>	Vector de clonación que contiene un ori f1 y el gen <i>lacZ</i> (Ap ^R)	Promega, EEUU
pGEM-T- KmFRT- <i>Bam</i> HI	Contiene el casete de Km ^R procedente de pKD4 (Ap ^R Km ^R)	Zumaquero <i>et al.</i> (2010)
pCR2.1	Clonación TA, <i>lacZ</i> α , ColE1, ori f1 (Ap ^R , Km ^R)	Invitrogen, EEUU

^aAp^R y Km^R, resistencia a ampicilina y kanamicina, respectivamente.

Tabla 3. Concentración (µg/ml) de agentes selectivos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Compuesto	Cepas de <i>E. coli</i>	Cepas de <i>Pseudomonas</i>
Ampicilina (Ap)	100	400
Cicloheximida (Ch)	---	100
Cloranfenicol (Cm)	6	-
Espectinomicina (Sp)		
Gentamicinina (Gm)	10	10
Kanamicina (Km)	50	7
Nitrofurantoina (Nf)	---	25
X-Gal	40	40
Sacarosa	---	5 ^a

^aLa concentración de sacarosa corresponde al 5% (P/V)

2. Técnicas de ácidos nucleicos

2.1 Extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico

Las técnicas moleculares y de ácido desoxirribonucleico (DNA) básicas se realizaron siguiendo métodos estándares (Sambrook and Russell, 2001). El DNA genómico se extrajo utilizando el kit de extracción *Jet Flex Extraction Kit* (Genomed; Löhne, Alemania). El DNA plasmídico para fines de clonación se extrajo de *E. coli* utilizando el kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (Sigma-Aldrich, EE. UU.) o el siguiente protocolo de extracción plasmídica: Se extrajo una alícuota de 1,5 ml de un cultivo líquido incubado durante una noche (o/n) y se centrifugó durante 1 min a 12000 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso, obteniéndose un precipitado de células. Este precipitado se resuspendió en 250 µl de Solución I (Tris pH 8 25 mM, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM, RNAasa 0,01% (P/V)). A continuación, se añadieron 250 µl de Solución II de lisis (1% SDS, 0,2 M NaOH), se mezcló por inversión varias veces y se incubó, máximo 5 minutos (min), hasta que la solución se volvió clara

y viscosa. Tras la incubación, se le añadieron 250 μ l de Solución III de neutralización (8,83 g de acetato potásico, 3,45 ml de ácido acético, 22,2 ml H₂O), se mezcló por inversión varias veces y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadieron 600 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 300 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se dejó secar al aire y se resuspendió en 30 μ l de H₂O bidestilada. Este último protocolo también se utilizó en análisis rutinarios de clones de plásmidos.

La purificación de DNA desde gel o desde amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando el kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Cor.; Madison, EEUU).

2.2 Hibridación de DNA

La hibridación de DNA se realizó siguiendo los métodos estándares (Sambrook and Russell, 2001), utilizando el kit de detección *DIG-Nucleic Acid Detection* (Roche; Mannheim, Germany), y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El DNA se transfirió a una membrana de nylon mediante transferencia por capilaridad ascendente y se fijó por irradiación UV. Las etapas de prehibridación e hibridación se llevaron a cabo a 65 °C. La sonda de DNA se marcó con dNTPs de digoxigenina quimioluminiscentes utilizando el mix *DIG Labelling Mix* (Roche; Mannheim, Germany). Los oligonucleótidos empleados en el diseño de las sondas aparecen en tablas específicas dentro de los diferentes capítulos.

2.3 Amplificación, restricción y ligación de fragmentos de DNA

En función del fragmento de DNA que se deseaba amplificar se utilizaron dos DNA polimerasas: *Go-Taq® DNA Polymerase* (Promega; Madison, EEUU), en amplificaciones rutinarias, y *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs; Massachusetts, EEUU), en amplificaciones de fragmentos en las que se

quería minimizar los errores en la secuencia de nucleótidos. Ambas se utilizaron siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

Las endonucleasas (*Takara Biotech Cor.*; Kaohsiung, Taiwán) se utilizaron siguiendo las instrucciones especificadas por los fabricantes.

Las ligaciones de DNA se realizaron utilizando la ligasa T4 (*Takara Biotech Cor.*; Kaohsiung, Taiwán). La concentración de inserto se calculó siguiendo la siguiente fórmula: [(100 ng de inserto) (pares de bases (pb) del inserto)]/pb del vector. Los fragmentos se combinaron en una ratio 1:3 de vector e inserto.

2.4 Secuenciación de DNA

La secuenciación de fragmentos de DNA o plásmidos purificados se llevó a cabo por la compañía Stabvida (<http://www.stabvida.com/>).

2.5 Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizaron geles convencionales de agarosa para confirmar la purificación de plásmidos, para visualizar digestiones plasmídicas, para preparar los fragmentos de DNA para las hibridaciones *Southern*, para el aislamiento de bandas desde gel de garosa, etc. La agarosa se disolvió en el tampón Tris/Borato EDTA (TBE) (Sambrook and Russell, 2001). La solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™ (*iNtRON*; Massachusetts, EE. UU.) se añadió para poder visualizar el DNA. La agarosa (0,8-3,0%) fundida se añadió a una bandeja de geles y, posteriormente, cuando el gel estaba solidificado y las muestras en los pocillos, la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal que contenía TBE. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador *1 Kilobase (Kb) Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*™; Carlsbad, EEUU), que contiene fragmentos de DNA de entre 100 pb y 12 Kb. Los geles se visualizaron utilizando un equipo ChemiDoc XRS+ y el *software* Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories SA; Madrid, Spain).

2.6 Transformación de cepas bacterianas

Los plásmidos se transformaron en las diferentes cepas de *E. coli* mediante choque térmico (Hanahan, 1983). Para ello, se prepararon células competentes

con una alta eficiencia de transformación mediante el método descrito por Hanahan *et al.* (1995). Se realizó un preinóculo con una colonia de DH5 α en 5 ml de LB y se incubó en agitación (200 rpm) y a 37 °C durante 16 h. Este preinóculo se añadió a 500 ml de medio Psi (20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,745 g de MgSO₄, agua destilada hasta 1 l, a pH a 7,6 ajustado con KOH 10N y autoclavado) y se incubó en agitación (200 rpm) y a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO) a 500 nm de 0,48. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 5 min en una centrifuga de mesa. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados celulares en 150 ml de TFB1 (12,092 g/l de RbCl₂, 6,3 g/l de MnCl₂, 2,9 g/l de acetato potásico, 1,1 g/l de CaCl₂, 15% (V/V) de glicerol, a pH 5,8 ajustado con ácido acético 0,2 M y esterilizado por filtración). Tras la resuspensión completa de las células mediante una agitación manual suave en la solución TFB1, se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron nuevamente durante 5 min a 3000 rpm y a 4°C. Se volvió a descartar el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados celulares en 20 ml de TBF2 (2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l de RbCl₂, 8,3 g/l CaCl₂, 15% (V/V) de glicerol, a pH 7,0 ajustado con NaOH 10 M y esterilizado por infiltración) previamente enfriado a 4 °C. Las células competentes obtenidas se incubaron en hielo durante 15 min y se repartieron en alícuotas de 100 μ l para su conservación a -80°C. La transformación se realizó mezclando 100 μ l de células competentes con DNA plasmídico o con DNA procedente de una reacción de ligación. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min, se sometió a un choque térmico durante 45 segundos a 42 °C seguidos de 2 min en hielo. Posteriormente, se añadió 1 ml de SOB y se incubó durante 1 hora (h) en agitación a 37 °C. Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 1 min en una microcentrífuga, y el precipitado de células se sembró en placas de LB con el antibiótico cuya resistencia portaba el plásmido con el que se transformó.

Para *P. savastanoi* se realizó un protocolo de electroporación siguiendo el descrito por Choi *et al.* (2006). Se centrifugaron 6 ml de un cultivo saturado en medio SOB de la cepa receptora a 4500 rpm durante 1 min a temperatura ambiente en una centrifuga de mesa. El precipitado de células se lavó 2 veces con

una solución de sacarosa 300 mM y el precipitado resultante se resuspendió en 100 μ l de sacarosa 300 mM, se mezcló con 300-800 ng de DNA plasmídico y, tras 1 min, se transfirió a una cubeta de electroporación a la que se aplicó un pulso de 2.5kV, 25 μ F y 200 Ω con ayuda de un electroporador *MicroPulser* (Bio-Rad Laboratories SA; Madrid, España). Tras la electroporación, las células bacterianas se resuspendieron en 3 ml de medio SOB, se mantuvieron durante 4h en agitación a 28 °C, y posteriormente se sembraron en medio LB con el antibiótico cuya resistencia portaba el plásmido con el que se transformó.

2.7 Construcción de cepas bacterianas y plásmidos

Los productos de PCR se clonaron en los vectores pGEM-T *easy* (Promega, Madison, EEUU) o pCR2.1 (Invitrogen, California, USA) y se secuenciaron antes de subclonarlos en los vectores destinos. Para construir mutantes de delección en *P. savastanoi*, fragmentos de DNA de aproximadamente 1.0 Kb, correspondientes a las regiones flanqueantes 5' y 3' del ORF que será eliminado, se amplificaron con la polimerasa de alta fidelidad Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs; Massachusetts, EEUU) mediante 3 rondas de PCR utilizando como molde DNA genómico y siguiendo el método previamente descrito en Zumaquero *et al.* (2010). Puesto que la DNA polimerasa utilizada no incorpora una adenina terminal al fragmento amplificado, se realizó un *tailing*, es decir, la adición de una adenina terminal mediante la DNA polimerasa Go-Taq® *DNA Polymerase* (Promega; Madison, EEUU) en presencia de dATP (0,2 mM) durante 30 min a 70°C. Con el producto resultante se realizó una clonación TA en pGEM-T *easy* (Tabla 2) y se secuenció para descartar mutaciones de las regiones flanqueantes. El plásmido resultante se marcó con el casete de resistencia a kanamicina *nptII*, obtenido del plásmido pGEM-T-KmFRT-*Bam*HI (Tabla 2). Para la mutagénesis de intercambio alélico, estos plásmidos se transformaron por electroporación en las cepas de *P. savastanoi* como se ha descrito previamente (Pérez-Martínez, 2007). Los transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con Km, y se realizaron réplicas de las colonias resultantes en placas de LB-Ap para determinar si en los transconjugantes se había producido

la integración del plásmido (Ap^R) o el intercambio alélico (Ap^S). Se realizaron hibridaciones *Southern* para confirmar que el intercambio alélico ha ocurrido una única vez y en la posición correcta. Para cada mutante, se utilizaron dos sondas diferentes, una correspondiente con el gen delecionado y otra con el gen *nptII*.

Para la construcción de mutantes por integración de un plásmido en *P. savastanoi*, fragmentos de DNA de aproximadamente 1 Kb correspondientes a una zona intermedia del ORF que se quiere interrumpir, se amplificaron con la polimerasa de alta fidelidad Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs; Massachusetts, EEUU) y con el producto resultante se realizó un *tailing*. Con el producto resultante del *tailing* se realizó una clonación TA en pCR2.1 (Tabla 2) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se secuenció para descartar mutaciones en la región clonada. Para la mutagénesis por interrupción del ORF, estos plásmidos se transformaron por electroporación en las cepas de *P. savastanoi* y los transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con Km. Se realizaron hibridaciones *Southern* para confirmar que la integración del plásmido pCR2.1 solo se había producido una única vez y en la posición correcta. Para ello se utilizó la sonda del gen *nptII*.

3. Ensayos de patogenicidad en los respectivos huéspedes de *P. savastanoi*

En esta Tesis Doctoral se han realizado ensayos de patogenicidad de las cepas de *P. savastanoi* en plantas de olivo (*Olea europea*) derivadas de la germinación de semillas *in vitro* (originalmente recolectadas de una planta de la variedad Arbequina), plantas de adelfa (*Nerium oleander*) variedad rosa (flores simples rosas) suministradas por Viveros Guzmán (Málaga, España), plantas de dipladenia (*Mandevilla* spp.) variedad de flores rojas (Diamantina Ruby) o rosas, y plantas de fresno (*Fraxinus excelsior*) y retama (*Retama sphaerocarpa*) nativas de Valladolid y suministradas por Viveros Gutiérrez (Valladolid, España). Para preparar el inóculo, las células bacterianas se incubaron en placas de LB durante 48 h a 28 °C. Posteriormente, se recogió biomasa de cada una de ellas y se

resuspendió en MgCl_2 10 mM. Se realizaron dos lavados con MgCl_2 10 mM y las suspensiones bacterianas se ajustaron a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 (10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). Para la inoculación de las plantas de olivo, adelfa, dipladenia y fresno se realizaron heridas a lo largo del tallo con un bisturí y se colocaron 10^6 UFC por lesión con una micropipeta (Penyalver *et al.*, 2006; Pérez-Martínez *et al.*, 2007). La comprobación de la dosis inicial se realizó mediante diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas y siembra en placa. La inoculación de las plantas de retama se realizó mediante la inyección de aproximadamente 10^7 UFC con una aguja acoplada a una jeringa. El número de plantas utilizadas y de puntos inoculados en cada ensayo se detallan en el Material y Métodos específico de cada capítulo. Las heridas inoculadas se protegieron con papel *Parafilm*[®] (Bemis, Neenah, WI, USA) durante siete días para mantener la humedad. Las plantas se mantuvieron en un invernadero durante 90 días bajo el fotoperiodo natural (15 h luz/9 h oscuridad) y en un rango de temperaturas que oscilaba entre los 18 °C y 28 °C). Los síntomas generados en olivo, adelfa, dipladenia y fresno, a 90 días posinoculación (dpi), se fotografiaron con una cámara digital de alta resolución (Nikon DXM 1200; Nikon Corporation, Tokio, Japón). Los cambios morfológicos inducidos en las plantas de retama a 90 dpi se fotografiaron con un microscopio estereoscópico (Leica MZ FLIII; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Para recuperar las células de *P. savastanoi* de las plantas inoculadas a 90 dpi, se realizó la escisión de la zona inoculada con un bisturí y se trituró en un mortero con un volumen adecuado de MgCl_2 10 mM (entre 1-4 ml en función del tamaño del tumor). En el Material y Métodos específico de cada capítulo se indica el número de puntos y plantas utilizados. Las suspensiones bacterianas obtenidas se sembraron en placas de LB suplementadas con Nf y Ch. Los recuentos de las colonias bacterianas se realizaron 48-72 h después de la incubación a 28 °C.

4. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos realizados en esta Tesis Doctoral se han realizado con

el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA). Para comparar dos grupos de muestras se ha utilizado la prueba *Student's t-test* (Owen, 1965) y un $P < 0,05$. Para comparar más de dos grupos de muestras se ha utilizado el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) y un $\alpha = 0.05$ para las comparaciones múltiples.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo I

Especificidad de huésped en *Pseudomonas savastanoi*: patogenicidad cruzada en huéspedes leñosos y análisis genómico de sistemas de secreción

Parte de los resultados obtenidos en este Capítulo se han incluido en la siguiente publicación:

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. *Frontiers in Plant Science* 11(973). doi: 10.3389/fpls.2020.00973 (Anexo I).

*Estos autores han contribuido por igual a este trabajo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

El complejo *Pseudomonas syringae* constituye un grupo de bacterias Gram (-) consideradas como el grupo de patógenos de plantas más relevantes desde el punto de vista científico y económico (Mansfield *et al.*, 2012). Comprende al menos 13 filogrupos (FG) que abarcan 15 especies diferentes de *Pseudomonas* asociadas con las plantas y el ciclo del agua (Berge *et al.*, 2014; Gomila *et al.*, 2017). El complejo también se divide a un nivel infraespecífico en aproximadamente 65 patovares en base al rango de huésped (Bull and Koike, 2015). El amplio rango de huésped del complejo *P. syringae* contrasta con la especialización de huésped de la mayoría de los aislados de cultivos agrícolas. Por el contrario, los aislados ambientales muestran un rango de huésped más amplio (Morris *et al.*, 2013; Berge *et al.*, 2014; Monteil *et al.*, 2016). Además, un estudio reciente mostró que las cepas de *P. syringae* forman un potencial de rango de huésped continuo superpuesto con igual representación de rangos de huésped estrechos, moderados y amplios (Morris *et al.*, 2019). Comprender esta complejidad en los diferentes niveles requiere el establecimiento de patosistemas apropiados, facilitando la integración de datos fenotípicos, genómicos y evolutivos. Debido a esto, el complejo *P. syringae* ha surgido como uno de los modelos más relevantes para estudiar la especificidad del huésped en patógenos bacterianos de plantas (Vinatzer *et al.*, 2014; Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b).

El sistema de secreción tipo III (T3SS) y su repertorio de efectores (T3E) han sido reconocidos como los determinantes principales de la especificidad de huésped en *P. syringae*, tanto a nivel de especie-patovar como de raza-cultivar (Fouts *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011). Los T3E son particularmente interesantes desde el punto de vista evolutivo, debido al doble y opuesto papel que presentan en la interacción huésped-patógeno. Por un lado, en el patógeno los T3E han evolucionado para promover la competitividad bacteriana, generalmente a través de la supresión de la inmunidad del huésped o de la alteración de la homeostasis celular del mismo. Por otro lado, en los huéspedes se han desarrollado mecanismos para reconocer la presencia o la actividad de los T3E, y este reconocimiento a menudo provoca una respuesta

inmune que cambia de nuevo la interacción a favor del huésped (Dillon *et al.*, 2019a). Un ejemplo de esta evolución es la interacción de las nueve razas descritas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) con ocho cultivares diferentes de judía (*Phaseolus vulgaris* y *P. acutifolius*) en la que se ven implicados cinco genes de resistencia (R) del hospedador y cinco genes que codifican T3E del patógeno (Jenner *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1996; Mansfield *et al.*, 1997; Tsiamis *et al.*, 2000). Recientemente, con el objetivo de estudiar el papel de la respuesta inmune mediada por el reconocimiento de T3E (ETI) en la determinación de la especificidad de huésped, se ha realizado por primera vez un estudio sistémico de la prevalencia de la ETI de *Arabidopsis thaliana* frente a la diversidad de T3E del complejo *P. syringae* (Laflamme *et al.*, 2020). Aunque la mayoría de estudios se han realizado en cepas aisladas de huéspedes herbáceos, actualmente varios patosistemas leñosos se han utilizado como modelos para el estudio del papel de los T3E y otros factores de virulencia en la especialización y en la emergencia de enfermedades en huéspedes leñosos (McCann *et al.*, 2013; Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b; Hulin *et al.*, 2018).

La especie *Pseudomonas savastanoi* está constituida por cuatro patovares bien definidos aislados de huéspedes leñosos, pv. *savastanoi* (Psv, aislados de olivo), pv. *nerii* (Psn, aislados de adelfa), pv. *fraxini* (Psf, aislados de fresno) y pv. *retacarpa* (Psr, aislados de retama) (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). Además, recientemente se ha identificado a *P. savastanoi* como el agente causal del moteado en hojas y tallo de la dipladenia (*Mandevilla* spp.), cuyo rango de huésped es diferente al de los patovares ya establecidos dentro de esta especie (Eltlbany *et al.*, 2012), y es por ello que se ha propuesto su inclusión dentro de un nuevo patovar de *P. savastanoi*, el pv. *mandevillae* (Psm) (Caballo-Ponce, 2017). El rango de huésped de los cuatro patovares bien definidos de *P. savastanoi* ha sido claramente diferenciado mediante pruebas de patogenicidad cruzada. Las inoculaciones artificiales de las cepas de Psv inducen la formación de tumores en las plantas de olivo y fresno, pero no en las de adelfa, mientras que las cepas de Psn pueden infectar a los tres huéspedes. Por otro lado, las cepas de Psf inducen síntomas tanto en el fresno como en el olivo (Janse, 1982; 1991; Iacobellis *et al.*,

1998; Ramos *et al.*, 2012; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). En contraste, el rango de huésped de los aislados de Psr parece estar restringido a la retama (Álvarez *et al.*, 1998). Con respecto a los aislados de dipladenia, Eltlbany *et al.* (2012) mostraron que inducen síntomas en dipladenia y adelfa, pero no en olivo ni alheña, sin embargo, en ensayos de patogenicidad llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, se observó que, además de en dipladenia, estos aislados también inducen síntomas en olivo y fresno, pero no en retama ni adelfa (Caballo-Ponce, 2017). Aunque las diferencias observadas podrían deberse a la utilización de distintos cultivares de olivo y adelfa en ambos ensayos, como se ha mostrado en inoculaciones artificiales de *P. savastanoi* en olivo (Penyalver *et al.*, 2006), las diferencias observadas en el rango de huésped de los aislados de dipladenia en relación a los otros cuatro patovares han permitido la inclusión de los aislados de dipladenia en un nuevo patovar, al que se ha denominado pv. mandevillae (Caballo-Ponce, 2017). Por lo tanto, la disponibilidad de una buena delimitación en el rango de huésped de los aislados de *P. savastanoi* respalda el uso de estos patosistemas para estudiar la base de la especificidad de huésped en bacterias patógenas formadores de tumores en huéspedes leñosos.

La reciente disponibilidad del genoma cerrado de la cepa Psv NCPPB 3335, así como, la de 20 borradores genómicos pertenecientes a cepas de los patovares aislados de huéspedes leñosos de *P. savastanoi*, nos ha permitido llevar a cabo un análisis genómico comparativo con 21 genomas de *P. savastanoi* de cepas aisladas de olivo, adelfa, dipladenia, fresno y retama. Se ha realizado un análisis de los sistemas de secreción y del repertorio de T3E del T3SS de ocho genomas de Psv, cuatro genomas de Psn, un genoma de Psm, cinco genomas de Psf y tres genomas de Psr, con el objetivo de identificar aquellos elementos que puedan contribuir a las diferencias encontradas en el rango de huésped. También se realizaron pruebas de patogenicidad cruzada en una selección de las cepas secuenciadas de *P. savastanoi*, con el fin de correlacionar los resultados de los análisis genómicos con la especificidad del huésped de las cepas.

Las siguientes secciones de este Capítulo incluye una descripción y discusión

de los resultados obtenidos por A. Moreno-Pérez de las inoculaciones cruzadas y de la comparativa genómica del T3SS y su repertorio de T3E. Los resultados obtenidos del análisis del pangenoma de *P. savastanoi* 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 (Moreno-Pérez *et al.*, 2020).

MATERIAL Y MÉTODOS

Genomas analizados

Los genomas de las cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Genomas de las cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos utilizados en este estudio.

Patovar/cepa ^a	Huésped de aislamiento	Número de acceso ^d	Referencia
pv. savastanoi			
NCPB 3335 ^b	Olivo	NZ_CP008742 FR820585 FR820586 FR820587	Moreno-Pérez <i>et al.</i> (2020) Bardaji <i>et al.</i> (2011a) Bardaji <i>et al.</i> (2011a) Bardaji <i>et al.</i> (2011a)
ICMP 4352 ^{PT}	Olivo	NZ_LJRJ000000000	Thakur <i>et al.</i> (2016)
DAPP-PG722	Olivo	NZ_JOJV000000000	Moretti <i>et al.</i> (2014)
PseNe107	Olivo	NZ_JYHF000000000	Bartoli <i>et al.</i> (2015)
ICMP 13519	Olivo	NZ_RBNW000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
ICMP 1411	Olivo	NZ_RBPF000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
0485_9*	Adelfa	RBNY000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
ICMP 13786*	Adelfa	NZ_RBTN000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
pv. nerii			
ESC23	Adelfa	NZ_NIAY000000000	Moreno-Pérez <i>et al.</i> (2020)
ICMP 16943 ^{PT,c}	Adelfa	NZ_LJQW000000000	Thakur <i>et al.</i> (2016)
CFBP 5067 ^{PT,c}	Adelfa	NZ_LIHX000000000	Nowell <i>et al.</i> (2016)
ICMP 13781	Adelfa	RBTO000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
ICMP 16944	Adelfa	NZ_RBUB000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
pv. mandevillae			
Ph3	Dipladenia	NZ_NIAX000000000	Datos no publicados ^e
pv. fraxini			
NCPB 1006	Fresno	NZ_NIAW000000000	Moreno-Pérez <i>et al.</i> (2020)
ICMP 7711 ^{PT,c}	Fresno	NZ_LLJL000000000	Thakur <i>et al.</i> (2016)
CFBP 5062 ^{PT,c}	Fresno	NZ_LIIC000000000	Nowell <i>et al.</i> (2016)
ICMP 9132	Fresno	NZ_RBSB000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
ICMP 7712	Fresno	NZ_RBSC000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
ICMP 9129	Fresno	NZ_RBSA000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
pv. retacarpa			
CECT 4861 ^{PT,c}	Retama	NZ_NBYW000000000	Moreno-Pérez <i>et al.</i> (2020)
ICMP 16945 ^{PT,c}	Retama	NZ_LJRD000000000	Thakur <i>et al.</i> (2016)
ICMP 16946	Retama	RBQM000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)
ICMP 16947	Retama	NZ_RBNM000000000	Dillon <i>et al.</i> (2019b)

^aEl sombreado indica cepas cuyos genomas se excluyeron de los análisis bioinformáticos; PT, cepa patotipo. Los asteriscos indican cepas aisladas de adelfa incluidas en el patovar Psv (ver Figura 6).

^bLos datos de NCPB 3335 incluyen tanto la secuencia completa del cromosoma (número de acceso NZ_CP008742.1) como las de sus tres plásmidos nativos (pPsv48A, FR820585; pPsv48B, FR820586 y; pPsv48C, FR820587).

^cICMP 7711 y CFBP 5062; ICMP 16943 y CFBP 5067; CECT 4861 y ICMP 16945 corresponden con el mismo aislado de *P. savastanoi* obtenido de dos colecciones diferentes (Tabla 2).

^dNational Centre for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^eEloy Caballo-Ponce y Cayo Ramos, Universidad de Málaga.

Hay seis genomas que corresponden a tres cepas obtenidas de dos colecciones diferentes y secuenciadas independientemente por varios autores, de las que se seleccionaron los tres genomas de mayor calidad (Tabla 1).

Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas silvestres utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 2. Las cepas de *P. savastanoi* se incubaron a 28 °C en medio *Lysogenic Broth* (LB) (Bertani, 1951) al 0,5% de NaCl y sin glucosa. Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con el antibiótico apropiado a la siguiente concentración: nitrofurantoína (Nf) 20 µg/ml y cicloheximida (Ch) 100 µg/ml.

Análisis filogenéticos

El estudio de la relación filogenética entre las cepas se realizó mediante un análisis MLSA (del inglés, *Multilocus sequence analysis*) utilizando 10 genes esenciales concatenados (Tabla 3) cuyas secuencias completas estaban presentes en las 21 cepas de *P. savastanoi* (19113 o 19119 nucleótidos (nt) por cepa). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MUSCLE mediante el *software* MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). El árbol se construyó mediante el método de máxima verosimilitud utilizando MEGA7. La topología del árbol obtenida fue validada estadísticamente mediante el método *Bootstrap* (100 réplicas).

Ensayos de patogenicidad cruzada

La patogenicidad de las cepas de *P. savastanoi* incluidas en la Tabla 2 se analizó en plantas de *Olea europea* (olivo) derivadas de la germinación *in vitro* de semillas (originalmente recolectadas de una planta de la variedad Arbequina), plantas de *Nerium oleander* (adelfa) variedad rosa de flores simples, suministradas por Viveros Guzmán (Málaga, España), plantas de *Mandevilla* spp. (dipladenia) variedad de flores rojas (Diamantina Ruby), y plantas de *Fraxinus excelsior* (fresno) y *Retama sphaerocarpa* (retama) nativas de Valladolid y suministradas por Viveros Gutiérrez (Valladolid, España). La preparación del inóculo y la inoculación se realizó tal y como se detalla en Material y Métodos Generales. En los ensayos de patogenicidad cruzada que se muestran en las Figuras 2 y 3, se

Tabla 2. Cepas silvestres de *Pseudomonas savastanoi* utilizadas en los ensayos de patogenicidad cruzada.

Patovar	Huésped de aislamiento	Cepas ^a				País de aislamiento	Año de aislamiento	Referencial/Fuente original
		CECT	CFBP	ICMP	NCPPB	Otros		
<i>savastanoi</i>	Olivo	5024			3335		1984	Pérez-Martínez et al. (2007)/D.E. Stead
			1670	4352 ^{PT}	639		1959 ^c	D. Sutic
						DAPP-PG722	2007	Hosni et al. (2011)
						PseNe107	2007	Balestra et al. (2009)
	Adelfa	5021		13519	1344 [#]	ICPB PS170	1997	J.M. Young
<i>nerii</i>	Adelfa			1411		0485_9	1961	E.E. Wilson
				13786		ITM601	1985	Azad & Cooksey (1995)
						ESC23	1985	Morea et al., 1989/ N.S. Iacobellis
<i>mandevillae</i>	Dipladenia			16943	3278		2004	Tegli et al. (2011)
			5067 ^{PT}				2007	Janse (1991)
<i>fraxini</i>	Fresno			13781		ITM310	Antes de 1985	Sisto et al. (2007)/N.S. Iacobellis
				16944	3334		1984	D.E. Stead
<i>retacarpa</i>	Retama					Ph3	2012	Eltbany et al., 2012
			1663	4347	1006		1961	Janse (1981)
			5062 ^{PT}	7711			1978	Janse (1991)
<i>retacarpa</i>	Retama	4861 ^{PT}	5512	16945	4050		1996	Alvarez et al. (1998)

^aLas cepas utilizadas en este estudio están resaltadas en negrita. CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, CFBP; *Collection Française de Bactéries Phytopathogènes*; ICMP, *International Collection of Microorganisms from Plants*; NCPPB, *National Collection of Plant Pathogenic Bacteria*; ITM, *Istituto Tossine e Micofossine da Parassiti Vegetali Collection* (Bari, Italia); DAPP, *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia* (Perugia, Italia); ICPB, *International Collection of Phytopathogenic Bacteria*. PT, cepa patotipo. #, actualmente no disponible en NCPPB.

^cAño en el que se añadió a NCPPB.

utilizó dos plantas por cepa y el número de lesiones infectadas varió entre cinco y 10 dependiendo del tamaño de la planta. En los ensayos de patogenicidad cruzada de las cepas de Psv y Psn que se muestran en la Figura 6 se utilizaron tres plantas de olivo y adelfa por cepa y se inocularon entre 10 y 12 lesiones por planta y cepa. Para estimar las densidades poblacionales se utilizó el mismo procedimiento descrito en Material y Métodos Generales. Para ello se escindieron tres puntos inoculados procedentes de dos (Figuras 4) y tres plantas (Figura 6) para cada cepa.

Tabla 3. Genes utilizados para construir el árbol filogenético mostrado en la Figura 1.

Número de acceso ^a	Anotación
PSA3335_RS23225	Subunidad A de la DNA girasa (<i>gyrA</i>)
PSA3335_RS07445	Proteína RecA de recombinación/repación del DNA (<i>recA</i>)
PSA3335_RS19840	Citrato (Si)-sintasa (<i>cts</i> , <i>gltA</i>)
PSA3335_RS10025	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa tipo I (<i>gapA</i>)
PSA3335_RS00020	Subunidad B de la DNA topoisomerasa (hidrolización de ATP) (<i>gyrB</i>)
PSA3335_RS03765	Subunidad alfa de la RNA polimerasa dirigida por DNA (<i>rpoA</i>)
PSA3335_RS03605	Subunidad beta de la RNA polimerasa dirigida por DNA (<i>rpoB</i>)
PSA3335_RS03020	Factor sigma de la RNA polimerasa (<i>rpoD</i>)
PSA3335_RS27220	Porina de la membrana externa, familia OprD
PSA3335_RS00970	Permeasa de transportador ABC de fosfato

^aNúmero de acceso en *GenBank* para la cepa utilizada como referencia, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335

Predicción bioinformática de sistemas de secreción

La identificación de los componentes reguladores y estructurales del T3SS y los sistemas de secreción tipo IV (T4SS) y tipo VI (T6SS) se realizó con la herramienta web T346Hunter (Martínez-García *et al.*, 2015a). Las secuencias que codifican el T3SS se examinaron manualmente con la plataforma de *software* bioinformático Geneious 8.1.9 (Kearse *et al.*, 2012) y con la plataforma de visualización y anotaciones de genomas Artemis 16.0.0 (Carver *et al.*, 2012), con el objetivo de realizar una análisis comparativo a nivel de secuencia entre los diferentes genomas analizados.

Distribución de efectores del T3SS

La predicción bioinformática de T3E previamente descritos y de los nuevos candidatos codificados en los genomas de *P. savastanoi* se realizó utilizando flujos

de trabajo específicos. Para la identificación de T3E descritos, se utilizó PIFAR, una herramienta web para la identificación de factores de interacción planta-bacteria en genomas bacterianos (Martínez-García *et al.*, 2016). PIFAR busca homólogos de T3E en otras tres plataformas: *The Pseudomonas syringae Genome Resources* (Lindeberg *et al.*, 2005), *Ralsto T3E* (Peeters *et al.*, 2013) y *The Xanthomonas Resource* (<http://www.xanthomonas.org/>). Las secuencias de los T3E identificados se examinaron manualmente con el objetivo de buscar truncamientos, interrupciones o cambios de pauta en el marco abierto de lectura, utilizando las plataformas de *software* bioinformático Geneious 8.9.1 y Artemis 16.0.0. La identificación de nuevos T3E se realizó en base a dos criterios diferentes, las características comunes de la secuencia N-terminal de los T3E utilizando el programa *EffectiveDB* (<http://effectivedb.org>) (Eichinger *et al.*, 2015), y la identificación de potenciales cajas HrpL en las secuencias promotoras (500 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio), siguiendo los criterios descritos por Fouts *et al.* (2002). La agrupación jerárquica de los genomas de *P. savastanoi* en función de su contenido en T3E se realizó utilizando el *software* *Morpheus* (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). Para construir el *heat-map*, se generó una matriz de presencia-ausencia para todos los ortólogos de los T3E. Se dieron valores de '1', '0,5' y '0' para cada región codificante (CDS, *conding sequence*) de longitud completa, CDS truncado/interrumpido/con cambios en el marco abierto de lectura, y ausencia del T3E, respectivamente. Además, se proporcionaron valores de '2' y '1,5' para los T3E parálogos codificados como dos CDS de longitud completa o como un CDS de longitud completa y un CDS truncado, respectivamente. La matriz se usó para medir la distancia entre cepas utilizando el método de distancia Euclidiana. Posteriormente, el árbol se construyó utilizando el método de agrupación jerárquica *complete linkage* (encadenamiento completo).

RESULTADOS

Filogenia de los patovares de *P. savastanoi*

El análisis MLSA separa el complejo *P. syringae* en 13 FG distintos (Berge *et al.*, 2014; Gomila *et al.*, 2017), lo cual ha sido respaldado por la filogenia basada en el conjunto de ortólogos compartidos entre todos los genomas (*core*) (Nowell *et al.*, 2016; Gomila *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b). En todos esos estudios, los cuatro patovares de *P. savastanoi* de huéspedes leñosos han sido clasificados en el FG3. En este estudio se ha llevado a cabo un análisis MLSA utilizando 10 genes esenciales concatenados (Tabla 3), cuyas secuencias están completas en las 20 cepas de *P. savastanoi* pertenecientes a los 4 patovares bien establecidos de huéspedes leñosos y en el aislado de dipladenia Ph3 (Figura 1). En el árbol filogenético construido mediante el método de máxima verosimilitud se identifican cinco clados bien diferenciados, dos de los cuales son monofiléticos y corresponden con los patovares Psr y Psf. Sin embargo, el patovar Psv parece no ser monofilético y se distribuye en dos clados diferentes. Dos cepas de Psv (NCPPB 3335 y ICMP 1411) se agrupan en la misma rama que las cepas de Psr y bien separadas del resto de cepas de Psv. En el segundo clado, se incluyen el resto de las cepas de Psv, entre las que se encuentran dos cepas aisladas de adelfa (ICMP 13786 y 0485_9). Las cepas de Psn se agrupan en un clado no monofilético junto con el aislado de dipladenia Ph3.

El árbol filogenético realizado con 10 genes esenciales muestra una disposición evolutiva muy similar a la que muestra el árbol filogenético realizado con todos los genes del *core* de estas 21 cepas de *P. savastanoi* (Moreno-Perez *et al.*, 2020).

Rango de huésped de cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos

La patogenicidad de las 10 cepas de *P. savastanoi* cuyos genomas estaban disponibles en NCBI a finales de 2017 (Figura 2 y Tabla 2) se compararon con los datos de rango de huésped previamente publicados (Janse, 1991; Álvarez *et al.*, 1998; Iacobellis *et al.*, 1998). En estas 10 cepas se incluyeron las 3 cepas

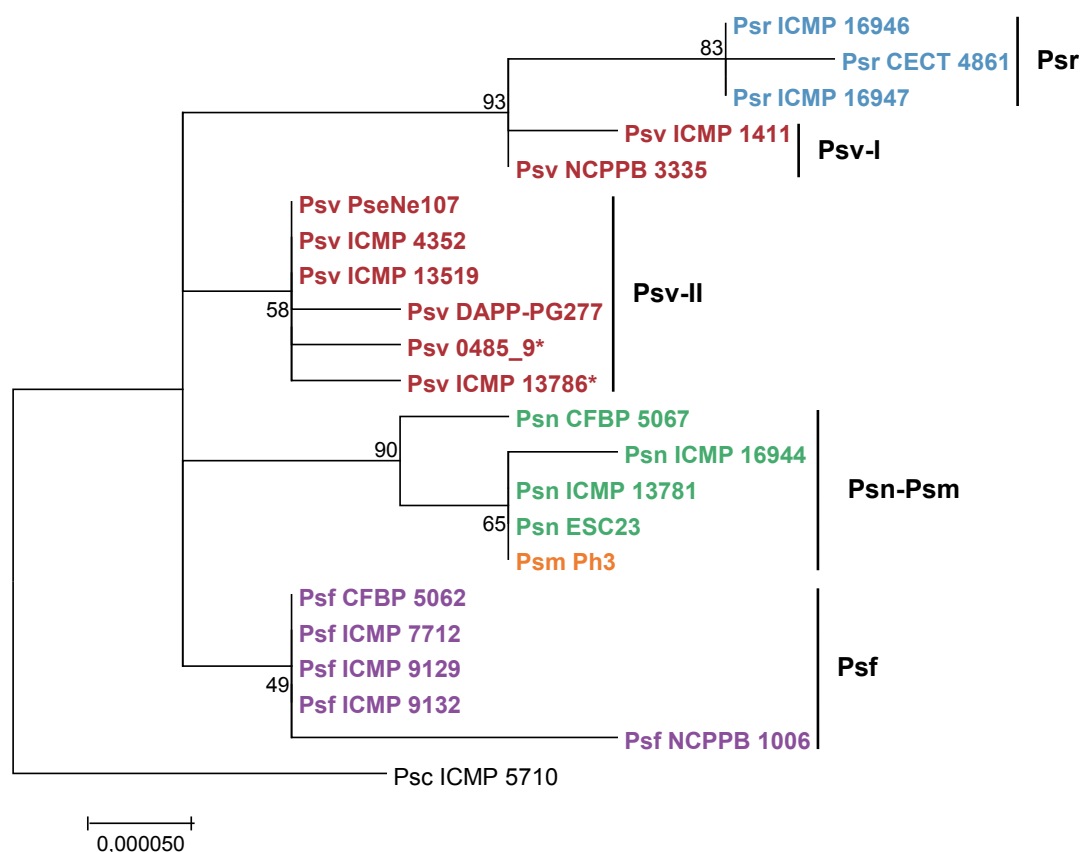


Figura 1. Filogenia MLSA (*Multilocus sequence analysis*) de los patovares de *P. savastanoi*. Las secuencias de 10 genes esenciales que están completos en todos los genomas de *P. savastanoi* se concatenaron (19113 o 19119 nt por cepa) y alinearon utilizando *Muscle* con MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Este alineamiento se utilizó para construir un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud con MEGA7. El árbol filogenético se enraizó utilizando el genoma de *P. syringae* pv. *ciccaronei* (Psc) ICMP 5710; los valores de los nodos son los porcentajes de *bootstrap* correspondientes a 100 réplicas; la escala representa sustituciones por sitio. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *nerii*, *mandevillae*, *fraxini* y *retacarpa*, respectivamente. Los asteriscos indican las cepas aisladas de adelfa incluidas en Psv.

secuenciadas en nuestro grupo de investigación, cuya patogenicidad en sus respectivos huéspedes había sido previamente publicada, Psn ESC23 (Tegli *et al.*, 2011; Cerboneschi *et al.*, 2016), Psf NCPPB 1006 (Janse, 1981; 1991; Tegli *et al.*, 2011), y Psr CECT 4861 (Álvarez *et al.*, 1998), además del aislado de dipladenia Ph3 (Eltlbany *et al.*, 2012; Caballo-Ponce and Ramos, 2016).

La cepa Psr CECT 4861 solo produjo el desarrollo de tumores bien definidos en la mayoría de los puntos inoculados en las plantas de retama (Figuras 2 y 3), alcanzando una densidad poblacional bacteriana en torno a 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC)/lesión a los 90 día posinoculación (dpi) (Figura 4).

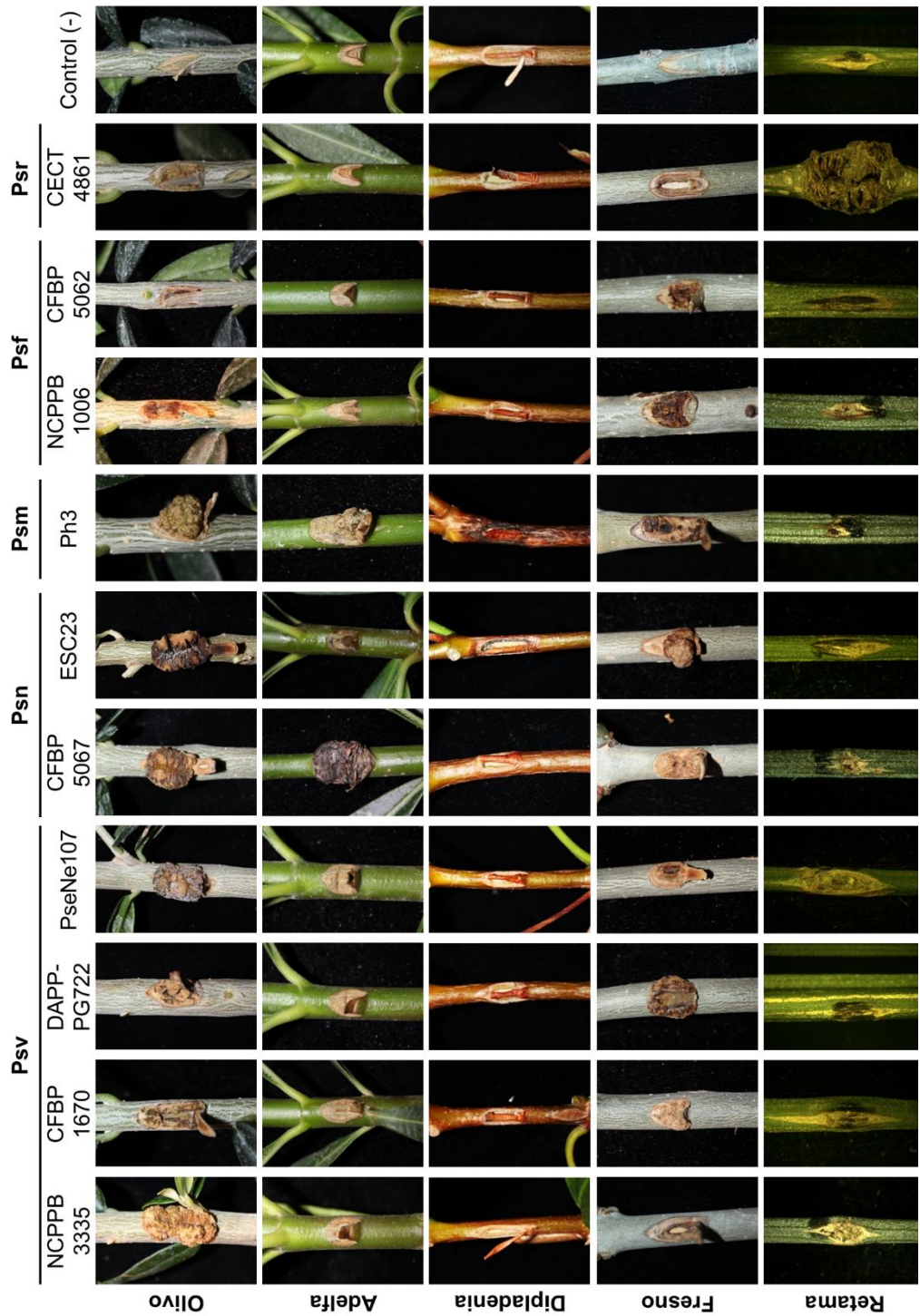


Figura 2. Ensayo de patogenicidad cruzada. Síntomas generados por las cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos en olivo, adelfa, dipladenia, fresno y retama a 90 días después de la inoculación. C-, control negativo, plantas inoculadas con MgCl₂ 10 mM. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente.

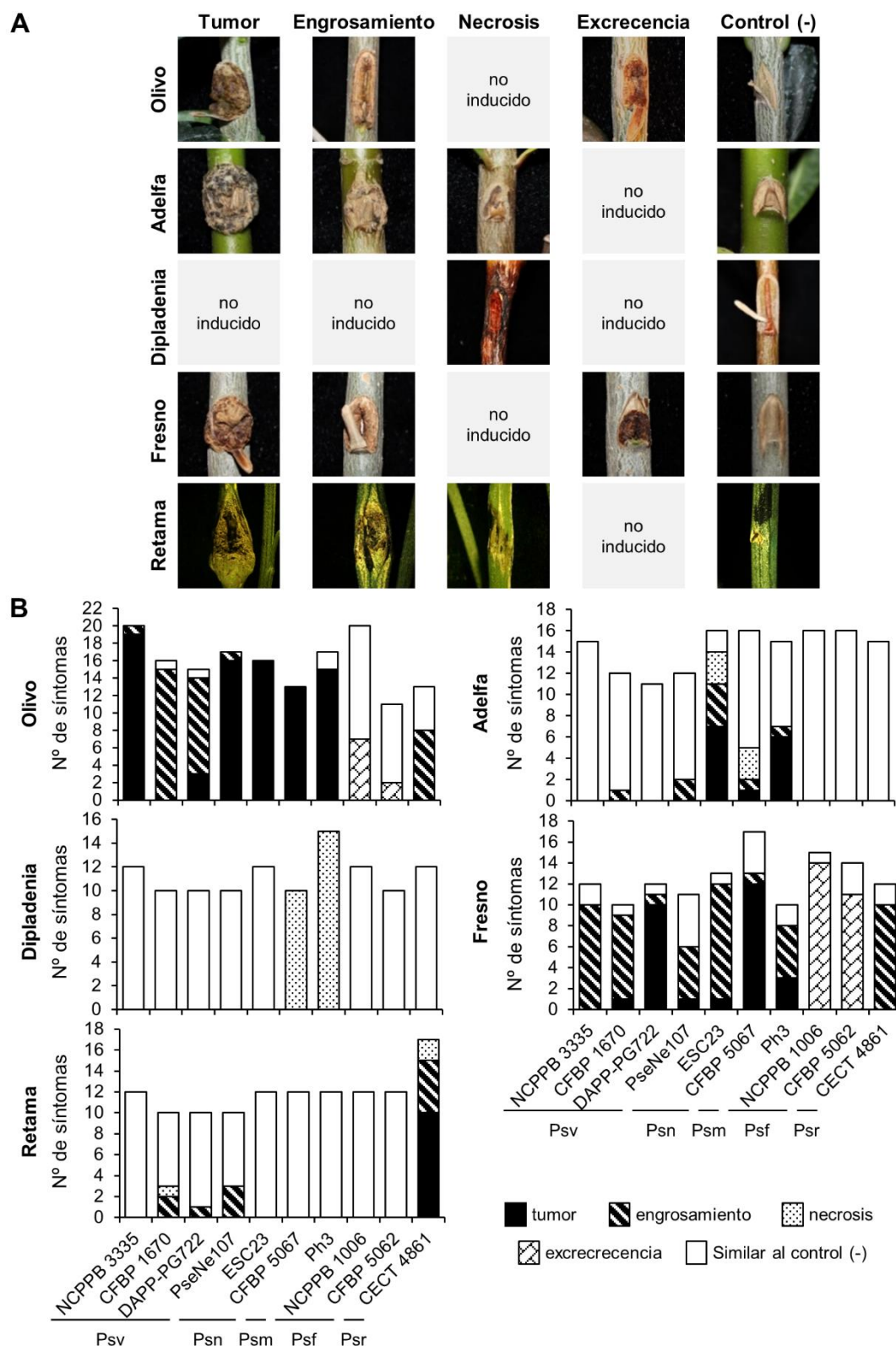


Figura 3. Ensayo de patogenicidad cruzada en cepas de *Pseudomonas savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos. (A) Diversidad de los síntomas generados por las cepas de *P. savastanoi* en olivo, adelfa, dipladenia, fresno y retama. Control (-), plantas inoculadas con $MgCl_2$ 10 mM. Los síntomas se observaron a 90 días posinoculación. (B) Número de puntos de inoculación que muestran cada uno de los diferentes síntomas generados por las cepas de *P. savastanoi* en cada planta huésped. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente.

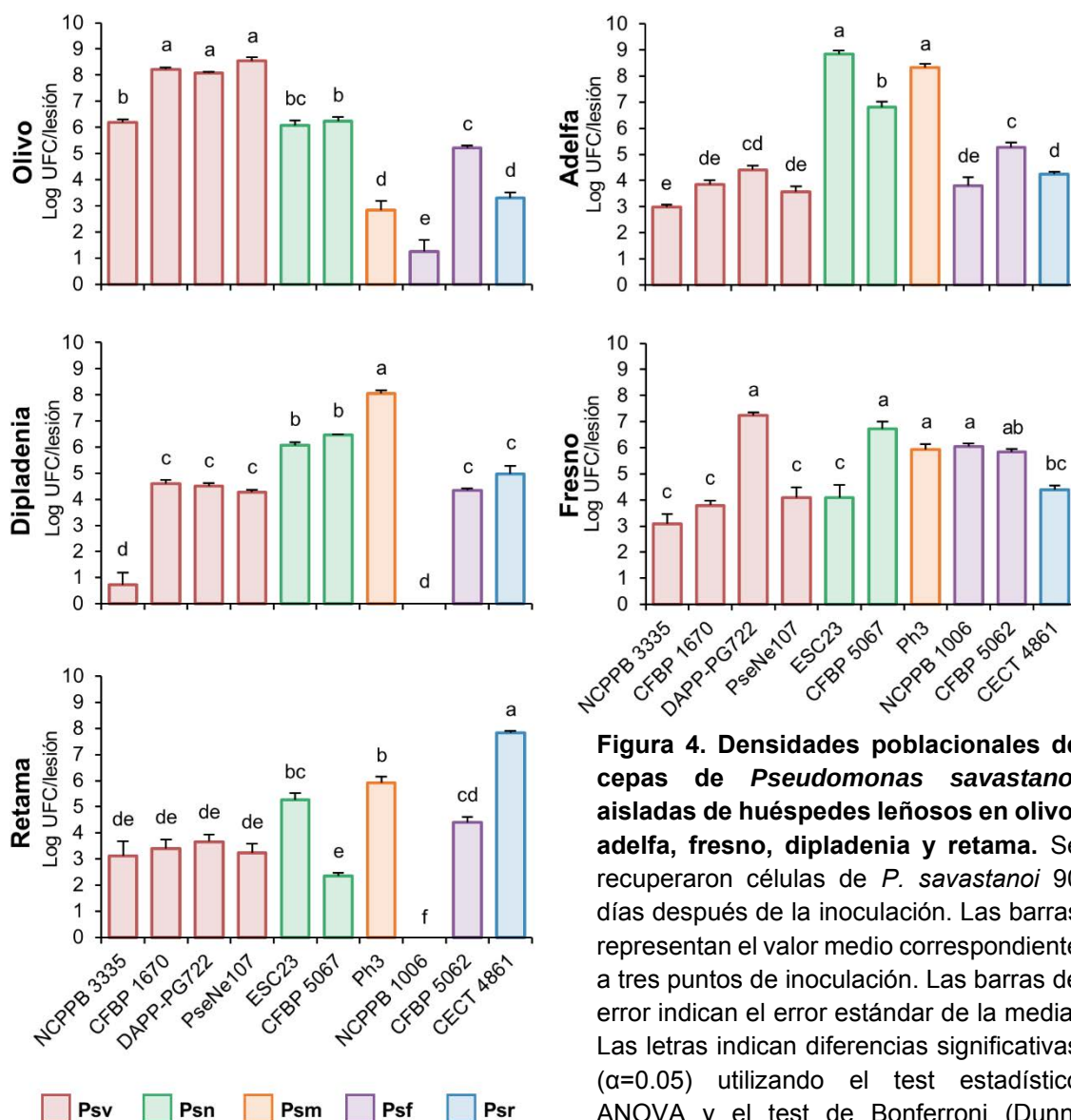


Figura 4. Densidades poblacionales de cepas de *Pseudomonas savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos en olivo, adelfa, fresno, dipladenia y retama. Se recuperaron células de *P. savastanoi* 90 días después de la inoculación. Las barras representan el valor medio correspondiente a tres puntos de inoculación. Las barras de error indican el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) utilizando el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) para las comparaciones múltiples.

Estos resultados coinciden con el estrecho rango de huésped descrito previamente para las cepas de *P. savastanoi* aisladas de retama (Álvarez *et al.*, 1998). En contraste, mientras que en plantas de olivo y adelfa infectadas con esta bacteria se observó un engrosamiento del tejido en la mayoría de los puntos inoculados (80% y 60%, respectivamente), en las plantas de adelfa y dipladenia infectadas no se observaron síntomas (Figuras 2 y 3). Sin embargo, en estos cuatro huéspedes los recuentos bacterianos fueron muy bajos (10^3 - 10^4 UFC/lesión) a 90 dpi (Figura 4), sugiriendo una reducción de la adaptación de las cepas de Psr a estos huéspedes.

En las plantas de fresno, las cepas Psf NCPPB 1006 y Psf CFBP 5062

produjeron la formación de excrecencias (engrosamientos necróticos) en la mayoría de los puntos inoculados (Figuras 2 y 3), donde alcanzaron densidades poblacionales en torno a 10^6 UFC/lesión (Figura 4). Además, se observaron excrecencias en aproximadamente una tercera parte de los puntos inoculados en las plantas de olivo, apoyando la habilidad previamente descrita que presentan los aislados de Psf de producir síntomas en este huésped (Janse, 1981; 1982; Iacobellis *et al.*, 1998). Sin embargo, las densidades poblacionales de los aislados de Psf recuperados de las plantas de olivo a 90 dpi varió mucho, desde 10^5 UFC/lesión (Psf CFBP 5062) hasta 10 UFC/lesión (Psf NCPPB 1006) (Figura 4). Aunque en las plantas de adelfa inoculadas con las cepas de Psf no se observaron síntomas, estas cepas alcanzaron densidades poblacionales de 10^4 - 10^5 UFC/lesión a 90 dpi en este huésped, lo que concuerda con los datos descritos previamente para otros aislados de Psf (Iacobellis *et al.*, 1998). No se observaron síntomas en las plantas de retama y dipladenia inoculadas con los aislados de Psf, obteniéndose recuentos poblacionales de la cepa Psf CFBP 5062 de 10^4 UFC/lesión en ambos huéspedes, mientras que de la cepa Psf NCPPB 1006 no se obtuvieron recuentos viables (Figura 4).

Los cuatro aislados de Psv produjeron síntomas visibles a los 90 dpi en las plantas de olivo y fresno, aunque los síntomas observados fueron variables y dependientes de cepa. Por ejemplo, las cepas Psv NCPPB 3335 y Psv PseNe 107 generaron tumores en las plantas de olivo, que fueron más necróticos en los puntos inoculados con esta última cepa, mientras que las cepas Psv CFBP 1670 y Psv DAPP-PG722 produjeron principalmente engrosamientos de los tejidos adyacentes a las lesiones. Aun así, todas las cepas alcanzaron densidades poblacionales de al menos 10^6 UFC/lesión a 90 dpi (Psv NCPPB 3335), encontrándose los valores más altos (10^8 UFC/lesión) en las plantas de olivo inoculadas con Psv PseNe107, Psv CFBP 1670 y Psv DAPP-PG722 (Figuras 2, 3 y 4). Estos resultados coinciden con la variación de la severidad de los síntomas dependiente de cepa y del cultivar del huésped descrita previamente para inoculaciones artificiales realizadas en plantas de olivo con cepas de Psv (Penyalver *et al.*, 2006). En las plantas de fresno inoculadas con cada una de estas

cuatro cepas se desarrollaron principalmente tumores (Psv DAPP-PG722) o engrosamientos (Psv NCPPB 3335, Psv PseNe 107 and Psv CFBP 1670). Cabe destacar que el número de bacterias más alto recuperado del fresno se obtuvo de las plantas infectadas con el aislado inductor de tumores Psv DAPP-PG722 (10^7 UFC/lesión), mientras que de las otras cepas de Psv se recuperaron en torno a 10^3 - 10^4 UFC/lesión a 90 dpi. Por el contrario, un reducido número de puntos inoculados en las plantas de adelfa y retama mostraron lesiones levemente engrosadas y no se observaron síntomas en las plantas de dipladenia infectadas con los aislados de Psv (Figuras 2 y 3). De hecho, las densidades poblacionales obtenidas tras los recuentos de los aislados de Psv en estas plantas fueron de 10^3 - 10^4 UFC/lesión a 90 dpi, destacando que el recuento obtenido de la cepa Psv NCPPB 3335 en las plantas de dipladenia fue inferior a 10 UFC/lesión (Figura 4).

Las cepas del patovar Psn ESC23 y CFBP 5067, produjeron una sintomatología variable en las plantas de adelfa, mientras que la mayoría de las plantas de adelfa inoculadas con Psn ESC23 desarrollaron tumores o engrosamientos a 90 dpi, solo unos pocos puntos inoculados con la cepa Psn CFBP 5067 mostraron síntomas (Figuras 2 y 3). Estos resultados coinciden con la incapacidad previamente descrita de algunos aislados de Psn de producir tumores en ciertos cultivares de adelfa (Janse, 1981). Cabe destacar que, las plantas de adelfa inoculadas con Psn CFBP 5067 mostraron síntomas secundarios, como engrosamiento de los botones florales, rizado de las hojas y la formación de pequeños tumores en las hojas (Figura 5), sugiriendo que se está produciendo una infección sistémica en las plantas de adelfa por este aislado de Psn. De hecho, las cepas de Psn alcanzaron los recuentos bacterianos más altos a 90 dpi en las plantas de adelfa, 10^7 UFC/lesión para la cepa Psn CFBP5067 y 10^9 UFC/lesión para Psn ESC23, mientras que los recuentos obtenidos en las plantas infectadas de olivo, fresno, retama y dipladenia fueron de 10^6 UFC/lesión, 10^4 - 10^6 UFC/lesión, 10^2 - 10^5 UFC/lesión y 10^6 UFC/lesión, respectivamente (Figura 4). Ambas cepas indujeron la formación de tumores necróticos en las plantas de olivo y pequeños engrosamientos en las plantas de fresno, mientras que no produjeron síntomas en las plantas de retama infectadas (Figuras 2 y 3). Cabe destacar que, aunque los

recuentos bacterianos obtenidos de estas cepas en las plantas infectadas de dipladenia eran estadísticamente iguales, se observó la producción de una necrosis muy leve en la mayoría de los puntos inoculados con la cepa Psn CFBP 5067, mientras que no se observaron síntomas en las plantas de dipladenia infectadas con Psn ESC23 (Figuras 2, 3 y 4).

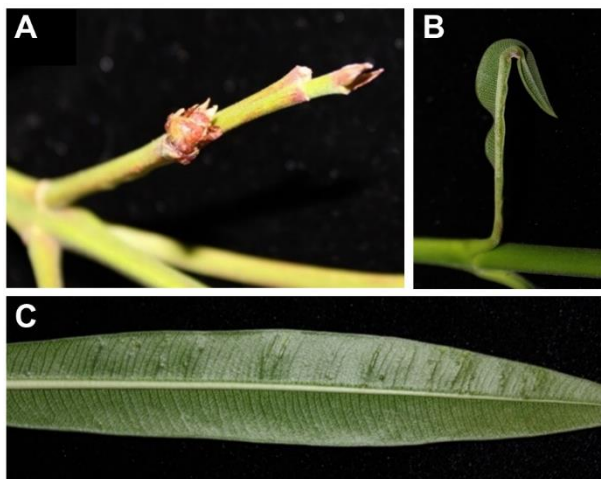


Figura 5. Desarrollo de síntomas secundarios causados por *P. savastanoi* pv. *nerii* CFBP 5067 en plantas de adelfa. Los síntomas se observaron a 90 días posinoculación. (A) Engrosamiento de un botón floral, (B) formación de pequeños tumores en las hojas y, (C) rizado de la hoja.

El aislado de dipladenia Ph3, produjo una necrosis muy agresiva que se extendió desde el punto de inoculación hacia el resto del tallo en la mayoría de los puntos inoculados en las plantas infectadas de dipladenia (Figuras 2 y 3). Este aislado también indujo la formación de tumores y engrosamiento en aproximadamente el 50% de los puntos inoculados en adelfa, lo que concuerda con lo descrito previamente (Eltlbany *et al.*, 2012). Además, produjo la formación de tumores y engrosamientos en la mayoría de los puntos inoculados en fresno y la formación de tumores no necróticos en las plantas de olivo (Figuras 2 y 3). Esto último, contrasta con los resultados obtenidos previamente en las inoculaciones realizadas en plantas de olivo en las que no se observaron síntomas a los 63 dpi (Eltlbany *et al.*, 2012). Las densidades poblacionales más altas se obtuvieron en las plantas infectadas de adelfa y dipladenia, en torno a 10^8 UFC/lesión en ambos huéspedes, mientras que, en las plantas de fresno y retama fueron de 10^6 UFC/lesión y en las plantas de olivo fueron de 10^3 UFC/lesión (Figura 4). No se observaron síntomas en las plantas de retama infectadas con el aislado de Ph3 (Figuras 2 y 3).

En resumen, los resultados obtenidos del ensayo de patogenicidad cruzada

aquí presentados para las 10 cepas de *P. savastanoi* aisladas de olivo, adelfa, fresno, retama y dipladenia, garantizan el uso de estos genomas para análisis comparativos genómicos dirigidos a la identificación de genes candidatos implicados en el rango de huésped de esta bacteria fitopatógena. Aunque, en general, nuestros resultados concuerdan con el rango de huésped previamente descrito para estos cuatro patovares bien definidos de huéspedes leñosos de *P. savastanoi* y el aislado de dipladenia, hemos encontrado que algunas cepas de Psv pueden ocasionalmente inducir la formación de leves engrosamientos en retama, que la cepa de Psv CECT 4861 induce la formación de síntomas visibles en la mayoría de puntos inoculados no solo en retama, sino también en olivo y fresno, y que el aislado de dipladenia produce la formación de tumores en olivo (Figuras 2 y 3).

La filogenia de las cepas aisladas de olivo y adelfa refleja una patogenicidad diferencial en estos dos huéspedes

Las cepas de Psv no se agruparon en un clado monofilético y dos cepas aisladas de adelfa se agruparon junto con cuatro de las seis cepas aisladas de olivo (Figura 1). Para confirmar su asignación a los patovares Psv y Psn, se examinó la patogenicidad en olivo y adelfa de las seis cepas de estos dos huéspedes no incluidas en el ensayo de patogenicidad que se muestra en la Figura 2.

En las plantas de olivo, las seis cepas indujeron la formación de tumores y engrosamientos de los tejidos en los puntos de inoculación, lo que concuerda con la habilidad previamente descrita de los aislados de Psv y Psn de infectar este huésped (Figura 6A, 6B). Aunque las cepas Psn ICMP 16944 e ICMP 13781 indujeron los tumores de mayor tamaño en las plantas de olivo, los recuentos bacterianos extraídos de estos tumores a 90 dpi fueron los más bajos (10^4 - 10^5 UFC/lesión) (Figura 6C). Además, Psn ICMP16944 y Psn ICMP13781 fueron las únicas cepas que indujeron la formación de tumores o engrosamientos en las plantas de adelfa, donde alcanzaron poblaciones bacterianas muy altas a 90 dpi

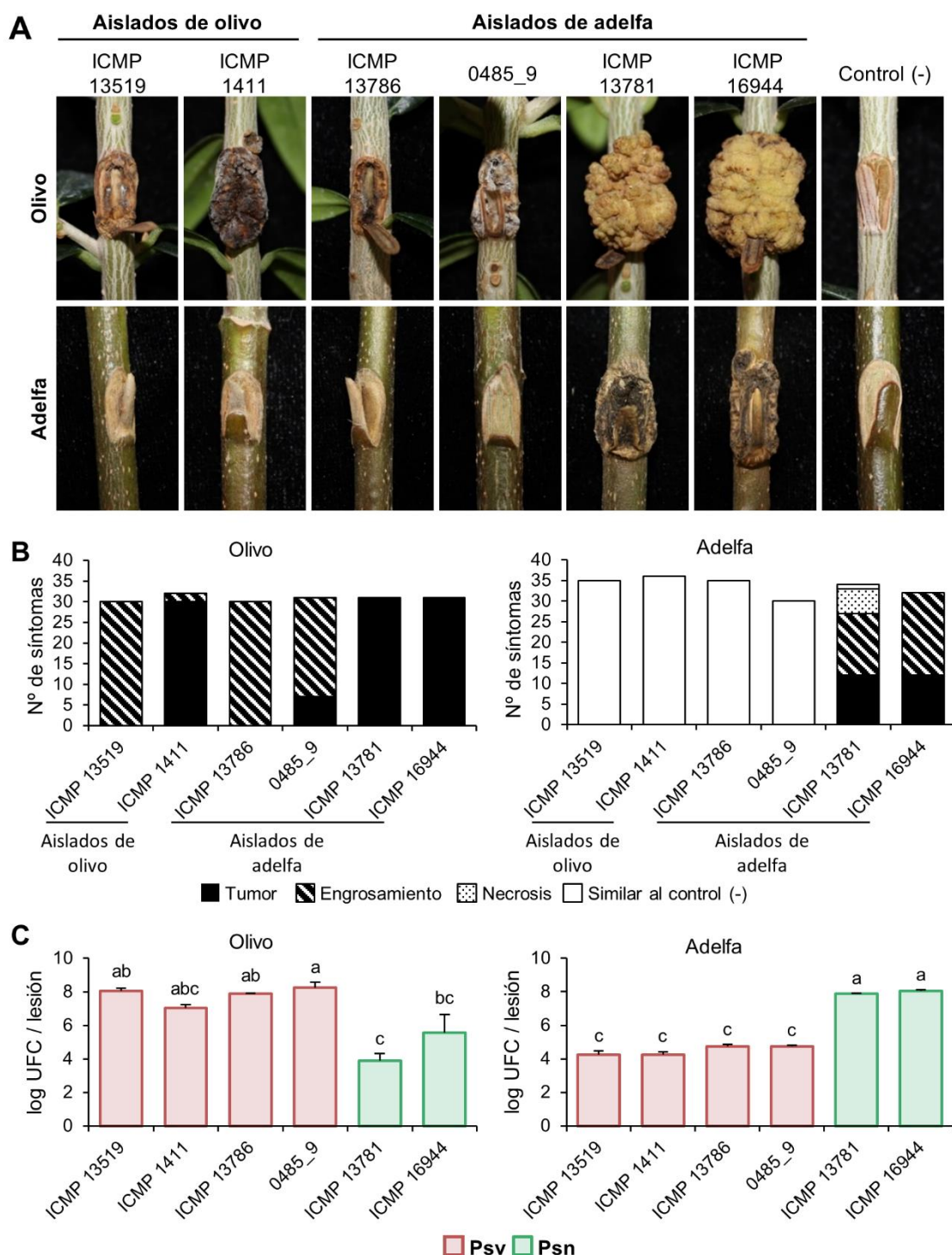


Figura 6. Ensayo de patogenicidad de las cepas secuenciadas después de 2017 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* y *nerii* en plantas de olivo y adelfa. (A) Síntomas generados por las cepas de *P. savastanoi* en plantas de olivo y adelfa 90 días posinoculación (dpi). Control (-), plantas inoculadas con $MgCl_2$ 10mM. **(B)** Número de puntos inoculados que muestran cada uno de los diferentes síntomas generados por las cepas de *P. savastanoi* en cada uno de los huéspedes. **(C)** Densidades poblacionales alcanzadas por las cepas de *P. savastanoi* en las plantas de olivo y adelfa a 90 dpi. Las barras representan el valor medio correspondiente a tres plantas. Las barras de error indican el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) utilizando el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) para las comparaciones múltiples.

(10^8 - 10^9 UFC/lesión). Por el contrario, las otras dos cepas aisladas de adelfa (ICMP 13786 y 0485_9) y las dos cepas aisladas de olivo, las cuales agrupaban en la misma rama del árbol filogenético (Figura 1), fueron virulentas en las plantas de olivo alcanzando tamaños poblacionales característicos de las cepas de Psv (10^7 - 10^8 UFC/lesión) (Figura 6C). Estas cepas, sin embargo, no produjeron ningún síntoma ni en los puntos de inoculación, ni en las flores, ni en las hojas de las plantas de adelfa infectadas, alcanzando densidades poblacionales muy bajas en este huésped (10^4 UFC/lesión) (Figura 6C). En resumen, las seis cepas indujeron la formación de tumores o excrecencias en las plantas de olivo (Figura 6A, 6B), como se ha descrito previamente para las cepas de Psv y Psn (Janse, 1981). Sin embargo, mientras que las cuatro cepas aisladas de adelfa incluidas en el grupo filogenético Psn pudieron infectar las plantas de adelfa, las otras dos cepas aisladas de adelfa que agrupaban en la misma rama del árbol filogenético con las cepas de olivo (ICMP 13786 y 0485_9), fueron capaces de causar enfermedad en olivo, pero no en adelfa. La baja supervivencia y los síntomas inducidos en las plantas de adelfa por las cepas ICMP 13786 y 0485_9 son similares al de las cepas de Psv y, por tanto, deben incluirse en el patovar *savastanoi*, aunque se aislaron de adelfa.

Sistemas de secreción

La codificación de los componentes estructurales y reguladores del T3SS, T4SS y T6SS en los 21 genomas de *P. savastanoi* se estudiaron con la herramienta web T346Hunter (Martínez-García *et al.*, 2015a).

Como en la cepa Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010), todos los genomas analizados codifican dos clústeres génicos diferentes del T3SS: la isla tripartita de patogenicidad (T-PAI) o sistema canónico, el T3SS más frecuente entre las cepas secuenciadas del complejo *P. syringae* (Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b), y un T3SS adicional parecido al que se encuentra en las especies de *Rhizobium* (R-PAI) (Figura 7) (Joardar *et al.*, 2005; Martínez-García *et al.*, 2015b). Aunque la mayoría de las proteínas codificadas en el clúster T-PAI mostraron un 100% de identidad entre los genomas analizados, se encontraron variaciones de

uno a dos aminoácidos en nueve de las 27 proteínas analizadas: HrpL, HrpQ, HrcR, HrpV, HrcC, HrpD, HrcJ, HrpZ y HrpR (Tabla 4). Cabe destacar que la mayoría de estas variaciones aminoacídicas son características de los patovares Psf y Psr, y de los grupos filogenéticos Psv-I, Psv-II y Psn-Psm de la Figura 1 (Tabla 4).

		T3SS_I-PAI	T3SS_R-PAI	T4SS-A	T4SS-B	T4SS-C	T6SS-I	T6SS-II
Psv	NCP PB 3335							
	ICMP 1411							
	DAPP-PG722							
	PseNe107							
	ICMP 4352							
	ICMP 13519							
	0485_9*							
	ICMP 13786*							
Psn	ESC 23							
	CFBP 5067							
	ICMP 16944							
	ICMP 13781							
Psm	Ph3							
Psf	NCP PB 1006							
	CFBP 5062							
	ICMP 9132							
	ICMP 9129							
	ICMP 7712							
Psr	CECT 4861							
	ICMP 16946							
	ICMP 16947							

Sistemas de secreción

Figure 7. Predicción bioinformática de los genes que codifican los sistemas de secreción tipo III (T3SS), tipo IV (T4SS) y tipo VI (T6SS). Las cajas negras indican codificación completa del conjunto de genes que conforman el core de estos sistemas; las cajas grises indican codificación parcial de los genes del core. La identificación de los sistemas de secreción se realizó con la herramienta web *T346Hunter* (Martínez-García *et al.*, 2015a). T-PAI (isla tripartida de patogenicidad), T3SS canónico; R-PAI, T3SS similar al de *Rizhobium*; T4SS-A (T4SS arquetipo de *Agrobacterium tumefaciens*), T4SS-B (T4SS arquetipo de *Salmonella enterica Typhimurium*), T4SS-C (isla genómica - GI - de *Haemophilus influenzae* 1056). Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente. Los asteriscos indican las cepas aisladas de adelfa incluidas en Psv (ver Figura 1).

Tabla 4. Reemplazos de aminoácidos en las proteínas estructurales y reguladoras del sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas savastanoi*.

Proteína	Patovar/grupo filogenético/cepa ^a	Reemplazos en la proteína		Aminoácido		Tipo de reemplazo ^c
		Nº	Posición	en Psv NCPPB 3335 ^b	reemplazado	
HrpL	Psr	1	63	His (H)	Gln (Q)	R
		2	38	Gln (Q)	Arg (R)	C
			106	Gly (G)	Glu (E)	R
HrpQ	Todas las cepas de <i>P. savastanoi</i> (excepto Psv-I)	1	195	His (H)	Arg (R)	R
HrcR	Psn-Psm	1	24	Leu (L)	Met (M)	C
HrpV	Psv-II y Psn-Psm	1	73	Phe (F)	Val (V)	R
HrcC	Psv-II y Psn CFBP5067	1	273	Gly (G)	Val (V)	R
		1	579	Val (V)	Leu (L)	C
		2	273	Gly (G)	Val (V)	R
			699	Lys (K)	Gln (Q)	C
			145	Ala (A)	Val (V)	R
HrpD	Psr	1	123	Pro (P)	Thr (T)	R
		1	123	Pro (P)	Thr (T)	R
HrcJ	Psf	1	80	Glu (E)	His (H)	C
HrpZ	Psv-II	1	4	Leu (L)	Phe (F)	R
HrpR	Psf	1	2	Ser (S)	Asn (N)	C

^aPsv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente. Grupos filogenéticos de la Figura 1: Psv-I (Psv NCPPB 3335, Psv IMCP 1411), Psv-II (Psv ICMP 4352, Psv PseNe107, Psv DAPP-PG722, Psv ICMP 13519, Psn 0485_9, Psn ICMP 13786), Psn-Psm (Psn ICMP 13781, Psn ESC23, Psn CFBP 5067, Psm Ph3).

^bSe utilizó el genoma de Psv NCPPB 3335 como referencia.

^cC (conservativo) y R (radical), reemplazos a un aminoácido con propiedades bioquímicas similares o diferentes al original, respectivamente.

Los T4SS son aparatos muy variables, situados en la membrana, compuestos de diversas unidades estructurales, y que median tanto la transferencia conjugativa de plásmidos y otros elementos móviles de DNA entre bacterias, como el transporte de proteínas efectoras a células eucariotas (Bi *et al.*, 2013). El set completo de genes que codifican el T4SS-A (genes *virB1-virB11* y *virD4*) descritos en el plásmido pPsv48B de la cepa Psv NCPPB 3335 (Bardaji *et al.*, 2011b), se encontró solo en trece de los genomas analizados (Figura 7). Los T4SS-A están compuestos por subunidades similares en composición y número a las del sistema arquetípico de *Agrobacterium tumefaciens*, y están implicados en la translocación de efectores y en la conjugación. Además, las 21 cepas portan un set incompleto del T4SS-B (genes *tra*) y del T4SS-C (genes *tfc*) (Figura 7). El T4SS-B está constituido por unidades similares al sistema arquetipo de *Legionella pneumophila* implicado en la translocación de efectores, mientras que el T4SS-C se

ha identificado en *Haemophilus influenzae* y está implicado en la propagación de islas genómicas (Juhas, 2015). Este último, no había sido previamente descrito en el complejo *P. syringae*.

Al igual que Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010), las 21 cepas de *P. savastanoi* analizadas codifican dos clústeres diferentes del T6SS, uno altamente similar al que se encuentra en Pph 1448A y otro homólogo al clúster T6SS *hcp1* de *P. syringae* pv. tomato (Pto) DC3000. Considerando la composición de ambos clústeres T6SS y otros genes cromosómicos adicionales, los 21 genomas contienen 12 de los 13 genes que constituyen el *core* del T6SS (Shrivastava and Mande, 2008), solo faltando el gen que codifica la proteína VCA0112, que contiene un dominio FHA (*Fork-head associated*) (Figura 7). Aunque los estudios iniciales de T6SS en bacterias fitopatógenas tenían como objetivo comprender el papel de este sistema de secreción en la virulencia, los análisis posteriores han demostrado que el T6SS desempeña en *P. syringae* un papel importante en la competencia entre bacterias (Bernal *et al.*, 2018).

Distribución de los efectores del T3SS en los patovares de *P. savastanoi*

El efectoroma de *P. savastanoi* (100% de los genomas analizados) codifica 43 T3E previamente descritos en el complejo *P. syringae* (Figura 8), entre los que se incluyen versiones truncadas de algunos T3E. Estos T3E están distribuidos en 37 familias según la base de datos *Hop Database* (www.pseudomonas-syringae.org), o 33 según la reciente actualización de las familias de T3E de *P. syringae* (Dillon *et al.*, 2019a). Los T3E truncados se analizaron y se asignaron en grupos en base a su extensión (Figura 9). Todas las cepas contienen las mismas versiones truncadas de *hopAZ1*, *hopAA1* y *hopM1*. Por el contrario, se han encontrado variantes alélicas de T3E codificadas exclusivamente en patovares específicos y, por lo tanto, posiblemente implicadas en la especificidad de huésped. Entre ellas se incluyen aquellas que solo se han encontrado en cepas de Psn y Psm (*avrPto1*, *hopAT1* y *hopA2*), de Psr (*hopAF1-2* y *hopAO1*) o en el aislado de dipladenia Ph3 (*hopAS1*, *hopBL1* y *hopBL2*). Además, aunque todas las cepas de Psv, Psn y la cepa Psm Ph3 codifican el CDS completo de *avrRpm2*, las cepas de Psr y Psf codifican

una versión truncada de este gen o no lo contienen. Truncamientos específicos que afectan solo a una cepa también se identificaron en *hopA2*, *hopAF1-1*, *hopAO1* y *hopW1* (Figura 9).

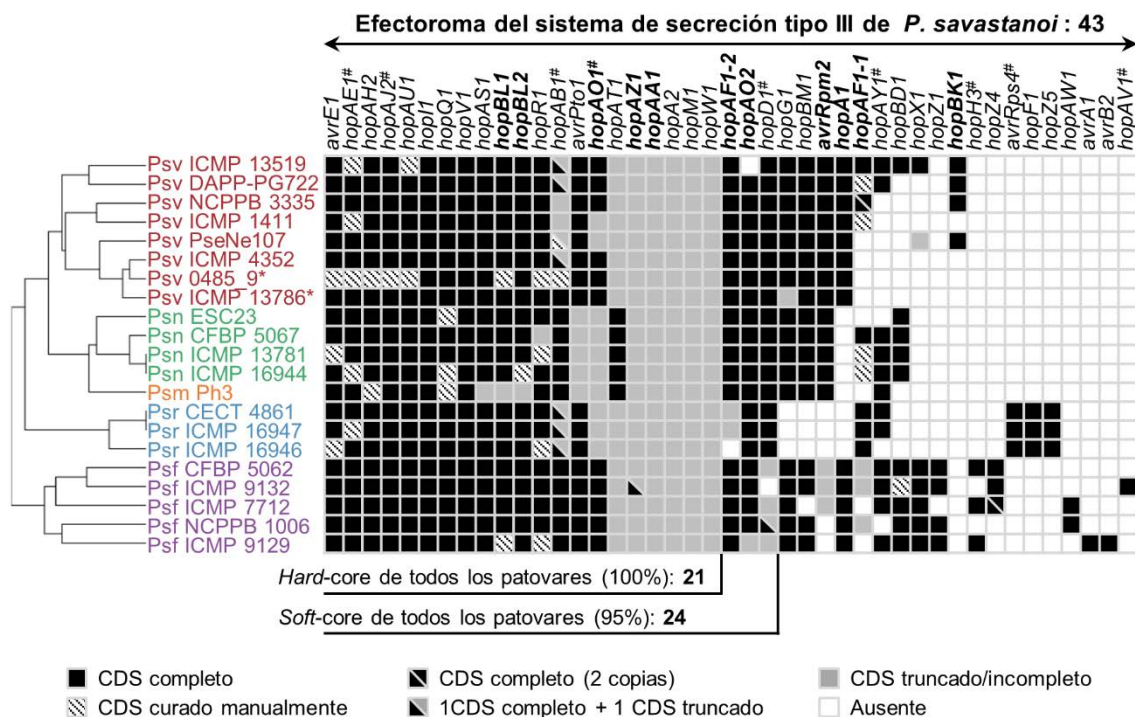


Figura 8. Distribución y agrupación jerárquica de los efectores conocidos del sistema de secreción de tipo III (T3E) en los patovares de *Pseudomonas savastanoi* aislados de huéspedes leñosos. Los nombres de los T3E designados con las mismas letras pertenecen a la misma familia; los números indican las subfamilias (Lindeberg *et al.*, 2005). Los T3E en negrita son aquellos cuya translocación se ha demostrado previamente (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). Las almohadillas indican familias de T3E que se fusionan como nuevas familias (*hopAE/hopW=hopW*, *hopAB/hopAY=hopAB*, *hopAO/hopD=hopD* y *hopK/avrRps4=hopK*) o alelos de T3E que establecen nuevas familias de T3E (*hopAJ2=hopBV*, *hopH3=hopBQ* y *hopAV1=hopBS*) de acuerdo al reciente estudio realizado por Dillon *et al.* (2019a). Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares *savastanoi*, *nerii*, *mandevillae*, *fraxini* y *retacarpa*, respectivamente. Los asteriscos indican las cepas aisladas de adelfa incluidas en Psv (ver Figura 1). Core, conjunto de T3E comunes al 100% de los genomas (*hard-core*) o al 95% de los genomas (*soft-core*); CDS (*coding sequence*), marco abierto de lectura. La agrupación jerárquica en base al contenido de T3E que se muestra a la izquierda de la figura y se generó utilizando el software Morpheus.

Se identificaron dos nuevos posibles T3E (Tabla 5) cuya secuencia es diferente a la de los T3E previamente descritos, aunque codifican un promotor con una caja *hrp*, característica de los genes regulados por HrpL (Fouts *et al.*, 2002). Además, estos dos genes codifican proteínas que cumplen al menos dos de las tres características de las señales de secreción N-terminal que presentan los T3E (Lindeberg *et al.*, 2005). El gen que codifica la proteína WP_032074452, que

contiene un dominio DUF72 (289 aminoácidos), se encontró en los 21 genomas de *P. savastanoi*, mientras que ortólogos de la proteína hipotética (HP) WP_057446723 (304 aminoácidos) se encontraron exclusivamente en los genomas de Psr (Tabla 5).

Tabla 5. Nuevos posibles efectores del sistema de secreción tipo III identificados en *P. savastanoi*.

Número de acceso ^a	ID de la proteína	Anotación	Dominio Pfam ^b	Tamaño (aa)	Valor <i>hrp</i> ^c	Señal T3SS ^d			Ortólogos ^e				
						A	B	C	Psv	Psn	Psm	Psf	Psr
PSA3335_RS11510	WP_032074452	Proteína con dominio DUF72	PF01904	289	2577	+	+	+	+	+	+	+	+
B7R56_RS15315	WP_057446723	Proteína hipotética	Ninguno	304	2558	+	-	+	-	-	-	-	+

+ = presencia, - = ausencia

^aNúmero de acceso en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). PSA3335_RS11510 y B7R56_RS15315 corresponden con genes de los genomas de Psv NCPPB 3335 y Psr CECT 4861, respectivamente.

^bBase de datos Pfam (<https://pfam.xfam.org/>).

^cValor *hrp*, variable utilizada para la identificación de cajas *hrp* en las regiones promotoras, 500 nucleótidos antes del inicio del gen.

^dPredicción de la señal de secreción N-terminal de los T3E. A, alto porcentaje de serinas en los primeros 50 aminoácidos; B, una isoleucina, leucina, valia, alanina o prolina en la tercera o cuarta posición del extremo N-terminal; C, ausencia de residuos ácidos dentro de los 12 primeros aminoácidos (Lindeberg *et al.*, 2005).

^ePsv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares *savastanoi*, *nerii*, *mandevillae*, *fraxini* y *retacarpa*, respectivamente. En Psv se incluyen las cepas 0485_9 e ICMP 13786 aisladas de adelfa.

Mediante la agrupación jerárquica en base al contenido de T3E identificados se obtuvieron 3 clústeres principales compuestos por i) todos los genomas de Psf (cluster Psf), ii) todos los genomas de Psr (cluster Psr) y iii) todos los genomas de Psv, Psn y el aislado Ph3 de *dipladenia* (cluster Psv-Psn-Psm) (Figura 8). El cluster Psv-Psn-Psm está dividido en dos subgrupos, uno que comprende las ocho cepas de Psv y otro que comprende las cuatro cepas de Psn y el aislado Psm Ph3 (Figura 8). La cepa Psm Ph3 aparece sola en una subrama del subgrupo Psn-Psm. Por lo tanto, la agrupación de los genomas de *P. savastanoi* en base a su contenido en genes codificantes de T3E es similar a la filogenia generada mediante MLSA (Figura 1), lo que indica que cada uno de los cinco patovares codifican conjuntos característicos de T3E que podrían contribuir a definir su especificidad de huésped.

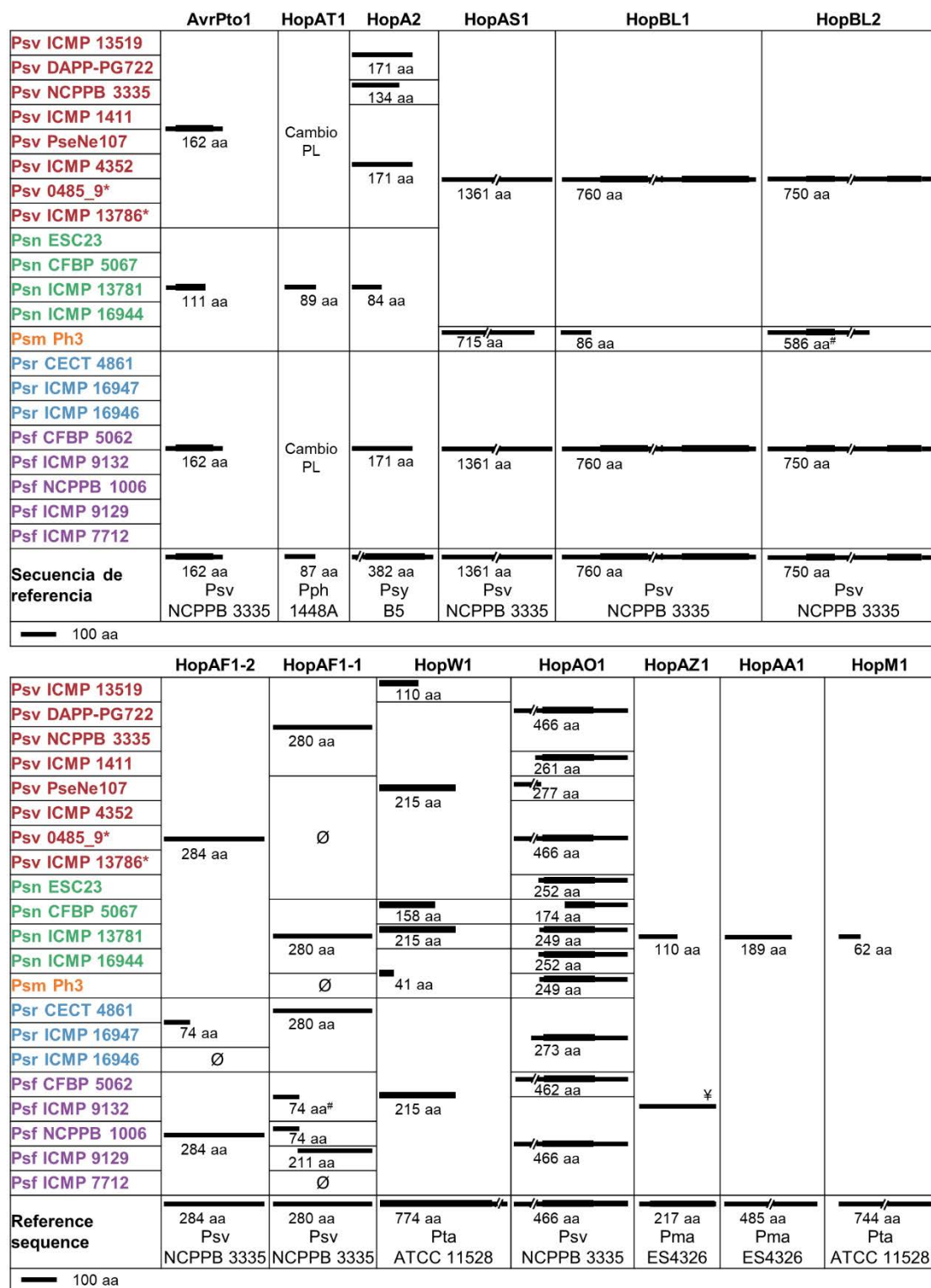


Figura 9. T3E truncados en las cepas de *P. savastanoi*. Las líneas negras representan la longitud de la secuencia del producto del T3E deducido y las cajas negras dominios proteicos Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) o HHPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>). Ø, indica la ausencia de la secuencia. Cambio PL, cambio en la pauta de lectura. #, indica que el efector *hopAF1-1* está truncado en las cepas Psf CFBP 5062 y ICMP 9132 por la inserción de un elemento similar a IS5 de la cepa *Pseudomonas syringae* Ps25, y que el efector *hopBL2* está truncado en la cepa Psm Ph3 por la inserción del elemento IS52 de *P. savastanoi*. *Psf ICMP 9132 codifica una copia completa del efector *hopAZ1*; sin embargo, la proteína codificada no

contiene el dominio funcional presente en la secuencia de referencia. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares *savastanoi*, *nerii*, *mandevillae*, *fraxini* y *retacarpa*, respectivamente. Los asteriscos indican las cepas aisladas de adelfa incluidas en Psv (ver Figura 1). Pma, Psy y Pta significan *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, respectivamente.

En todos los genomas de *P. savastanoi* se encontraron 21 T3E constituyendo el *core* del efectoroma, es decir, codificados como CDS completos o versiones truncadas en todos los genomas analizados. Además, tres T3E adicionales (*hopAF1-2*, *hopAO2* and *hopD1*) se encontraron en 20 de los 21 genomas analizados (95%) y estos se incluyeron en el *soft-core* del efectoroma. También se identificaron nueve T3E que podrían contribuir a la especificidad de huésped: *avrRps4*, *hopF1* y *hopZ5* presentes exclusivamente en Psr; *hopG1*, que solo está ausente en las cepas de Psr; *hopAS1*, *hopBL1* y *hopBL2*, que solo están truncados en la cepa aislada de dipladenia Psm Ph3; y por último, el CDS completo de *hopAT1* y la versión truncada de *avrPto1*, que solo están presentes en Psn y en la cepa Psm Ph3, únicas cepas capaces de infectar adelfa (Figuras 8 y 2). Los T3E identificados solo en cepas de un patovar pero que no están presentes en todas las cepas del mismo, por lo que probablemente no tengan un papel relevante en la especificidad de huésped, son: *hopBK1* (cepas de Psv), *hopZ1*, *hopH3*, *hopZ4*, *hopAW1*, *avrA1*, *avrB2* and *hopAV1* (cepas de Psf).

DISCUSIÓN

Los métodos de análisis genómicos ofrecen una resolución sin precedentes para analizar la diversidad de cepas y las relaciones evolutivas dentro del complejo *P. syringae*, además de identificar genes que podrían estar involucrados en la patogenicidad y la definición del rango de huésped (Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011; Bartoli *et al.*, 2015; Monteil *et al.*, 2016; Baltrus *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019a; Dillon *et al.*, 2019b). Sin embargo, comprender el significado biológico de las diferencias genómicas observadas, depende de la disponibilidad de datos experimentales que confirmen fenotipos específicos, como la virulencia y el rango de huésped (Baltrus and Orth, 2018). De hecho, en un estudio reciente se probaron más de cien cepas en 15 huéspedes diferentes, y se demostró que, a diferencia de lo que se pensaba, el rango de huésped en *P. syringae* es un continuo superpuesto, en el que cepas pertenecientes al mismo FG e incluso al mismo patovar muestran desde pequeñas a grandes variaciones en el rango de huésped (Morris *et al.*, 2019). En este trabajo los análisis bioinformáticos de las 21 cepas de *P. savastanoi* aisladas de huéspedes leñosos, se combinaron con pruebas de patogenicidad cruzada, apoyando la identificación de genes del T3SS con un posible papel en la definición del rango de huésped. Esta combinación de análisis bioinformáticos y funcionales ha resultado fundamental para garantizar una correcta asignación de las cepas a sus patovares y fortalecer la relevancia de los resultados comparativos obtenidos.

De las 21 cepas de *P. savastanoi* incluidas en los análisis bioinformáticos, la patogenicidad de las cepas de Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a) y DAPP-PG722 (Hosni *et al.*, 2011) en plantas de olivo se había estudiado ampliamente. Otras cepas usadas en este estudio cuya patogenicidad en su huésped de aislamiento se había descrito previamente son Psv ICMP 4352 (NCPPB 639) (Janse, 1982; 1991), Psv ICMP 1411 (NCPPB 1344) (Pérez-Martínez *et al.*, 2007), Psn CFBP 5067 (NCPPB 3278) (Janse, 1991), Psn ESC23 (Tegli *et al.*, 2011; Cerboneschi *et al.*, 2016), Psf CFBP 5052 (ICMP 7711) (Iacobellis *et al.*, 1998), Psr CECT 4861 (Álvarez *et al.*, 1998) y Psm Ph3 (Eltibany *et al.*, 2012; Caballo-Ponce, 2017). Sin embargo, no existían datos disponibles

sobre la patogenicidad de las 13 cepas restantes, que se asignaron a un patovar de *P. savastanoi* (Tabla 1) en función de su huésped de aislamiento y, en algunos casos, en base a pruebas bioquímicas.

Las pruebas de patogenicidad cruzada realizadas con nueve de las cepas de *P. savastanoi* en plantas de olivo, adelfa, fresno y retama (Figuras 2, 3 y 4) concuerdan con el rango de huésped de los cuatro patovares de *P. savastanoi* bien establecidos aislados de huéspedes leñosos. En los ensayos de patogenicidad cruzada se incluyó también la cepa Psm Ph3 y su huésped de aislamiento, la planta de dipladenia, observándose un rango de huésped único para esta cepa. Los resultados obtenidos apoyan el uso de estos genomas para realizar análisis genómicos comparativos dirigidos a la identificación de genes implicados en la definición del rango de huésped. También se mostró que los aislados de Psv, Psn y Psf muestran diferencias en su virulencia y en su capacidad de crecimiento y supervivencia en los tejidos vegetales. Estos resultados concuerdan con la variabilidad observada en la virulencia de cepas de Psv en diversos cultivares de olivo (Penyalver *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2017), y para las cepas de Psv, Psn y Psf en plantas de olivo, adelfa y fresno (Janse, 1991; Iacobellis *et al.*, 1998). Los síntomas generados por Psm Ph3 en olivo difieren de los mencionados, como datos no publicados, por Eltlbany *et al.* (2012), y concuerdan con los descritos en (Caballo-Ponce, 2017). Por el contrario, los síntomas generados por Psm Ph3 en adelfa, difieren de los descritos en (Caballo-Ponce, 2017) y concuerdan con los mencionados por (Eltlbany *et al.*, 2012). Se sabe que, entre otros factores, la edad y el cultivar contribuyen a la generación de síntomas inducidos por inoculaciones artificiales de *P. savastanoi* en olivo (Penyalver *et al.*, 2006), por lo que las diferencias observadas podrían atribuirse a la selección de distintos cultivares y/o edad de las plantas. Además, se mostró que la gravedad de los síntomas no siempre está correlacionada con la densidad poblacional alcanzada por *P. savastanoi* en la planta. Por ejemplo, aunque la cepa Psn CFBP 5067 indujo la formación de tumores en los puntos inoculados de las plantas de olivo y fresno, pero no de adelfa (Figuras 2 y 3), esta cepa pudo moverse sistémicamente por los tejidos de adelfa alcanzando su densidad poblacional más alta en este huésped

(Figura 4), independientemente de su habilidad de causar síntomas visibles en otros huéspedes.

En el análisis filogenético las cepas de Psv, Psn, Psm, Psf y Psr se agruparon en una rama discreta en el árbol MLSA (Figura 1), lo que concuerda con los estudios previos publicados (Eltlbany *et al.*, 2012; Gomila *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019b). La agrupación del aislado de Ph3 con las cepas de Psn coincide con lo previamente descrito y apoya la hipótesis de que el agente causal de la enfermedad bacteriana de la dipladenia podría haberse originado en el sur de Francia a partir de plantaciones de adelfas infectadas cercanas a las empresas productoras de dipladenia (Eltlbany *et al.*, 2012). Los patovares Psv, Psn, Psf y Psr correspondieron con linajes genéticos bien definidos que indican distintos eventos evolutivos que conducen a la especialización del huésped, aunque es necesario hacer dos consideraciones. La primera, los genomas de Psv están distribuidos en dos clados separados, agrupándose con los genomas de Psr (Psv I) o Psn-Psm (Psv-II) (Figura 1). El hecho que cepas de un mismo patovar se distribuyan en linajes genéticos diferentes no resulta sorprendente (Gironde and Manceau, 2012; Martín-Sanz *et al.*, 2012; Martín-Sanz *et al.*, 2013; Hulin *et al.*, 2018), dado que los patovares se definen por causar síndromes distintivos y no necesariamente por su relación genética (Young *et al.*, 1992). Con organismos poco relacionados, este fenómeno generalmente se interpreta como evolución convergente, pero en este caso particular, una explicación probable y atractiva es que la capacidad de producir tumores en el olivo sea ancestral a estos cinco patovares. Durante la evolución, esta capacidad solo se habría conservado en los dos linajes de Psv y en las cepas de Psn y Psm, aunque las cepas de Psr y Psf aún puedan inducir engrosamiento o excrecencias en el olivo, respectivamente (Figura 3). Dado que las cepas de *P. savastanoi* pueden causar tumores en diversas especies de plantas (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a), es posible que los dos linajes genéticos de Psv puedan mostrar diferentes rangos de huésped. De hecho, y aunque nosotros no hemos encontrado diferencias destacables en el rango de huésped de las cepas de Psv en olivo, adelfa, fresno, retama y dipladenia (Figuras 2, 3 y 4), ensayos de patogenicidad en 15 huéspedes herbáceos y leñosos

muestran que el rango de huésped de Psv PseNe107 (Psv II) es más amplio que el de Psv NCPPB 3335 (Psv I) (Morris *et al.*, 2019). La segunda consideración relevante para tener en cuenta es que las cepas de Psv agruparon con dos cepas aisladas de adelfa (Figura 1). Estas dos cepas presentaron también un repertorio de T3E, incluyendo las versiones truncadas de los T3E, más parecido al de las cepas de Psv que al de las cepas de Psn (Figuras 8 y 9). Además, la capacidad de estas cepas (0485_9 e ICMP 13786) de causar tumores en olivo pero no en adelfa, y su mejor supervivencia en los tejidos de olivo que de adelfa (Figura 6), garantizan su clasificación inequívoca como cepas de Psv (Janse, 1982).

Los 21 genomas de *P. savastanoi* analizados contienen genes implicados en la biosíntesis del T4SS (Figura 7), uno de los cinco sistemas principales de secreción en las bacterias Gram (-). Aunque todos los genomas contienen genes pertenecientes a los tres subtipos del T4SS (A, B y C), solo se ha encontrado completo el conjunto de genes que componen el T4SS-A en 13 cepas de las 21 analizadas. El T4SS-A está implicado en la conjugación, evento que aumenta la plasticidad genómica y ayuda a los microorganismos a adaptarse a los cambios en su entorno (Wallden *et al.*, 2010), lo que puede proporcionar una ventaja a las cepas que codifiquen un T4SS-A funcional. La ausencia de ciertos genes del T4SS-A y T4SS-B encontrada en los 21 genomas de *P. savastanoi* ya se había descrito previamente para cepas de *P. savastanoi* y del complejo *P. syringae* (Zhao *et al.*, 2005; Pérez-Martínez *et al.*, 2008). En los 21 genomas analizados se han encontrado genes que codifican el T4SS-C, descrito por primera vez como una isla genómica en *Haemophilus* spp. que desempeña un papel clave en la conjugación de plásmidos (Juhas *et al.*, 2007). Hasta donde sabemos, la codificación de genes del T4SS-C en cepas del complejo *P. syringae* no se ha descrito antes. Se requieren investigaciones adicionales para determinar el papel de los T4SS de *P. savastanoi* en la conjugación y movilización de plásmidos y la translocación de proteínas efectoras a las células del huésped.

Las 21 cepas de *P. savastanoi* presentan todos los genes esenciales que codifican el T6SS excepto el gen *VCA0112*. Aunque este gen se ha descrito como

un componente esencial para la activación del T6SS en *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, no se encuentra presente en más de la mitad de los T6SS identificados bioinformáticamente (Boyer *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que en *Acinetobacter baylyi* y en *Edwardsiella tarda* la ausencia de este gen no afecta ni a la actividad ni a la funcionalidad del T6SS en estas especies (Ho *et al.*, 2014). En las 21 cepas analizadas de *P. savastanoi*, la mayoría de los genes que codifican el T6SS se distribuyen en dos clústeres génicos, uno similar al presente en la cepa Pph 1448A y el otro similar al clúster *hcp1* o HSI-I de Pto DC3000, tal y como se ha descrito previamente para la cepa Psv NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). Del T6SS identificado en Pph 1448A no existe información sobre su funcionalidad o su papel en virulencia (Sarris *et al.*, 2010), mientras que del T6SS de Pto DC3000 se ha descrito que juega un papel muy importante en la competición frente a bacterias y microbios eucarióticos que se encuentran comúnmente en el suelo y las superficies de las plantas, como son las levaduras y las amebas (Haapalainen *et al.*, 2012). Sin embargo, el clúster esencial para la funcionalidad del T6SS en Pto DC3000 es el *hcp2* o HSI-II, el cual contiene un gen homólogo a la proteína VCA0112 (*fha*) (Haapalainen *et al.*, 2012), ausente en las cepas de *P. savastanoi*. El clúster *hcp1* se piensa que podría tener un papel menor en la competición frente a levaduras (Haapalainen *et al.*, 2012), y aunque su papel en *P. savastanoi* no está descrito, podría jugar un papel similar.

Los 21 genomas analizados contienen los genes que codifican el T3SS canónico (T-PAI), el tipo de T3SS más común en el complejo *P. syringae* y presente en todas las cepas aisladas de cultivos agrícolas (Dillon *et al.*, 2019). Se ha descrito que cepas de los patovares Psv y Psn la presencia de un T-PAI funcional es esencial para la inducción de tumores en sus respectivos huéspedes, así como para la inducción de la respuesta de hipersensibilidad (HR) en huéspedes resistentes (Matas *et al.*, 2014; Biancalani *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). El papel del T3SS de Psm Ph3 en la producción de HR en tabaco se comprobó mediante la expresión heteróloga de *avrRpt2* (Caballo-Ponce, 2017). Aunque en las cepas de Psf y Psr la funcionalidad de este sistema no se ha demostrado experimentalmente, considerando la alta identidad mostrada en el clúster T-PAI

T3SS en los 21 genomas (Tabla 4), también se podría esperar un papel similar en la patogénesis en estos dos patovares. Como se ha descrito para una gran fracción de cepas de *P. syringae* pertenecientes a los FG primarios (Dillon *et al.*, 2019b), todos los genomas de *P. savastanoi* también presentan un segundo T3SS tipo R-PAI (Figura 7), cuyo papel durante el ciclo de vida de las cepas del complejo *P. syringae* queda por dilucidar.

El repertorio de T3E en las cepas del complejo *P. syringae* varía en número de cuatro, en cepas del FG9, hasta casi 50 en cepas del FG1 (Dillon *et al.*, 2019b), y se ha descrito que la media de T3E en las cepas de huéspedes leñosos es 29 (Nowell *et al.*, 2016). De acuerdo con estos resultados, hemos encontrado que las cepas de *P. savastanoi* codifican de 28 a 35 T3E. Como esperábamos, los únicos tres T3E presentes en el *core* de las cepas de los FG primarios del complejo *P. syringae* (*avrE1*, *hopAA1* y *hopAJ2*) y el T3E ampliamente distribuido *hopM1* (Dillon *et al.*, 2019b), están también presentes en el *core* de T3E de *P. savastanoi*. Las cepas de *P. savastanoi* también codifican varios de los T3E que han sido asociados con huéspedes leñosos, como son, los pertenecientes al *core* *hopAO1*, *hopBL1* y *hopBL2*, y *hopAY1*, *hopH3*, *hopZ5* y *hopAF1-1* (Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b) (Figura 8). Además, los 21 genomas codifican *hopAN1* y *hopJ1*, presentes en los 11 FG del complejo *P. syringae*, pero que recientemente han dejado de considerarse T3E y se han reclasificado como proteínas translocadoras (*helpers*) de los T3E a la célula vegetal (Dillon *et al.*, 2019b).

Se sabe que los T3E juegan un papel esencial en la determinación de la especificidad de huésped en el complejo *P. syringae*, tanto a nivel de especie-patovar como de raza-cultivar (Collmer *et al.*, 2000; Fouts *et al.*, 2003; Cunnac *et al.*, 2009; Lindeberg *et al.*, 2009; Mansfield, 2009), por lo tanto, es esencial identificar posibles T3E que puedan explicar las diferencias encontradas en el rango de huésped de estos patovares. Para ello buscamos los T3E cuya presencia o ausencia fuese exclusiva de un patovar específico. Solo las tres cepas de Psr codifican *avrRps4*, *hopF1*, *hopZ5* y el nuevo posible T3E aquí identificado,

B7R56_RS15315. Adicionalmente, estas cepas carecen de *hopG1*, un gen encontrado en las 18 cepas restantes. Se ha descrito que estos cuatro T3E conocidos contribuyen a la virulencia de las cepas de *P. syringae*, pero también funcionan como factores de avirulencia en soja y *Arabidopsis* (*avrRps4*), en judía (*hopF1*), en *Arabidopsis* (*hopZ5*) y en cerezo (*hopG1*) (Hinsch and Staskawicz, 1996; Tsiamis *et al.*, 2000; Jayaraman *et al.*, 2017; Hulin *et al.*, 2018). Considerando el estrecho rango de huésped de las cepas de Psr y la inhabilidad de las cepas de Psv, Psn, Psm y Psf de infectar las plantas de retama, podría ser posible que *avrRps4*, *hopF1* y *hopZ5* contribuyan a la virulencia de Psr en las plantas de retama, y al mismo tiempo, funcionen de proteínas de avirulencia en los otros cuatro huéspedes de *P. savastanoi*. Además, las cepas de Psr carecen de *hopG1* y *hopAF1-2*, o codifican una proteína truncada HopAF1-2 que carece del dominio catalítico (Figura 9). Por lo tanto, la ausencia de estos T3E podría estar relacionada con su reconocimiento por genes de resistencia en retama.

Aunque no encontramos T3E exclusivos de Psn, las cepas de este patovar codifican un truncamiento 3' de *avrPto1* (Figura 9). Teniendo en cuenta que las mutaciones puntuales que afectan a la región C-terminal de AvrPto eliminan la avirulencia en tabaco (Shan *et al.*, 2000), el truncamiento específico en Psn podría prevenir la avirulencia en adelfa. Otras variantes alélicas de Psn posiblemente involucradas en la definición del rango de huésped son las de *hopAT1* y *hopA2* (Figura 9). Estas variantes alélicas de *avrPto1*, *hopAT1* y *hopA2* también están presentes en la cepa Psm Ph3, única cepa que no pertenece a Psn que es capaz de infectar y causar síntomas en adelfa.

Solo la cepa Psm Ph3 presenta versiones truncadas de *hopAS1*, *hopBL1* y *hopBL2* (Figura 9). Se ha descrito que HopAS1 contribuye a la virulencia en tomate y se cree que funciona como factor de avirulencia en *Arabidopsis* (Sohn *et al.*, 2012), por lo que podría tener un papel similar en dipladenia. Las versiones truncadas de *hopBL1* y *hopBL2* de Psm Ph3 carecen del dominio catalítico SUMO, lo que sugiere que las versiones completas de estos T3E podrían ser reconocidas por genes de resistencia en dipladenia. Ya que en este estudio solo se incluye una

cepa de Psm, habría que estudiar si el resto de las cepas de Psm presentan las versiones truncadas de estos T3E. Además de la cepa Psm Ph3, solo la cepa Psn CFBP 5067 indujo síntomas en dipladenia, produciendo esta última una leve necrosis en el punto de inoculación. La cepa Psn CFBP 5067 contiene *hopAY1* y *hopAF1-1*, T3E que comparte con la cepa patógena de dipladenia Psm Ph3, y que están ausentes en la cepa asintomática en dipladenia Psn ESC23. Esto sugiere que estos T3E podrían tener un posible papel en la virulencia en dipladenia.

En las cepas del patovar Psv y Psf no se han encontrado T3E cuya presencia o ausencia sea exclusiva de estos patovares. Aunque cabe destacar tres T3E que podrían tener un papel en la especificidad de huésped de Psf, a saber, *hopX1*, presente en todas las cepas de Psf pero también en Psv ICMP 13519; *hopZ1*, que es exclusivo de Psf pero está ausente en la cepa Psf ICMP7712 y; *hopD1*, que está truncado o ausente en todas las cepas de Psf, menos en Psf NCPPB 1006, que contiene una segunda copia completa de este T3E.

En este estudio, se han identificado mediante genómica comparativa una serie de T3E que pueden estar implicados en el rango de huésped de *P. savastanoi*. Futuros ensayos experimentales con estos T3E podrían validar estas predicciones y confirmar el papel de estos T3E en la definición del rango de huésped de *P. savastanoi*. Además, si bien se cree que los T3E son determinantes clave de la especificidad del huésped, cepas con repertorios divergentes pueden causar enfermedad en el mismo huésped (Almeida *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2011; Lindeberg *et al.*, 2012), lo que significa que existen otros elementos que participan en la interacción huésped-patógeno (O'Brien *et al.*, 2011; Nowell *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017b; Hulin *et al.*, 2018; Dillon *et al.*, 2019b), como las fitotoxinas (Baltrus *et al.*, 2011), que también hay que tener en cuenta para poder entender al completo la interacción huésped-patógeno.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo II

El regulón HrpL de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335: análisis transcriptómico y predicción *in silico*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

El sistema de secreción tipo III (T3SS) es uno de los mecanismos primarios de acción contra las defensas del huésped en muchas bacterias Gram (-) patógenas de animales y plantas. Este complejo sistema multiproteico se encarga de la translocación de proteínas especializadas, llamadas efectores del T3SS (T3E), desde el citoplasma bacteriano hasta el citoplasma de la célula huésped (Büttner, 2016; Schulmeyer and Yahr, 2017). En las bacterias fitopatógenas, el T3SS se requiere tanto para el desarrollo de la enfermedad en los huéspedes susceptibles como para el desencadenamiento de la muerte celular programada, también llamada respuesta de hipersensibilidad (HR), en los huéspedes resistentes (Lindgren *et al.*, 1986).

El complejo *Pseudomonas syringae* constituye un grupo de bacterias Gram (-) consideradas como el grupo de patógenos de plantas más relevantes desde el punto de vista científico y económico (Mansfield *et al.*, 2012). Las cepas de este complejo invaden los tejidos del huésped y suprimen la inmunidad del mismo gracias a la presencia de un T3SS activo y funcional (Galan and Collmer, 1999). El T3SS en *P. syringae* está codificado y regulado por el producto de los genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) y *hrc* (*hypersensitive response and conserved*), los cuales forman parte de una isla de patogenicidad junto con otros genes que codifican T3E (Alfano *et al.*, 2000). El principal regulador del T3SS y sus T3E es el factor sigma alternativo HrpL que reconoce una secuencia muy conservada (GGAACC-N_{15/16}-CCACNNA), conocida como caja *hrp* (Xiao and Hutcheson, 1994). La inducción de la transcripción de *hrpL* requiere de otro factor sigma alternativo, RpoN (σ_{54}), y de dos activadores transcripcionales, HrpR y HrpS. Los activadores HrpR y HrpS forman un heterodímero que se une al promotor dependiente σ_{54} de *hrpL* e inducen su transcripción (Hendrickson *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001). En un trabajo reciente se describe que la proteína reguladora HrpL realiza también un control de su propia expresión a través de la región intergénica compartida con el gen *hrpJ*, en la cual, la asociación del complejo de la RNA polimerasa y HrpL con el promotor del gen *hrpJ* impiden que el dímero HrpRS pueda acceder al sitio de unión del promotor de *hrpL* y

active su transcripción (Waite *et al.*, 2017). Además de los mecanismos de regulación habituales de una célula procariota, el T3SS de *P. syringae* puede regular su expresión en función de factores ambientales, se ha demostrado que, en condiciones *in vitro*, la expresión del T3SS de *P. syringae* se activa en medios con una composición ácida, una baja concentración de nutrientes o una baja presión osmótica (como en medio mínimo Hrp), mientras que, puede inhibirse en condiciones de pH alto, de alta osmolaridad o en un medio rico en nutrientes (como es el medio *King's Broth*, KB) (Xie *et al.*, 2019a). Además, en los últimos años, se han identificado nuevos reguladores del T3SS en los patovares de *P. syringae*, como son, las proteínas reguladoras RhpR, AefR, AlgU y CvsR, y las proteasas RhpP y Lon (Xie *et al.*, 2019a).

La especie *P. savastanoi*, perteneciente al complejo *P. syringae*, incluye un total de 5 patovares aislados de huéspedes leñosos, pv. *savastanoi* (Psv, aislados de olivo), pv. *nerii* (Psn, aislados de adelfa), pv. *mandevillae* (aislado de la dipladenia), pv. *fraxini* (Psf, aislados de fresno) y pv. *retacarpa* (Psr, aislados de retama) (Caballo-Ponce, 2017; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). Las cepas de *P. savastanoi* también codifican un T3SS completo y funcional, relacionado filogenéticamente con el de otras cepas del complejo *P. syringae* (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Tegli *et al.*, 2011; Matas *et al.*, 2014; Baltrus *et al.*, 2017; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a; Moreno-Pérez *et al.*, 2020). En los patovares Psv y Psn se demostró que tanto la formación de tumores en sus respectivos huéspedes como la inducción de la denominada respuesta de hipersensibilidad (HR) depende de la presencia de un T3SS funcional que permita la translocación de efectores durante el proceso de invasión (Sisto *et al.*, 2004; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014; Biancalani *et al.*, 2016; Cerboneschi *et al.*, 2016). En la Introducción General de esta Tesis Doctoral se incluye una descripción más detallada de los diferentes mutantes del T3SS de *P. savastanoi* descritos hasta la fecha.

Con respecto a la regulación del T3SS en *P. savastanoi*, es conocido que el principal regulador del T3SS también es el factor de transcripción HrpL, pues se

demostró que un mutante de remplazamiento génico con un gen de resistencia a kanamicina del gen *hrpL* en la cepa Psv NCPPB 3335 perdía la capacidad de formar tumores en plantas de olivo leñosas, así como, de inducir una HR en plantas de tabaco (Matas *et al.*, 2014). Además, se sabe que existe una regulación específica de patovar de los genes del T3SS en medio de inducción Hrp en los patovares Psv, Psn y Psf (Tegli *et al.*, 2011). En este trabajo, se sugiere que la manera en la que se regulan los genes del T3SS podría tener un papel en el rango de huésped, debido a que si esta regulación ocurriese también *in planta*, podría ser dependiente de las condiciones fisiológicas encontradas en el apoplasto o en el espacio extracelular de los tejidos de la planta huésped (Tegli *et al.*, 2011).

En el capítulo 1 de esta tesis doctoral se han identificado y caracterizado los genes *hrp/hrc* que codifican el T3SS canónico, así como su repertorio de efectores, en todas las cepas secuenciadas de los patovares aislados de huéspedes leñosos (Psv, Psn, Psm, Psf y Psr) de la especie *P. savastanoi*. Hasta la fecha, no se ha estudiado la implicación en patogenicidad del T3SS en cepas de los patovares Psm, Psf y Psr, y en estos tres patovares, solo se ha estudiado la implicación en la inducción de la HR en tabaco del T3SS de Psm Ph3 (Caballo-Ponce, 2017). Además, solamente se ha caracterizado un mutante *hrpL* en la cepa Psv NCPPB 3335. La construcción de este mutante ha permitido una caracterización más profunda del repertorio de T3E de esta cepa, en la que se ha demostrado la translocación a las células vegetales de once de sus 31 T3E: AvrRpm2, HopA1, HopAA1, HopAZ1, HopAF1-1, HopAF1-2, HopAO1, HopAO2, HopBK1, HopBL1 y HopBL2. De los siete últimos este mutante también ha permitido demostrar su transcripción dependiente de HrpL (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Además, esta cepa es la única de *P. savastanoi* aislada de huéspedes leñosos cuyo genoma cerrado y la secuencia de sus tres plásmidos completos está disponible en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), convirtiéndola en la cepa idónea para llevar a cabo un estudio de su regulón HrpL.

En este capítulo, con el objetivo de estudiar en mayor profundidad el papel del T3SS en los patovares Psn, Psm, Psf y Psr, se han construidos mutantes de pérdida de función del regulador HrpL en una cepa modelo de cada uno de ellos. Con estos mutantes, se han llevado a cabo ensayos de patogenicidad en sus respectivos huéspedes y ensayos de HR en tabaco y tomate (*Solanum lycopersicum*). Además, se ha realizado una caracterización bioinformática del regulón HrpL de la cepa Psv NCPPB 3335, así como un análisis transcriptómico (*RNA-seq*) comparativo entre el mutante *hrpL* y la cepa silvestre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este capítulo se describen en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente. Las cepas de *P. savastanoi* se incubaron a 28 °C y las de *Escherichia coli* a 37 °C, en medio *Lysogenic Broth* (LB) (Bertani, 1951) al 0,5% de NaCl y sin glucosa, en medio *King's Broth* (KB) (King *et al.*, 1954) o en medio *Super Optimal Broth* (SOB) (Hanahan, 1983). Cuando fue necesario, los medios líquidos y sólidos se suplementaron con los siguientes antibióticos (cantidades en µg/ml) para *P. savastanoi*/*E. coli*: ampicilina (Ap) 400/100, kanamicina (Km) 7/50, nitrofurantoína (Nf) 20/- y cicloheximida (Ch) 100/-.

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio.

Cepa	Características relevantes ^a	Referencias
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>F</i> -, ϕ 80 <i>dlacZ</i> M15, (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> - <i>mk</i> -), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	Hanahan (1983)
GM2929	<i>F</i> -, <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>glnV44</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>recF143</i> . (<i>Sp</i> ^R , <i>Cm</i> ^R).	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>		
NCPPB 3335	Cepa silvestre aislada de olivo	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2007)
NCPPB 3335 Δ <i>hrpL::nptII</i>	Mutante <i>hrpL</i> derivado de NCPPB 3335 con el casete <i>nptII</i> de resistencia a Km (<i>Km</i> ^R)	Matas <i>et al.</i> (2014)
NCPPB 3335 Δ <i>hrpL</i>	Mutante <i>hrpL</i> derivado de NCPPB 3335 Δ <i>hrpL::nptII</i>	Este trabajo
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>		
ESC23	Cepa Silvestre aislada de adelfa	Tegli <i>et al.</i> (2011)
ESC23 Δ <i>hrpL::nptII</i>	Mutante <i>hrpL</i> derivado de ESC23 con el casete <i>nptII</i> de resistencia a Km (<i>Km</i> ^R)	Este trabajo
ESC23 Δ <i>hrpL</i>	Mutante <i>hrpL</i> derivado de NCPPB 3335 Δ <i>hrpL::nptII</i>	Este trabajo
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>mandevillae</i>		
Ph3	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Eltibany <i>et al.</i> (2012)
Ph3 Δ <i>hrpL::nptII</i>	Mutante <i>hrpL</i> derivado de Ph3 con el casete <i>nptII</i> de resistencia a Km (<i>Km</i> ^R)	Este trabajo

Tabla 1. Continuación.

Cepa	Características relevantes ^a	Referencias
Ph3 $\Delta hrpL$	Mutante <i>hrpL</i> derivado de Ph3 $\Delta hrpL::nptII$	Este trabajo
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i>		
NCPPB 1006	Cepa Silvestre aislada de fresno	Janse (1981)
NCPPB 1006 $\Delta hrpL::nptII$	Mutante <i>hrpL</i> derivado de NCPPB 1006 con el casete <i>nptII</i> de resistencia a Km (Km ^R)	Este trabajo
NCPPB 1006 $\Delta hrpL$	Mutante <i>hrpL</i> derivado de NCPPB 1006 $\Delta hrpL::nptII$	Este trabajo
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>retacarpa</i>		
CECT 4861	Cepa silvestre aislada de retama	Álvarez <i>et al.</i> (1998)
CECT 4861 $\Delta hrpL::nptII$	Mutante <i>hrpL</i> derivado de CECT 4861 con el casete <i>nptII</i> de resistencia a Km (Km ^R)	Este trabajo
CECT 4861 $\Delta hrpL$	Mutante <i>hrpL</i> derivado de CECT 4861 $\Delta hrpL::nptII$	Este trabajo
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>		
DC3000	Cepa silvestre aislada desde tomate	Cuppels (1986)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>		
CFBP 1621	Cepa silvestre aislada desde tabaco	Guillorit and Samson (1993)/W. S. Beach

^aSp, espectinomicina; Cm, cloranfenicol; Km, kanamicina.

Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio

Nombre	Descripción ^a	Referencia
pIAC4-Km	Derivado de pGEM-T <i>Easy</i> contiene aproximadamente 1.2 Kb de las regiones flanqueantes del gen <i>hrpL</i> de Psv NCPPB 3335 interrumpidos por el gen de resistencia a Km <i>nptII</i> (Ap ^R , Km ^R)	Matas <i>et al.</i> (2014)
pFLP2	Contiene el gen que codifica para una recombinasa Flp (flipasa) y el gen <i>sacB</i> (Ap ^R)	Hoang <i>et al.</i> (1998)

^a La descripción de pGEM-T *Easy* se encuentran en la Tabla 2 de Material y Métodos Generales; Ap, ampicilina; Km, kanamicina.

Escisión del casete de resistencia a Km de los mutantes de pérdida de función

La construcción de mutantes por intercambio alélico del gen *hrpL* con el gen de resistencia a Km (*nptII*) se realizó en una cepa modelo de cada patovar siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos Generales y utilizando el vector pIAC4-Km descrito en Matas *et al.* (2014)(Tabla 2). Este vector contiene aproximadamente 1.2 Kb de las regiones flanqueantes del gen *hrpL* de

Psv NCPPB 3335 interrumpidos por el casete de resistencia a Km. La alta identidad que presentan las regiones flanqueantes del gen *hrpL* en las cepas de los distintos patovares de *P. savastanoi*, permitió la utilización de un mismo plásmido para llevar a cabo la construcción de los mutantes *hrpL* en las cepas Psn ESC23, Psm Ph3, Psf NCPPB 1006 y Psr CECT 4861. La comprobación de los mutantes se realizó mediante *Souther Blot* siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos Generales. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las sondas se muestran en la Tabla 3. Se utilizó una sonda que hibrida con la secuencia del gen *hrpL* y otra que hibrida con el casete de resistencia a Km. Además, en el casete de resistencia a Km, el gen *nptII* se encuentra flanqueado por dos sitios FRT (*flip-recombinase targets*) que permiten la escisión del gen, una vez integrado en el cromosoma, en presencia de la enzima flipasa. Para la escisión del casete *nptII*, se electroporaron los mutantes *hrpL* de Psv NCPPB 3335, Psn ESC23, Psm Ph3, Psf NCPPB 1006 y Psr CECT 4861 con el plásmido pFLP2 (Tabla 2), siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB-Ap y, se realizaron réplicas de las colonias obtenidas en LB-Km para determinar si el gen *nptII* había sido escindido (Km^S) o no (Km^R). Para promover la pérdida del plásmido pFLP2, que contiene el gen *sacB*, se sembraron los clones Km^S en placas de LB con sacarosa al 5 % donde solo crecen aquellas colonias que han perdido el plásmido pFLP2.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este Capítulo.

Aplicación	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Sonda <i>hrpL</i> *	<i>hrpL</i> F-29	CCTAGTGATCCTTGATGC
	<i>hrpL</i> R-381	CAAGCAATCAATGGCTGC
Sonda <i>nptII</i>	<i>nptII</i> F	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	<i>nptII</i> R	TTGCATCAGCCATGATGG
Comprobación de genómico	<i>catB</i> R1004	GCTCGACCAGAATGTCTTCG
	<i>catB</i> F516	CAAGCTGAAGATCGGTGCC
Ensayos RT-qPCR	<i>gyrA</i> F-180	GAGCGAGCTGGGTAACGACTGGAAC
	<i>gyrA</i> -A R-329	CAGCGTTGTGCGCCATCGACCGAA
	<i>hrpA</i> F-93	ATCAACAGCGTCAAGAGCAG
	<i>hrpA</i> R-267	ATTTGGTTGGAAAGGGCTTC
	<i>avrPto</i> F-295	GACAGGAGAGTCAGGAGTAAACC
	<i>avrPto</i> R-430	AGATCCGCTTGGGTTCATAG
	<i>hopAO2</i> -F	TGCGTTTGATGGTGACCGA
	<i>hopAO2</i> -R	ACCGCAATGGATATGTACCCG

*Estos oligonucleótidos también se utilizaron para realizar la comprobación mediante PCR de las posibles colonias mutantes obtenidas.

Bioensayos en plantas

- Respuesta de hipersensibilidad

Para los ensayos de HR se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) var. Newdel o var. Xanthi de 3 meses de edad y plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum*) var. MoneyMaker de 4-6 semanas de edad. Las plantas se cultivaron con un fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad y con una temperatura día/noche de 26 °C/22 °C. Las cepas de *P. savastanoi* se incubaron en placas durante dos días a 28 °C, y tras la incubación, se recogió biomasa y se resuspendió en MgCl₂ 10 mM. Se realizaron dos lavados con MgCl₂ 10 mM de las suspensiones bacterianas y se ajustó la DO_{600nm} de las soluciones a 0,5 (10⁷-10⁸ UFC/ml). Para realizar las inoculaciones, se realizó una pequeña herida superficial en la cara abaxial de la hoja con una aguja hipodérmica, y posteriormente se introdujo la suspensión bacteriana en el espacio periplásmico con ayuda de una jeringa de 1 ml sin aguja. El desarrollo de los síntomas característicos de una HR se produce tras aproximadamente 24-48 h. Los síntomas se capturaron con una cámara digital de alta resolución (Nikon DXM 1200, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

- Ensayos de virulencia en huéspedes leñosos

La virulencia de las cepas de *P. savastanoi* se analizó en plantas de *Olea europea* (olivo) derivadas de la germinación *in vitro* de semillas (originalmente recolectadas de una planta de la variedad Arbequina), plantas de *Nerium oleander* (adelfa) variedad rosa de flores simples, suministradas por Viveros Guzmán (Málaga, España), plantas de *Mandevilla* spp. (dipladenia) variedad de flores rojas, y plantas de *Fraxinus excelsior* (fresno) y *Retama sphaerocarpa* (retama) nativas de Valladolid y suministradas por Viveros Gutiérrez (Valladolid, España). La preparación del inoculo y la inoculación se realizó tal y como se detalla en Material y Métodos Generales. En todos los ensayos de virulencia realizados en este Capítulo se utilizaron dos plantas por cepa, inoculadas en 10-12 lesiones por planta y cepa.

Análisis transcriptómico *RNAseq*

La obtención del RNA bacteriano para los análisis de *RNAseq* se llevó a cabo de la siguiente manera. Un preinoculo de 20 ml de la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 y su mutante $\Delta hrpL$ se cultivaron a 28 °C en medio KB durante toda la noche. A partir de ese preinoculo, las células se diluyeron en dos cultivos de 110 ml en medio KB fresco a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,1 y se incubaron en agitación a 28 °C hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0,5, es decir, aproximadamente 5×10^7 unidades formadores de colonia (UFC)/ml. De cada cultivo se vertieron 48 ml en dos tubos cónicos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante y obteniéndose de cada cultivo dos precipitados celulares. Uno de los precipitados se resuspendió en 6 ml de medio de KB fresco frío (4 °C), se repartió en 6 tubos de 1,5 ml previamente enfriados y se centrifugaron a 4 °C a 15000 rpm durante 2 minutos. De estas muestras se descartó el sobrenadante y el precipitado se ultracongeló en nitrógeno líquido antes de conservarlo a -80 °C. Este precipitado simula la condición de no inducción y se utilizará como control en ensayos futuros de RT-qPCR. El otro precipitado se lavó dos veces con $MgCl_2$ 10 mM (centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos), se resuspendió en 48 ml de medio de inducción Hrp (Huynh *et al.*, 1989) y se incubó en agitación a 28 °C durante 6 horas. Pasadas las 6 horas de incubación, se centrifugaron los cultivos a 4500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 6 ml de medio de inducción Hrp (4 °C), se repartió en 6 tubos de 1,5 ml previamente enfriados y se centrifugaron a 4 °C a 15000 rpm durante 2 minutos. De estas muestras se descartó el sobrenadante y el precipitado se ultracongeló en nitrógeno líquido antes de conservarlo a -80 °C. Estos precipitados simulan la condición de inducción de los genes *hrp* y serán las muestras utilizadas para el análisis *RNAseq*. La extracción de RNA de las muestras se realizó con el kit de extracción *RNAeasy Mini Kit* (QIAGEN; Hilden, Alemania), utilizado en otros análisis *RNAseq* del regulón HrpL de bacterias del complejo *P. syringae* (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014), siguiendo las indicaciones del fabricante para la extracción de RNA de cultivos bacterianos. Para la eliminación de las trazas de

DNA genómico se utilizó el Kit *TURBO DNA-free™ kit* (Invitrogen Corp, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se comprobó que no había contaminación de DNA genómico mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos del gen *catB*. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente, y su integridad se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. De cada cepa se enviaron dos extracciones independientes de RNA (dos réplicas biológicas) al Servicio de Ultrasecuenciación de Universidad de Málaga (UMA) donde se realizaron los controles de calidad necesarios y se realizó la secuenciación *RNAseq*. Los controles de calidad de las muestras se realizaron con el chip bioanalizador *LabChip RNA 6000 Pico* (Agilent Technologies; CA, EEUU). Para la degradación del RNA ribosómico se utilizó el kit *Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit Bacteria* (Illumina; CA, EEUU). Las genotecas se prepararon con el Kit *Truseq stranded mRNA* (Illumina; CA, EEUU) y la secuenciación se realizó con el Equipo *NextSeq550* de *Illumina* (Illumina; CA, EEUU).

El procesamiento de los datos obtenidos del análisis *RNAseq* también se realizó en el Servicio de Ultrasecuenciación de la UMA en colaboración con la Plataforma Andaluza de Bioinformática (PAB) siguiendo un flujo de trabajo basado en la alternancia de una serie de paquetes de *software* adaptados al análisis de muestras de *RNAseq*, como son *SeqTrimNext* (v. 2.0.60) (<https://rubygems.org/gems/seqtrimnext/versions/2.0.60>), *Bowtie 2* (v. 2.2.9) (Langmead and Salzberg, 2012), *Samtools* (v. 0.1.19) (Li *et al.*, 2009) y *Tuxedo tools* (Ghosh and Chan, 2016) (Figura 1). El paquete *SeqTrimNext* (NST) permite preprocesar y limpiar secuencias procedentes de NGS (*Next-Generation Sequencing*). Con este sistema, mediante un BLAST adaptado a nuestras necesidades contra diferentes bases de datos, se eliminan las secuencias de baja calidad, de baja complejidad, los adaptadores de la técnica de secuenciación y las secuencias ribosomales que hayan podido escapar al proceso de degradación previo. Posteriormente, se utilizó la herramienta *Bowtie 2* para alinear las lecturas con las referencias del genoma y los tres plásmidos nativos (pPsv48A, pPsv48B y

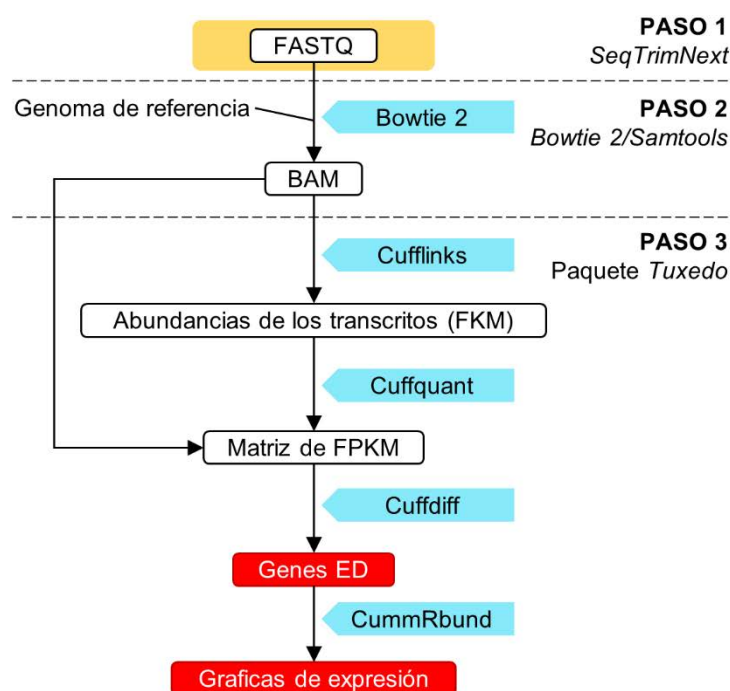


Figura 1. Flujo de trabajo en el análisis del procesamiento de los datos del RNAseq realizado en el Centro de Supercomputación y Bioinnovación de la Universidad de Málaga (scbi_uma). En el PASO 1 se utilizó el paquete *SeqTrimNext* para preprocesar y limpiar las secuencias procedentes del RNAseq. En el PASO 2, se utilizó la herramienta *Bowtie 2* para realizar el alineamiento de las lecturas obtenidas con el genoma de referencia utilizado, la secuencia del cromosoma de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 fusionada a la de sus tres plásmidos nativos pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C. El paquete de programas *Samtools* nos permitió leer, editar y visualizar los ficheros del alineamiento directamente en formato SAM/BAM. En el PASO 3 se utilizó el paquete *Tuxedo* que contiene una serie de herramientas destinadas al procesamiento de datos RNAseq. Entre estas herramientas, *Cufflinks* se utilizó para estimar las lecturas alineadas en los distintos transcritos y estimar su abundancia (FPKM), *Cuffquant* crea una matriz con las abundancias que posteriormente es utilizada por *Cuffdiff* para realizar el análisis de la expresión diferencial. Tras este procesamiento, se obtiene una lista de genes expresados diferencialmente (ED). Por último, se utilizó un paquete de R denominado *CummeRbund* para realizar la expresión gráfica de los resultados de la expresión diferencial.

pPsv48C) de la cepa Psv NCPPB 3335, cuyos números de acceso en NCBI son NZ_CP008742, FR820585, FR820586 y FR820587, respectivamente. El paquete de programas *Samtools* nos permite leer, editar y visualizar los ficheros del alineamiento directamente en formato SAM/BAM. Para el análisis de la expresión diferencial se utilizó el paquete *Tuxedo* con algunas modificaciones realizadas por la PAB para su optimización. Dentro de este paquete, el programa *Cufflinks* se utilizó para estimar las lecturas alineadas en los distintos transcritos y estimar su abundancia, por lo que, finalmente, de cada muestra se generó un fichero de anotación propia en formato gtf. La abundancia de los transcritos se

medió en FPKM (fragmentos por kilobase de fragmentos de gen por millón de lecturas) y la normalización de los datos de conteo se realizó por el método *classic-fpkm*. Los ficheros CXB de abundancias (matriz de lecturas en formato FPKM) se generaron con Cuffquant y, posteriormente, estos se analizaron en CuffDiff para identificar los genes expresados diferencialmente (ED). Solo aquellos genes con un valor P ajustado (valor q) < 0,05 y un $\log_2$ (tasa de cambio) mayor de 0,5 o menor de -0,5 se consideraron significativos. La representación gráfica de los resultados de expresión diferencial se realizó utilizando un paquete R denominado CummeRbund.

Análisis transcripcionales RT-qPCR

Para la realización de las PCR cuantitativas en tiempo real (RT-qPCR), se utilizaron las mismas extracciones de RNA, libres de DNA genómico, obtenidas como se describe en el apartado anterior. Para la obtención de DNA complementario (cDNA) se utilizó como molde 1 μ g de RNA libre de genómico de cada muestra, la enzima transcriptasa inversa y los hexámeros inespecíficos incluidos en el kit de síntesis de cDNA *iScript™ cDNA synthesis kit* (BioRad; CA, USA). La realización de la curva de eficiencia de los oligonucleótidos, las RT-qPCRs y el análisis de la curva de fusión para confirmar la especificidad de la reacción de amplificación, se llevaron a cabo siguiendo los criterios previamente descritos por Vargas *et al.* (2011). La abundancia relativa de los transcritos se calculó usando el método $\Delta\Delta$ cycle-threshold (Ct) (Livak and Schmittgen, 2001). Los datos obtenidos se normalizaron en función de la expresión del gen constitutivo *gyrA*. La tasa de expresión relativa se calculó como la diferencia en los Ct obtenidos de la PCR cuantitativa del gen a analizar y del gen *gyrA* ($\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gyrA}}$). Un ciclo de PCR representa una diferencia de dos veces en la abundancia de la muestra, por lo tanto, la tasa de cambio se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001). Las reacciones de RT-qPCR de las dos réplicas biológicas se realizaron por triplicado y los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 3. La tasa de cambio de cada réplica biológica se calculó como la media de las tres réplicas técnicas y, posteriormente, se calculó la media

y la varianza de los valores de las dos réplicas biológicas para cada una de las cepas. La tasa de cambio se representó como la expresión en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la expresión en la cepa silvestre.

Predicción bioinformática de genes regulados por el factor de transcripción HrpL

La predicción bioinformática de posibles genes regulados por el factor de transcripción HrpL, se realizó mediante la identificación de cajas *hrp* contenidas en los 500 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de los marcos abiertos de lectura codificados en el genoma de Psv NCPPB 3335, siguiendo los criterios previamente descritos por Fouts *et al.* (2002). Para ello se utilizó un programa bioinformático, denominado *miGenomes*, diseñado por el Dr. Pablo Rodríguez Palenzuela (CBGP-Universidad Politécnica de Madrid). De la lista de genes identificados, mediante una comparativa de los resultados obtenidos con genes cuya dependencia del factor de transcripción HrpL ya se había descrito previamente en el complejo *P. syringae* y con los genes identificados mediante *RNAseq* en la cepa Psv NCPPB 3335 en este capítulo, se definieron como positivos aquellos genes que presentaban un valor *hrp* ≥ 2500 . Además, este programa incluye una búsqueda de nuevos efectores del T3SS en base a las características conocidas y presentes en el extremo N-terminal de los T3E necesarias para su translocación, utilizando el programa EffectiveDB (Eichinger *et al.*, 2015). La predicción de operones se realizó con el programa *Fgenesb* de *Sofberry* (Solovyev and Salamov, 2011) y con el servidor web *Operon-mapper* (Taboada *et al.*, 2018).

Comparativa del regulón HrpL de Psv NCPPB 3335 con el de otras cepas del complejo *P. syringae*

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos tanto en el análisis *RNAseq* como en la predicción bioinformática, se realizó una comparativa de los genes identificados con los genes cuya regulación por HrpL se ha demostrado previamente mediante *RNASeq* en seis cepas del complejo *P. syringae* (*P. syringae* pv. tomato (Pto) DC3000, *P. syringae* pv. phaseolicola (Pph) 1448A, *P. syringae* pv. *syringae* (Psy) B728A, *P. syringae* pv. *lachrymans* (Pla) 107, *P. syringae* pv.

japonica (Pja) MAFF 301072 y *P. syringae* pv. *oryzae* (Por) 1_6) (Chang *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). Esta comparativa se realizó mediante BLASTP utilizando el *software* Geneious 7.1.3. (Kearse *et al.*, 2012). Además, se realizó una búsqueda de dominios en la base de datos Pfam (El-Gebali *et al.*, 2018) y mediante el servidor *online* HHpred (Söding *et al.*, 2005), así como una búsqueda BLASTP en NCBI, de aquellas proteínas cuya función estaba por dilucidar.

RESULTADOS

HrpL es esencial para la patogénesis y la inducción de la respuesta hipersensible en los patovares de *P. savastanoi* Psn, Psm, Psf y Psr

Para estudiar el papel del regulador HrpL en la patogénesis de Psn, Psm, Psf y Psr se ha llevado a cabo la construcción de mutantes por intercambio alélico del gen *hrpL* con el gen de resistencia a Km (*nptII*) en las cepas Psn ESC23, Psm Ph3, Psf NCPPB 1006 y Psr CECT 4861. Una vez estos mutantes se comprobaron por *Southern* (datos no mostrados), se realizó la escisión del casete *nptII* tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad del T3SS en los mutantes del regulador HrpL de estos patovares se realizaron ensayos de HR. Dado que las cepas aisladas de dipladenia inducen la HR en tomate pero no en tabaco (Pirc *et al.*, 2015), en estos análisis se utilizaron ambas plantas. En las inoculaciones realizadas en las hojas de tomate var. MoneyMaker se observó a 24 horas posinfiltración (hpi) la inducción de HR en todas las inoculaciones realizadas con las cepas silvestres (Psv NCPPB 3335, Psn ESC23, Psm Ph3, Psf NCPPB 1006 y Psr CECT 4861), mientras que, en las inoculaciones realizadas en hojas de tabaco var. Xhanti las cepas silvestres Psn ESC23 y Psm Ph3 no indujeron HR (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los descritos para las cepas aisladas de dipladenia (Pirc *et al.*, 2015), pero se contradicen con los resultados obtenidos en las inoculaciones realizadas en hojas de tabaco var. Burley White con Psn ESC23 (Biancalani *et al.*, 2016). Por el contrario, tal y como se ha descrito para la cepa mutante Psv NCPPB 3335 $\Delta hrpL$ (Matas *et al.*, 2014), todas las cepas mutantes $\Delta hrpL$ fueron incapaces de inducir HR en hojas de tomate y tabaco tras 24 hpi (Figura 2), indicando que en todas las cepas mutantes $\Delta hrpL$ el T3SS no se había inducido.

Para estudiar el papel de HrpL en la formación de tumores o excrecencias en los patovares de *P. savastanoi*, se realizaron ensayos de patogenicidad con las cepas silvestres y sus mutantes $\Delta hrpL$ en sus respectivos huéspedes. Tal y como se observó en el capítulo 1 de esta tesis doctoral (Capítulo 1, Figura 2 y 3), las

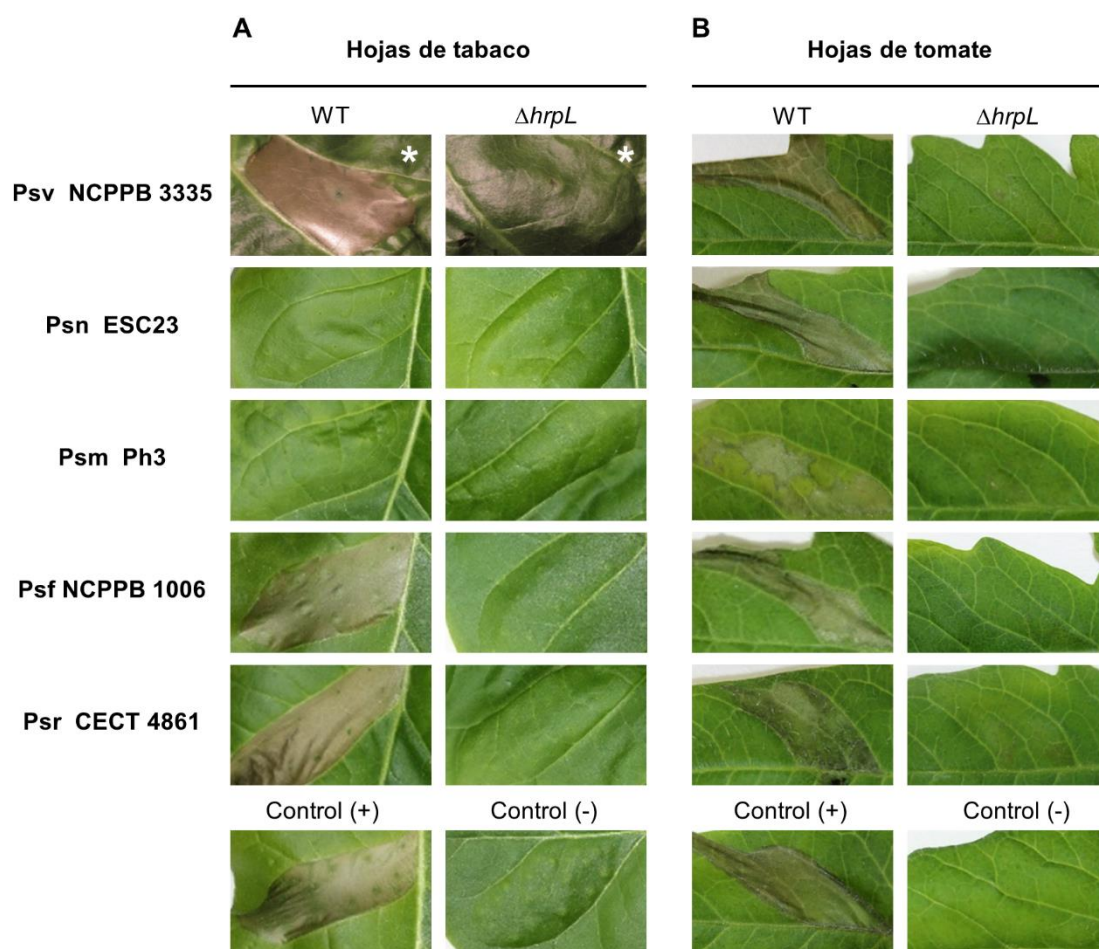


Figura 2. Respuesta de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco var. Newdel y tomate var. MoneyMaker 24 h después de la infección con las cepas silvestres y mutantes $\Delta hrpL$ de *P. savastanoi*. (A) Respuesta de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco. Control +, infección realizada con *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000; control -, hojas inoculadas con $MgCl_2$ 10 mM. (B) Respuesta de hipersensibilidad en hojas de tomate. Control +, infección realizada con *Pseudomonas syringae* pv. tabaci CFBP 1621; control -, hojas inoculadas con $MgCl_2$ 10 mM. Los asteriscos indican que la foto no se ha tomado en este ensayo y que se ha adaptado de Matas *et al.*, 2014. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente.

cepas silvestres Psn ESC23, Psm Ph3, Psf NCPPB 1006 y Psr CECT 4861, produjeron tumores o excrecencias a 90 días posinoculación (dpi) en plantas adultas de adelfa, dipladenia, fresno y retama, respectivamente (Figura 3). Por el contrario, las cepas mutantes $\Delta hrpL$ de estos patovares pierden la capacidad de inducir síntomas en sus respectivos huéspedes (Figura 3), al igual que previamente se había descrito para un mutante $\Delta hrpL$ de la cepa de Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014). Estos resultados indican que en los patovares Psn, Psm, Psf y Psr, la activación del T3SS dependiente de HrpL también es esencial para la patogénesis.

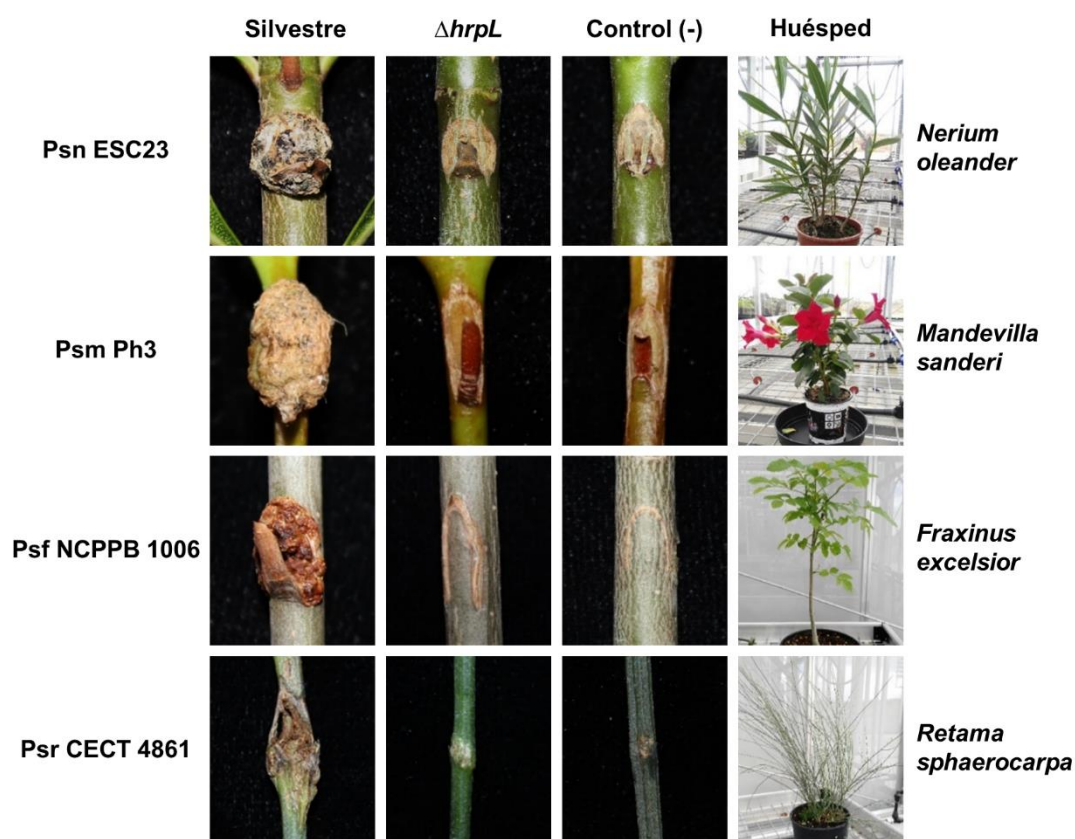


Figura 3. Síntomas generados por cepas silvestres y mutantes $\Delta hrpL$ de diversos patovares de *Pseudomonas savastanoi* en sus respectivos huéspedes. Las fotografías muestran los síntomas característicos generados 90 días después de la inoculación. Control negativo, plantas inoculadas con $MgCl_2$ 10 mM. Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente.

Evaluación de la secuenciación *RNAseq*

Para llevar a cabo el estudio del regulón HrpL de Psv se secuenciaron mediante *RNAseq* dos muestras de RNA independientes de la cepa silvestre y otras dos de su mutante $\Delta hrpL$. Para garantizar que en las condiciones de cultivo utilizadas se había producido la inducción génica esperada por HrpL, antes de enviar las muestras al servicio de secuenciación de la UMA, se llevaron a cabo análisis de RT-qPCR de varios genes cuya expresión dependiente de HrpL se ha descrito previamente (Figura 4) (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). De acuerdo con estos autores, la expresión de los T3E *avrPto1* y *hopAO2* disminuyó significativamente en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre (Figura 4). Además, se produjo una reducción del 98% en la expresión del gen *hrpA*, que codifica para el pili de la jeringa del T3SS, en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre (Figura 4). Estos resultados, garantizan que el

proceso de inducción de los genes *hrp* se ha producido conforme a lo esperado.

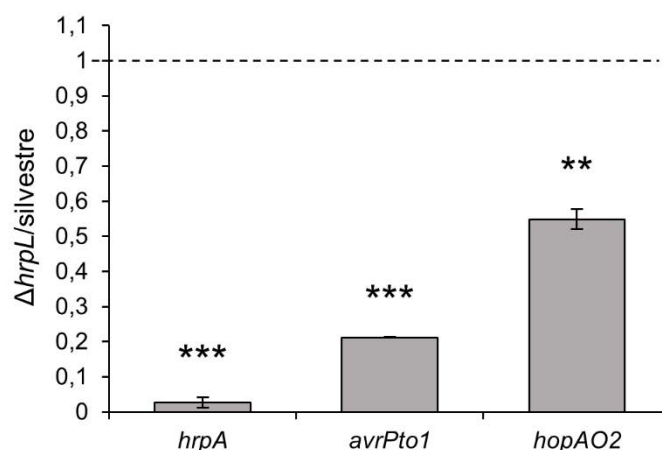


Figura 4. Análisis RT-qPCR de genes cuya dependencia al factor de transcripción HrpL ha sido previamente descrita en la cepa Psv NCPPB 3335 en las mismas condiciones de este estudio. La tasa de cambio para cada uno de estos genes se normalizó al gen de expresión constitutiva *gyrA*. Las barras representan el promedio del cociente de la tasa de cambio de expresión de las dos réplicas de la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre. Las barras de error muestran la desviación estándar. Los asteriscos indica un valor significativamente distinto de uno, establecido por la prueba *Student's t-test* ($P < 0,05$), que indican una disminución significativa de la expresión de estos genes en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre.

En la secuenciación *RNAseq* se obtuvieron un total de 177,83 millones de lecturas pareadas de 75 pb (Tabla 4), de las que 81,99 y 95,84 millones corresponden a la suma de las lecturas obtenidas en las dos réplicas biológicas de la cepa silvestre y mutante $\Delta hrpL$, respectivamente. Las lecturas brutas se recortaron eliminando secuencias de adaptadores, lecturas vacías y secuencias de baja calidad, así como las secuencias ribosomales que hayan podido escapar al proceso de degradación previo con el paquete *SeqTrimNext*. Tras este procesamiento se rechazaron el 18,28% y el 16,68% del total de lecturas brutas de la cepa silvestre y mutante $\Delta hrpL$, respectivamente (Tabla 4). En el alineamiento se utilizó como referencia la secuencia del cromosoma de Psv NCPPB 3335 fusionada a la de sus tres plásmidos nativos, pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C. Como resultado se obtuvieron que un 99,67% del total de las lecturas limpias de la cepa silvestre y un 99,66% del total de las de la cepa mutante, alinearon con la secuencia de referencia. Estos datos son similares a los obtenidos en otros análisis *RNAseq* bacterianos en los que los porcentajes de lecturas mapeadas se encuentran entre 96% y 97% (Jalan *et al.*, 2013; Fishman *et al.*, 2018).

Tabla 4. Resumen de los datos obtenidos en la secuenciación *RNAseq*.

Muestra ^a	Lecturas brutas ^b	Lecturas limpias ^c	Lecturas rechazadas (%) ^c	Lecturas alineadas con la referencia (%) ^d
Psv NCPPB 3335				
Réplica 1	41.289.538	33.083.850	19,87	99,75
Réplica 2	40.704.762	33.925.884	16,65	99,60
Total silvestre	81.994.300	67.009.734	18,28	99,67
Psv NCPPB 3335 $\Delta hrpL$				
Réplica 1	47.862.912	40.450.444	15,49	99,67
Réplica 2	47.974.950	40.705.092	15,15	99,65
Total $\Delta hrpL$	95.837.862	81.155.536	15,32	99,66
Total RNAseq	177.832.162	148.165.270	16,68	99,67

^aEl total silvestre y $\Delta hrpL$ representan la suma de todas las lecturas obtenidas en las dos réplicas biológicas de cada cepa. El total *RNAseq* representa la suma de todas las lecturas obtenidas en la secuenciación *RNAseq*.

^bLecturas brutas obtenidas en la secuenciación *RNAseq*.

^cLecturas limpias y porcentaje de lecturas rechazadas obtenidas tras el preprocesamiento con *SeqTrimNext*.

^dPorcentaje de lecturas limpias que alinean con la referencia. Como genoma de referencia se utilizó la secuencia del cromosoma de Psv NCPPB 3335 fusionada a la de sus tres plásmidos nativos, pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C.

Una vez realizado el procesamiento bioinformático, se utilizó el paquete de R Cumberbund y otras librerías de R para poder inspeccionar las muestras analizadas y analizar si existían diferencias entre las dos réplicas biológicas de la misma cepa. En el diagrama de cajas mostrado en la Figura 5 se representa la distribución de los valores de expresión normalizados entre las diferentes muestras, observándose una distribución similar de los valores de expresión normalizados, lo que indica que se han solucionado los sesgos técnicos producidos por las diferencias en la profundidad de secuenciación, es decir, en la variación en el número de lecturas totales obtenidos en cada réplica.

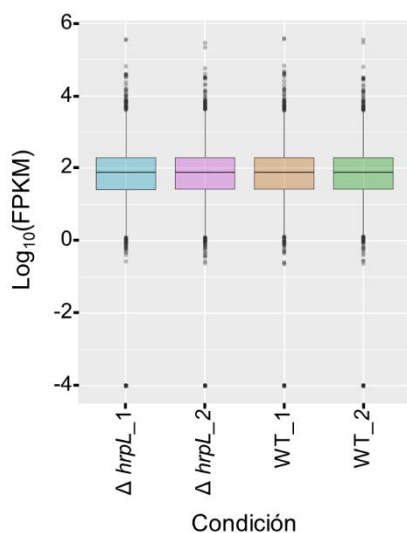


Figura 5. Análisis de la expresión génica de las réplicas biológicas utilizadas en el estudio *RNAseq* de la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 y su mutante $\Delta hrpL$. El diagrama de cajas representa la distribución de los valores de expresión génica (FPKM, fragmentos por kilobase de fragmentos de gen por millón de lecturas) normalizados ($\log_{10}$ FPKM) de las réplicas biológicas de ambas cepas.

Genes del regulón HrpL de Psv NCPPB 3335 identificados mediante transcriptómica y predicción bioinformática

La identificación de los genes que constituyen el regulón HrpL de la cepa Psv NCPPB 3335 se realizó mediante dos abordajes distintos: (i) mediante un análisis comparativo *RNAseq* entre la cepa Psv NCPPB 3335 silvestre y su mutante $\Delta hrpL$ en un medio de inducción Hrp y, (ii) mediante predicción bioinformática de genes dependientes de HrpL en base a la presencia de una caja *hrp* presente corriente arriba del codón de inicio de los genes codificados en el genoma de Psv NCPPB 3335.

En el análisis *RNAseq*, se realizó una comparativa de los genes expresados entre la cepa silvestre y la cepa mutante $\Delta hrpL$ en medio Hrp. El estudio de la expresión diferencial (ED) se realizó con el programa Cufflinks incluido dentro del paquete Tuxedo, tal y como se describe en Material y Métodos y utilizando un valor $q < 0,05$ (Figura 6A). En total se identificaron 53 genes ED significativos entre la cepa silvestre y el mutante $\Delta hrpL$, de los que 4 se encontraron

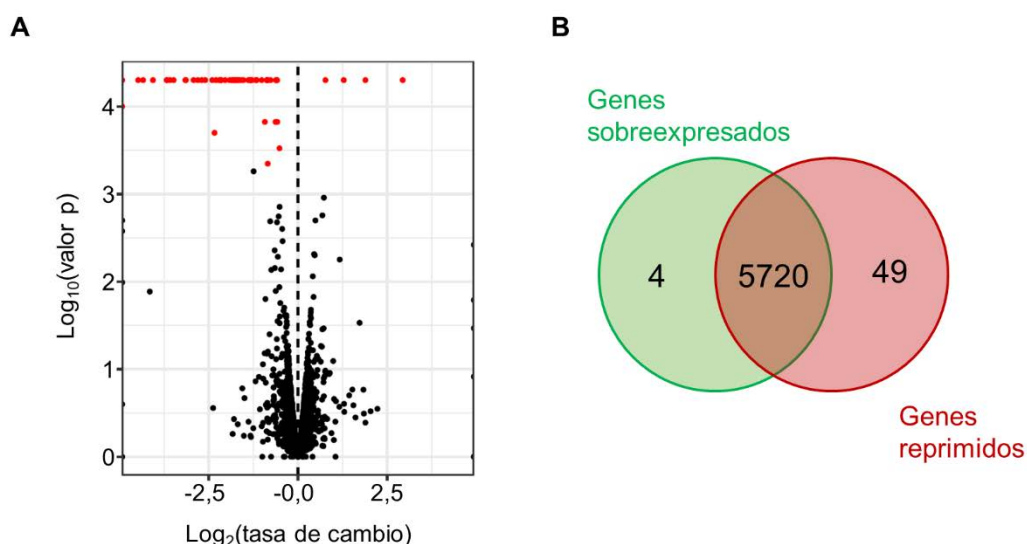


Figura 6. Identificación de genes dependientes de HrpL en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. (A) Gráfico de volcán que muestra los genes expresados diferencialmente (ED) entre la cepa Psv NCPPB 3335 y su mutante $\Delta hrpL$. Tras el ensamblaje realizado con Cufflinks, se identificaron los transcritos ED significativos con valores q (valor P con el ajuste FDR, del inglés *False Discovery Rate*) menores de 0,05. Los puntos rojos representan los genes ED significativos y los puntos negros los genes que no se consideran ED. (B) Diagrama de Venn de los genes sobreexpresados y reprimidos significativamente en la cepa mutante frente a la cepa silvestre en el análisis *RNAseq*.

sobreexpresados en el mutante $\Delta hrpL$ y 49 reprimidos (Figura 6B). Los genes ED se clasificaron manualmente en 6 categorías funcionales, en base a su anotación y/o a la anotación de las proteínas codificantes con las que presentaban mayor identidad en un análisis BLASTp en NCBI, las cuales son, T3SS *pilus*/chaperonas, T3E conocidos/hipotéticos, toxinas, proteínas hipotéticas, señalización y metabolismo secundario (Figura 7A). Las categorías con un mayor número de genes ED se integraron en las categorías T3SS *pilus*/chaperonas, T3E

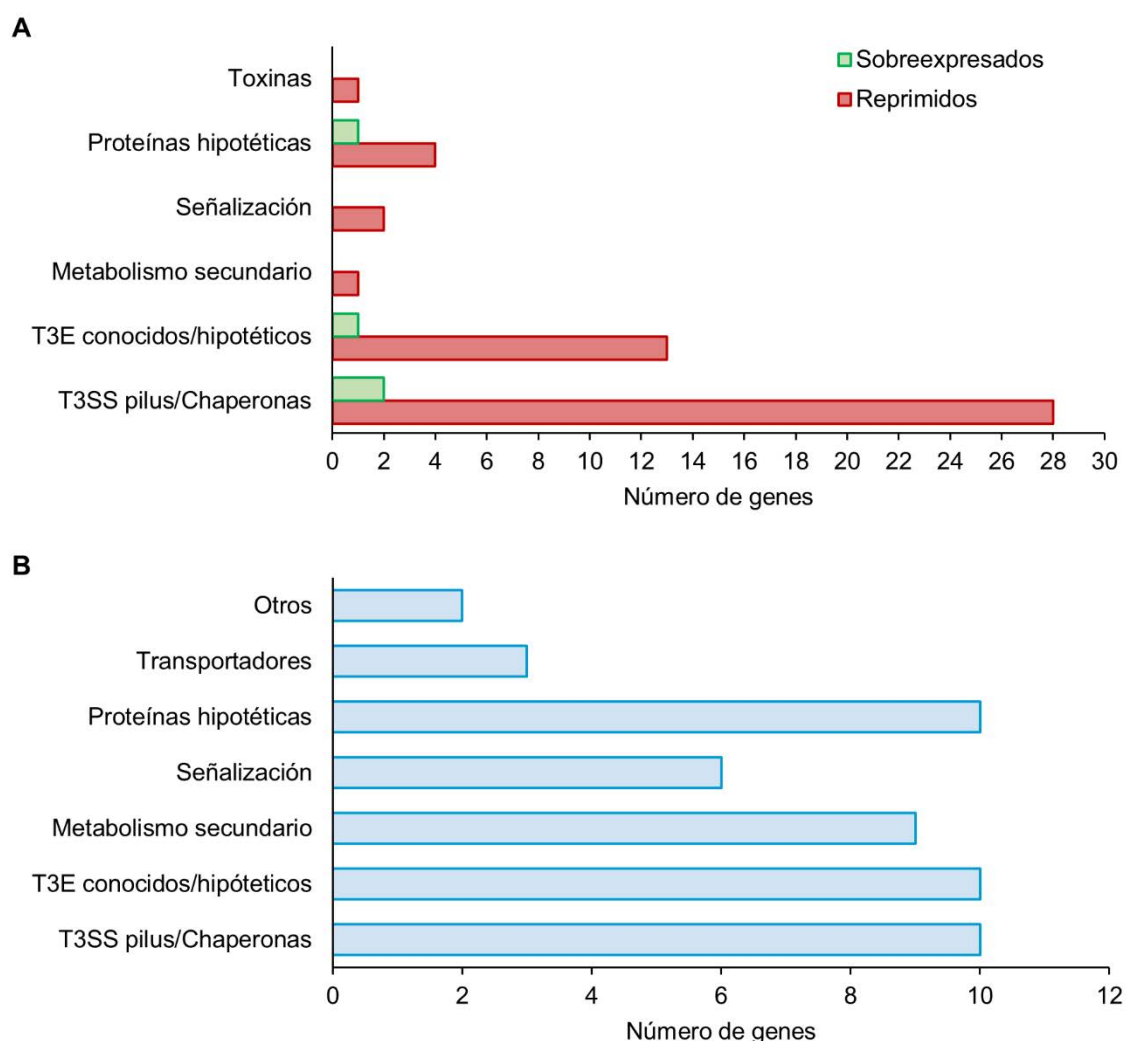


Figura 7. Clasificación en categorías funcionales del regulón HrpL en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. Los genes se clasificaron manualmente en categorías funcionales en base a su anotación y/o a la anotación de las proteínas codificadas que presentaban mayor homología en un análisis BLASTp en NCBI. **(A)** Clasificación en categorías funcionales de los genes del regulón HrpL identificados mediante *RNAseq*. En verde y rojo, se representan los genes sobreexpresados y reprimidos, respectivamente, en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre. **(B)** Clasificación en categorías funcionales de los genes codificados en el genoma de NCPPB 3335 en los que se ha identificado una posible caja *hrp* mediante predicción bioinformática (valor *hrp* ≥ 2500).

conocidos/hipotéticos y proteínas hipótéticas, lo que coincide con lo previamente descrito para otros regulones HrpL identificados en otras cepas del complejo *P. syringae* (Mucyn *et al.*, 2014).

Para la predicción bioinformática de genes posiblemente dependientes del regulador HrpL, se realizó una búsqueda de cajas *hrp* en la región promotora (500 nucleótidos antes del codón de inicio) de los marcos abiertos de lectura codificados en el genoma de Psv NCPPB 3335, utilizando el programa *miGenomes* y siguiendo el criterio descrito en Materiales y Métodos. Se identificaron 50 genes con una posible caja *hrp* en su región promotora, que se clasificaron manualmente, siguiendo el mismo criterio anteriormente mencionado para los genes identificados mediante *RNAseq*. Entre estas categorías, se descartó la categoría toxinas, por no incluir ningún gen, y se incluyeron dos nuevas, transportadores y otros (Figura 7B). Entre las categorías que presentaron un mayor número de genes se encuentran las categorías T3SS pilus/chaperonas, T3E conocidos/hipotéticos, proteínas hipótéticas y metabolismo secundario. A excepción de la categoría metabolismo secundario, todas las demás coinciden con las categorías con mayor número de genes del análisis *RNAseq* (Figura 7).

Se realizó una comparativa de los genes inducidos por HrpL identificados en el análisis *RNAseq* con los genes con una posible caja *hrp* identificados mediante predicción bioinformática y se observó que del total de genes identificados por ambos métodos coincidían 19 (Figura 8).

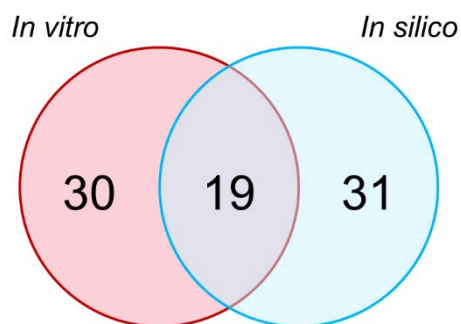


Figura 8. Identificación del regulón HrpL de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. Representación mediante diagrama de Venn de la comparativa de los resultados obtenidos mediante *RNAseq* (*in vitro*), con los obtenidos mediante identificación bioinformática en base a la presencia de una caja *hrp* en la región promotora de los genes codificados en el genoma de Psv NCPPB 3335 (*in silico*).

Genes estructurales del T3SS y T3E regulados por HrpL en Psv NCPPB 3335

Los genes estructurales y reguladores del T3SS identificados bajo la regulación de HrpL mediante el análisis *RNAseq* y/o mediante la predicción bioinformática se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 9. En el análisis *RNAseq* se observó que, a excepción de los genes *hrpK* y *hrcS*, la expresión de todos los genes del clúster del T3SS de Psv NCPPB 3335 se encontraba significativamente reprimida en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre (Tabla 5). Aunque el gen *hrcS*, que forma parte del operón *hrpP*, no presentaba un valor q significativo, su expresión también se vio reprimida, al igual que la del resto de genes del operón, con un valor de $\log_2$ (tasa de cambio) de -4,15 (Figura 9). Por el contrario, la expresión del gen *hrpK* está significativamente sobreexpresada en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre (Tabla 5, Figura 9), lo que se contradice con lo previamente descrito para otras cepas del complejo *P. syringae* (Mucyn *et al.*, 2014). El gen *hrpK*, es el primer gen de un operón compuesto por la chaperona *shcA* y el T3E *hopA2*, como se muestra en la Figura 9, ambos genes también se encontraron sobreexpresados en la cepa $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre. Bioinformáticamente se detectaron cajas *hrp* en las regiones promotoras de los primeros genes de todos los operones que constituyen el T3SS, con la excepción de los genes *hrpP* y *hrpK*, resultados que coinciden con los valores de expresión diferencial encontrados en el *RNAseq* para el gen *hrpK*.

Tabla 5. Genes estructurales del T3SS y genes asociados al T3SS regulados por HrpL en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

Número de identificación ^a	Gen	O ^b	RNAseq ^c		Valor <i>hrp</i> ^d	Reguladas por HrpL en otros patovares ^e					
			Valor q	Log ₂ (tc)		Pto	Pph	Psy	Pla	Pja	Por
T3SS <i>pilus</i>											
PSA3335_RS10685	<i>hrpk</i>	1	0,006	2,93	nd	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10680	<i>hrpL</i>	1	0,006	#	nd						
PSA3335_RS10675	<i>hrpJ</i> *	1	0,006	-4,34	2779	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10670	<i>hrcV</i>	2	0,006	-2,81		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10665	<i>hrpQ</i>	3	0,006	-2,93		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10660	<i>hrcN</i>	4	0,006	-2,70		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10655	<i>hrpO</i>	5	0,006	-4,48		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10650	<i>hrpP</i> *	1	0,006	-3.49	nd	+	+	+	+	+	+

Tabla 5. Continuación

Número de identificación ^a	Gen	O ^b	RNAseq ^c		Valor <i>hrp</i> ^d	Reguladas por HrpL en otros patovares ^e					
			Valor q	Log ₂ (tc)		P _{to}	P _{ph}	P _{sy}	P _{la}	P _{ja}	P _{ot}
T3SS <i>pilus</i>											
PSA3335_RS10645	<i>hrcQA</i>	2	0,006	-4,06	2585	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10640	<i>hrcQB</i>	3	0,006	-3,59		+	+	+	+		+
PSA3335_RS10635	<i>hrcR</i>	4	0,006	-2,04		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10630	<i>hrcS</i>	5	NS	-4,15		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10625	<i>hrcT</i>	6	0,006	-1,71		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10620	<i>hrcU</i>	6	0,006	-1,92		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10605	<i>hrpV</i>	5	0,006	-1,18		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10600	<i>hrpT</i>	4	0,022	-2,34		+	+	+	+	+	
PSA3335_RS10595	<i>hrcC</i>	3	0,006	-2,40		+	+	+	+	+	
PSA3335_RS10590	<i>hrpG</i>	2	0,006	-3,67	2796	+	+	+	+	+	
PSA3335_RS10585	<i>hrpF*</i>	1	0,006	-3,16	2796	+	+	+	+		+
PSA3335_RS10580	<i>hrpE</i>	6	0,006	-1,73		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10575	<i>hrpD</i>	5	0,006	-1,32		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10570	<i>hrcJ</i>	4	0,006	-1,79		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10565	<i>hrpB</i>	3	0,006	-2,16		+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10560	<i>hrpZ</i>	2	0,006	-2,60	2739	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10555	<i>hrpA*</i>	1	0,006	-3,68	2739	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10550	<i>hrpS</i>	2	NS	0,03							
PSA3335_RS10545	<i>hrpR*</i>	1	NS	0,00							
Proteínas asociadas al T3SS											
PSA3335_RS07245	<i>hopAK1</i>		0,006	-1,85	2741		+				
PSA3335_RS10495	<i>hrpW1</i>		0,006	-1,66	nd	+		+	+	+	+
PSA3335_RS10540	<i>hrpH</i>		0,006	-1,60	nd	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS10690	<i>shcA</i>	2	0,006	1,89		+			+		
PSA3335_RS15920	<i>shcV</i>		0,006	-3,14	2701	+	+				+
PSA3335_RS25240	<i>shcF</i>	1	0,006	-1,33	2699	+	+				
PSA3335_RS10520	<i>shcM</i>	1	-	-	2685	+	+	+	+		+

^aNúmero de identificación en NCBI.

^bO, operón. El número indica el orden del gen dentro del operón del que forman parte (de 5' a 3'). El sombreado azul indica el primer gen de los operones y los genes transcritos individualmente.

^cGenes identificados mediante RNAseq. Se consideraron expresiones diferenciales significativas las de aquellos genes que mostraron un valor q < 0,05; NS, no significativo. La tasa de cambio (tc) se refiere a la tasa de expresión media obtenida en el mutante $\Delta hrpL$ versus la cepa silvestre en las dos réplicas biológicas. Los valores de tasa de cambio negativos (rojo) corresponden a los genes reprimidos en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre y, los positivos (verdes) a los sobreexpresados en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre. #, indica que la expresión en el mutante $\Delta hrpL$ es cero.

^dPredicción bioinformática de posibles cajas *hrp* corriente arriba del inicio de los genes en el genoma de Psv NCPPB 3335 (valor *hrp* ≥ 2500); nd, no detectada.

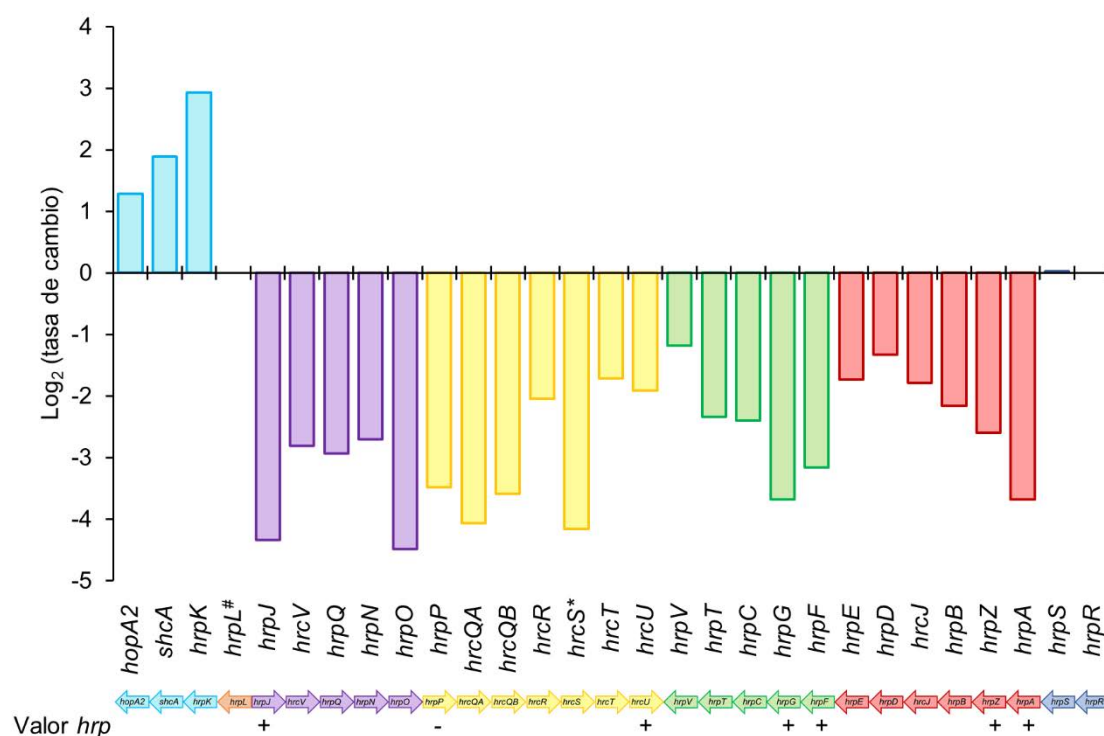


Figura 9. Regulación por HrpL del clúster *hrp/hrc* del sistema de secreción Tipo III en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. En la gráfica se representa el $\log_2$ de la tasa de cambio de los genes que mostraron un valor $q < 0,05$ en el análisis de la expresión diferencial *RNAseq* realizado entre la cepa mutante $\Delta hrpL$ y la cepa silvestre. Los valores negativos y positivos indican que los genes están reprimidos y sobreexpresados en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre, respectivamente. #, la expresión de *hrpL* es cero en el mutante $\Delta hrpL$. *, no se observó un valor $q < 0,05$ para el gen *hrcS*. Los valores de *hrp* + y - indican si se ha identificado bioinformáticamente una caja *hrp* en la región promotora de los genes del clúster *hrp/hrc*. Los genes con un mismo color forman parte del mismo operón.

En el análisis *RNAseq* también se encontraron reprimidas en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre los genes codificadores de cinco proteínas asociadas al T3SS, entre las que se encontraban dos chaperonas (*shcV* y *shcF*) y tres *helpers* (*hopAK1*, *hrpW1* y *hrpH*) (Tabla 5). De estas proteínas, el codificante de la chaperona ShcF forma un operón con *avrRpm2*, cuya expresión también se encuentra reprimida (Tabla 6). En la predicción bioinformática de las cajas *hrp* se detectaron tres de los cinco genes codificadores de proteínas asociadas al T3SS (*hopAK1*, *shcV* y *shcF*) y, además, el gen de la chaperona ShcM, que forma un operón con *hopM1*, gen también detectado mediante el *RNAseq* (Tabla 5).

Tabla 6. Genes del repertorio de T3E regulados por HrpL en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

Número de identificación ^a	Gen ^b	RNAseq ^c		Valor <i>hrp</i> ^d	Effective DB ^e	Reguladas por HrpL en otros patovares ^f					
		Valor q	Log ₂ (tc)			Pto	Pph	Psy	Pla	Pja	Por
T3E descritos											
PSA3335_RS10535*	<i>avrE1</i>		NS	nd	0,9999	+	+	+	+	+	+
PSA3335_RS01620	<i>avrPto1^b</i>	0,006	-2,21	2832	1,0000	+		+	+		+
PSA3335_RS25235	<i>avrRpm2</i>	0,006	-0,77	2699	1,0000						
PSA3335_RS05460	<i>hopA1</i>		NS	nd	nd	+			+		
PSA3335_RS10695	<i>hopA2</i>	0,006	1,28	nd	nd						
PSA3335_RS10490	<i>hopAA1</i>	0,006	-2,29	2728	nd	+		+	+	+	+
PSA3335_RS02535	<i>hopAB1</i>	0,006	-0,87	2591	0,9999		+	+			
PSA3335_RS24240	<i>hopAE1</i>	0,006	-1,16	nd	1,0000				+		
PSA3335_RS29755*	<i>hopAF1-1^b</i>		NS	nd	1,0000						
PSA3335_A0028	<i>hopAF1-1</i>		NS	nd	nd				+		
PSA3335_RS29760*	<i>hopAF1-2^b</i>		NS	nd	nd	+	+	+			+
PSA3335_RS14505	<i>hopAH2</i>		NS	nd	1,0000						
PSA3335_RS24880	<i>hopAJ2</i>		NS	nd	nd						
PSPSV_B0010	<i>hopAO1^b</i>	0,006	-0,59	nd	nd	+			+		+
PSA3335_RS12020	<i>hopAO2^b</i>		NS	2579	nd						
PSA3335_RS02305*	<i>hopAS1</i>		NS	nd	nd		+				
No anotado	<i>hopAT1</i>		NS	nd	nd		+				
PSA3335_RS12045*	<i>hopAU1</i>	0,006	-0,84	nd	nd		+				
PSA3335_RS20790*	<i>hopAZ1</i>	0,006	-1,53	2770	nd				+		
PSA3335_RS19200	<i>hopBK1^b</i>		NS	nd	nd						
PSA3335_RS02885*	<i>hopBL1^b</i>		NS	nd	nd						
PSA3335_RS03825*	<i>hopBL2^b</i>		NS	nd	nd						
PSA3335_RS02795	<i>hopBM1</i>		NS	2546	nd	+					
PSA3335_RS28230	<i>hopD1</i>		NS	nd	1,0000		+				+
PSA3335_RS21975	<i>hopG1</i>		NS	2634	1,0000	+	+				+
PSA3335_RS24700	<i>hopI1</i>	0,006	-1,02	nd	nd	+	+	+	+	+	
PSA3335_RS10525	<i>hopM1</i>	0,006	-1,29	nd	nd	+		+	+	+	+
PSA3335_RS28225	<i>hopQ1</i>		NS	2554	0,9998	+	+				+
PSA3335_RS28250	<i>hopR1</i>	0,006	-0,60	nd	nd	+	+				+
PSA3335_RS15915*	<i>hopV1</i>	0,006	-1,80	nd	nd	+	+				+
PSA3335_RS29445	<i>hopW1</i>		NS	nd	nd						
Nuevo posible T3E											
PSA3335_RS02560	<i>xopAD</i>	0,032	-0,52	2789	1,0000		+				

^aNúmero de identificación en NCBI. Los asteriscos indican genes cuya longitud de la anotación de NCBI no coincide con la que se ha descrito previamente en *HopDatabase* (<http://www.pseudomonas-syringae.org/>).

^bGenes cuya expresión dependiente del factor HrpL ha sido demostrada experimental mediante qRT-PCR en la cepa Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b)

Tabla 6. Continuación

^cGenes identificados mediante *RNAseq*. Se consideraron significativas las expresiones diferenciales con un valor $q < 0,05$; NS, no significativo. La tasa de cambio (tc) se refiere a la tasa de expresión media obtenida en el mutante $\Delta hrpL$ versus la cepa silvestre en las dos réplicas biológicas. Los valores de tasa de cambio negativos (rojo) corresponden a los genes reprimidos en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre y, los positivos (verdes) a los sobreexpresados en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre. #, indica que la expresión en el mutante $\Delta hrpL$ es cero.

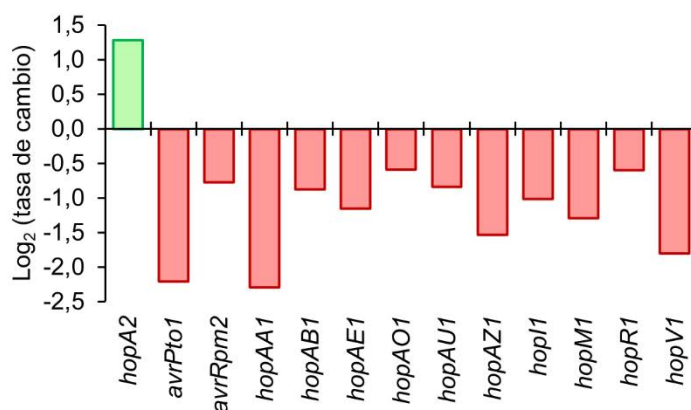
^dPredicción bioinformática de cajas *hrp* corriente arriba del inicio de los genes en el genoma de Psv NCPPB 3335 (valor *hrp* ≥ 2500); nd, no detectada.

^eEl programa EffectiveDB (Eichinger *et al.*, 2015) proporciona un valor (0,999-1) a aquellas proteínas en las que se detecta la región N-terminal característica de secreción a través del T3SS; nd, no detectada.

^fCepas en las que se ha identificado la dependencia del factor de transcripción HrpL mediante *RNAseq* de una proteína homóloga a la identificada en Psv NCPPB 3335 (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). Pto, Pph, Psy, Pla, Pja y Por, corresponden con las cepas *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, *P. syringae* pv. *syringae* B728A, *P. syringae* pv. *lachrymans* 107, *P. syringae* pv. *japonica* MAFF 301072 y *P. syringae* pv. *oryzae* 1_6, respectivamente.

Con respecto al repertorio de T3E conocidos de Psv NCPPB 3335, del total de 31 T3E se detectaron mediante *RNAseq* 12 genes cuya expresión estaba reprimida en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre (*avrPto1*, *avrRpm2*, *hopAA1*, *hopAB1*, *hopAE1*, *hopAE1*, *hopAU1*, *hopAZ1*, *hopI1*, *hopM1*, *hopR1* y *hopV1*), y uno cuya expresión estaba sobreexpresada (*hopA2*) (Tabla 6, Figura 10A). De estos genes codificantes de T3E, tres coincidieron con los ocho cuya dependencia de HrpL se ha descrito previamente mediante RT-qPCR en Psv NCPPB 3335 en las mismas condiciones utilizadas en este estudio (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b) (Tabla 6). Bioinformáticamente, se identificaron ocho genes codificadores de T3E con una posible caja *hrp* y diez cuyas proteínas codifican posibles secuencias de translocación a través del T3SS en el extremo N-terminal (Tabla 6). En la Figura 10 se muestra la comparativa de los T3E conocidos de Psv NCPPB 3335 identificados mediante los tres métodos, siendo el *RNAseq* el método por el que se identificaron un mayor número de T3E. Solo *avrPto1*, *avrRpm2* y *hopAB1* se identificaron por los tres métodos a la vez (Figura 10). Además, mediante los tres métodos se identificó un nuevo posible T3E similar al presente en cepas del género *Xanthomonas* XopAD que presenta un homólogo en Pph 1448A para el que ha sido demostrada su dependencia de HrpL (Tabla 6).

A



B

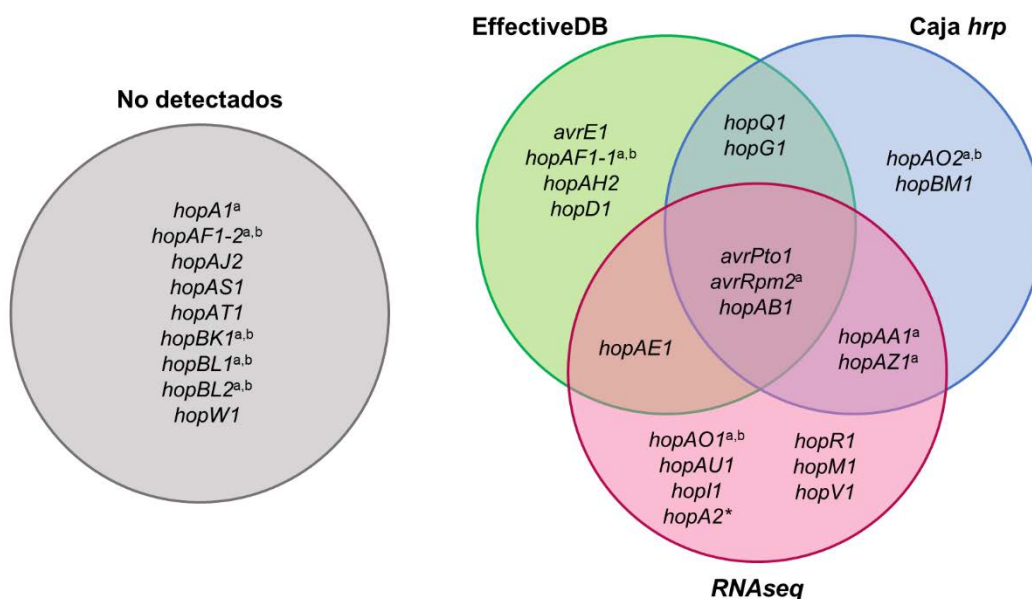


Figura 10. Genes codificantes de T3E homólogos a otros conocidos y regulados por HrpL en *P. savastanoi* pv. NCPPB 3335. (A) En la gráfica se representa el log₂ de la tasa de cambio de los genes codificantes de T3E con un valor $q < 0,05$ en el análisis de la expresión diferencial *RNAseq* comparativo entre la cepa mutante $\Delta hrpL$ y la cepa silvestre. Los valores negativos y positivos indican que los genes están reprimidos y sobreexpresados en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre, respectivamente. (B) Comparativa de los genes codificadores de T3E identificados mediante *RNAseq* y las predicciones bioinformáticas de la caja *hrp* y de la secuencia N-terminal de translocación a través del T3SS (EffectiveDB) realizada con el programa *miGenome*. Como “no detectados” se indican aquellos genes descritos en Psv NCPPB 3335 que no se han identificado por ninguno de los 3 métodos. ^aIndica aquellos genes de Psv NCPPB 3335 para los que se ha demostrado su translocación a través del T3SS experimentalmente; ^bindica aquellos genes para los que se ha demostrado su dependencia a HrpL mediante RT-qPCR en Psv NCPPB 3335. *, indica que HrpL reprime la expresión de *hopA2*.

Genes codificadores de proteínas hipotéticas y otros genes regulados por HrpL en Psv NCPPB 3335

El desglose de las proteínas codificadas por los genes del regulón HrpL identificados en el estudio *RNAseq* e incluidos en las categorías proteínas

hipotéticas, toxinas, señalización y proteínas relacionadas con metabolitos secundarios se muestran en la Tabla 7. Se identificaron cuatro genes codificadores de proteínas hipotéticas reprimidos y uno sobreexpresado. De entre ellos, se identificó una posible caja *hrp* en las regiones promotoras de los genes *HP02555* y *HP29775*, y una secuencia N-terminal de translocación a través del T3SS en la proteína codificada por *HP07405*. Además, bajo la regulación de HrpL se ha identificado también el primer gen del operón implicado en la síntesis de la toxina fevamina (*hsvA*), así como los codificantes de un receptor de sideróforos dependiente de TonB, una proteína hipotética que presenta homología con una sintasa de la N-acil homoserina lactona, y una FMN transferasa (Tabla 7). Para estos dos últimos genes, se identificó bioinformáticamente una caja *hrp* en sus regiones promotoras.

Además de los genes ya mencionados, bioinformáticamente se identificaron 26 genes más no identificados en el análisis *RNAseq* con una caja *hrp* en su región promotora (Tabla 8). Con el programa *miGenomes* también se realizó un análisis de la secuencia N-terminal de las proteínas codificadas por estos genes, con el objetivo de identificar nuevos posibles T3E. Para analizar si estos genes formaban parte de un operón, se realizó un estudio de su contexto genómico, tal y como se indica en Material y Métodos. Además, de todos ellos se realizó una identificación de dominios funcionales en la base de datos Pfam (El-Gebali *et al.*, 2018). En el caso de las proteínas hipotéticas, con el objetivo de dilucidar su posible función, se analizó también su homología con otras proteínas cuya estructura se encuentra en el servidor HHPred (Söding *et al.*, 2005). De estos 26 genes, seis presentaron homología con genes cuya dependencia de HrpL se ha descrito previamente en otras cepas del complejo *P. syringae* (Tabla 8). Entre los 26 genes, cabe destacar los genes *PSA3335_RS11510* y *PSA3335_RS10865*, codificantes de proteínas que presentan la secuencia de translocación T3SS, indicando que podrían ser nuevos T3E, y los genes *iaaL* (alelos *iaaLPsv* e *iaaLPsn*) implicados en la síntesis del ácido indol-3-acético-lisina, los cuales presentan homólogos en la cepa Pto DC3000 y Por 1_6 cuya dependencia de HrpL se ha descrito previamente.

Tabla 7. Proteínas del regulón HrpL no relacionadas con el T3SS e identificadas mediante RNAseq en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

Número de identificación ^a	Anotación	Tamaño (aa)	Dominios ^b		Gen ^c	RNAseq ^d		Valor <i>hrp</i> ^e	Effective DB ^f	Reguladas por HrpL en otros patovares ^g					
			Pfam	HHPred		Valor q	Log ₂ (tc)			Pto	Pph	Psy	Pla	Pja	Por
Proteínas hipotéticas															
PSA3335_RS02555	Proteína hipotética	61	-	-	HP02555	0,006	-1,39	2789	nd						
PSA3335_RS07405	Proteína hipotética	41	-	-	HP07405	0,012	#	nd	0,9999	+					
PSA3335_RS29775	Proteína hipotética	40	-	-	HP29775	0,006	-2,16	2785	nd						
PSA3335_RS25230	Proteína hipotética	221	-	-	HP25230	0,017	-0,58	nd	nd						
PSA3335_RS28495	Proteína hipotética	260	-	-	HP28495	0,006	0,77	nd	nd						
Toxinas															
PSA3335_RS07880	Amidinotransferasa	366	-	Proteína HsvA	hsvA ¹	0,006	-0,87	nd	nd	+			+		+
PSA3335_RS07885	Quinasa HPr	418	-	-	hsvB ²		NS	nd	nd	+			+		+
PSA3335_RS07890	Proteína hipotética	414	-	-	hsvC ³		NS	nd	nd	+			+		+
Señalización															
PSA3335_RS09570	Receptor de sideróforos dependiente de TonB	782	PF07660	Transportador de dicitrato de hierro (III)		0,006	-0,62	nd	nd						
PSA3335_RS05360	Proteína hipotética	212	-	N-acilhomoserina lactona sintasa	HP05360	0,006	-1,34	2763	nd						+
Metabolitos secundarios															
PSA3335_RS20310	FMN transferasa	343	PF02424	FMN transferasa		0,017	-0,63	2783	nd	+	+	+	+	+	+

^aNúmero de identificación en NCBI.

^bIdentificación de dominios funcionales en la base de datos Pfam (El-Gebali *et al.*, 2018); estructura proteica homóloga a la de otras proteínas con una probabilidad mayor del 90% según la base de datos HHPred (Söding *et al.*, 2005).

^c1, 2 y 3 indican la posición de los genes (del extremo 5' al 3') que codifican el operón de síntesis de la fevamina A.

Tabla 7. Continuación.

^cGenes identificados mediante *RNAseq*. Son significativos aquellas expresiones diferenciales con un valor $q < 0,05$; NS, no significativo. La tasa de cambio (tc) se refiere a la tasa de expresión media obtenida en el mutante $\Delta hrpL$ versus la cepa silvestre en las dos réplicas biológicas. Los valores de tc negativos (rojo) corresponden a los genes reprimidos en el mutante $\Delta hrpL$ y, los positivos (verdes) a los sobreexpresados en la cepa mutante $\Delta hrpL$. #, indica que la expresión en el mutante $\Delta hrpL$ es cero.

^dSe han identificado mediante predicción bioinformática las posibles cajas *hrp* corriente arriba del inicio de los genes en el genoma de Psv NCPPB 3335 (valor *hrp* ≥ 2500); nd, no detectada.

^eEl programa EffectiveDB (Eichinger *et al.*, 2015) proporciona un valor (0,999-1) a aquellas proteínas en las que se detecta la región N-terminal característica de secreción a través del T3SS; nd, no detectada.

^fCepas en las que se ha identificado la dependencia al factor de transcripción HrpL mediante *RNAseq* de una proteína homologa a la identificada en Psv NCPPB 3335 (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). Pto, Pph, Psy, Pla, Pja y Por, corresponden con las cepas *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, *P. syringae* pv. syringae B728A, *P. syringae* pv. lachrymans 107, *P. syringae* pv. japonica MAFF 301072 y *P. syringae* pv. oryzae 1_6, respectivamente.

Tabla 8. Predicción bioinformática de cajas *hrp* en la región promotora de los genes codificados en el genoma de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

Número de identificación ^a	Anotación	Tamaño (aa)	O ^b	Posición ^b	Valor <i>hrp</i> ^c	Effective DB ^d	Pfam ^e	HHPred ^f	Reguladas por HrpL				
									Pto	Pph	Psy	Pla	
Metabolismo secundario													
PSA3335_RS07710#	Alcohol deshidrogenasa	85	si*	1	2718	nd	PF08240	-	+	+	+	+	
PSA3335_RS12335	Alcohol deshidrogenasa	389	si	2	2624	nd	PF00465	-					
PSA3335_RS26215	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	270	si	2	2586	nd	PF01553	-					
PSA3335_RS28260	<i>iaaLPsv</i>	397	si	2	2571	nd	-	-	+			+	
PSA3335_RS05405	<i>iaaLPsn</i>	395	no	-	2568	nd	-	-					
PSA3335_RS27660	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	354	no	-	2539	nd	PF01116	-					
PSA3335_RS18565	Aminometiltransferasa (<i>soxA</i>)	968	si	5	2511	nd	PF01571 PF17806 PF13510 PF08669 PF07992 PF04267	-					
PSA3335_RS18560	Subunidad de sarcosina oxidasa delta (<i>soxD</i>)	101	si	4	2511	nd		-					
Señalización													
PSA3335_RS04530	Regulador transcripcional de la familia TetR	220	si	1	2587	nd	PF08362 PF00440	-					
PSA3335_RS04245	Regulador transcripcional	80	no	-	2572	nd	PF13560						
PSA3335_RS20160	Regulador de respuesta de unión al ADN (<i>luxR</i>)	222	si	2	2570	nd	PF00072 PF00196		+	+	+	+	
PSA3335_RS25950	Regulador de respuesta	121	si	2	2504	nd	PF00072						
PSA3335_RS07965	Regulador de la respuesta a la quimiotaxis proteína-glutamato metiltransferasa	358	si	9	2500	nd	PF01339 PF00072						

Tabla 8. Continuación.

Número de identificación ^a	Anotación	Tamaño (aa)	O ^b	Posición ^b	Valor <i>hrp</i> ^c	Effective DB ^d	Pfam ^e	HHPred ^f	Reguladas por HrpL en otros patovares ^g				
									Pto	Pph	Psy	Pla	Pja
Proteínas hipotéticas													
PSA3335_RS00675	Proteína hipotética	224	si	2	2580	nd	-	Haloácido deshalogenasa					
PSA3335_RS11510	Proteína hipotética	289	si	2	2577	0,9994	PF01904	-					
PSA3335_RS23410#	Proteína hipotética	48	si	2	2567	nd	PF07551	-					
PSA3335_RS24280#	Proteína hipotética	36	no	-	2542	nd	-	-					
PSA3335_RS13135	Proteína hipotética	79	no	-	2539	nd	-	-					
PSA3335_RS26045	Proteína hipotética	107	si	5	2531	nd	PF11872	-	+	+			+
PSA3335_RS06145	Proteína hipotética	166	si	2	2518	nd	PF14113	Efectores del T6SS Tae4					
PSA3335_RS10865	Proteína hipotética	290	si	1	2517	0,9998	-	Proteína de la cápsida de T7					
Transportadores													
PSA3335_RS07870	Proteína de flujo de macrólidos	395	no	-	2560	nd	PF07690						
PSA3335_RS09775	Permeasa transportadora de aminoácidos ABC	365	si	3	2528	nd	PF00528						
PSA3335_RS20980	Transportador MFS	399	no	-	2523	nd	PF07690						
Otros													
PSA3335_RS15760	Isomerasa peptidil-prolil cis-trans	91	no	-	2506	nd	PF00639						
PSA3335_RS01395	Proteína que contiene un dominio DUF2628	141	no	-	2501	nd	PF10947						

^aNúmero de identificación en NCBI. #, indica que son pseudogenes.

^bIndica si los genes identificados forman parte de un operón o no y la posición que ocupan dentro del operón. *, indica que se ha detectado una caja *hrp* para el primer gen del operón. La predicción de los operones se ha realizado con el programa *Fgenesb* de *Sofberry* (Solovyev & Salamov, 2011) y con el servidor web *Operon-mapper* (Taboada *et al.*, 2018).

Tabla 8. *Continuación.*

^cSe ha identificado mediante predicción bioinformática las posibles cajas *hrp* corriente arriba del inicio de los genes del genoma de Psv NCPPB 3335 (valor *hrp* $\geq$ 2500); nd, no detectada.

^dEl programa EffectiveDB (Eichinger *et al.*, 2015) proporciona un valor (0,999-1) a aquellas proteínas en las que se detecta la región N-terminal característica de secreción a través del T3SS; nd, no detectada.

^eIdentificación de dominios funcionales en la base de datos Pfam (El-Gebali *et al.*, 2018).

^fIdentificación de homólogos estructurales utilizando el servidor web HHPred HHPred (Söding *et al.*, 2005). Se muestran exclusivamente los resultados que mostraron una probabilidad mayor del 90%.

^gCepas en las que se ha identificado mediante *RNAseq* la dependencia del factor de transcripción HrpL de una proteína homóloga a la identificada en Psv NCPPB 3335 (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). Pto, Pph, Psy, Pla, Pja y Por, corresponden con las cepas *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, *P. syringae* pv. syringae B728A, *P. syringae* pv. lachrymans 107, *P. syringae* pv. japonica MAFF 301072 y *P. syringae* pv. oryzae 1_6, respectivamente.

DISCUSIÓN

HrpL es esencial para la patogénesis y la inducción de la respuesta hipersensible en los patovares de *P. savastanoi* Psn, Psm, Psf y Psr

En este capítulo se ha demostrado que HrpL es esencial para la patogénesis y la inducción de la respuesta hipersensible en cepas de los patovares de *P. savastanoi* Psn, Psm, Psf y Psr (Figuras 2 y 3). Estos resultados demuestran que en estos patovares la funcionalidad del T3SS es dependiente del factor de transcripción HrpL, tal y como ocurre en la cepa Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014). Esta es la primera vez que se ha observado que un T3SS activo y funcional es necesario para la patogénesis en sus respectivos huéspedes y el desarrollo de la HR en huéspedes resistentes en los patovares de *P. savastanoi* Psm, Psf y Psr. La incapacidad de producir HR en las plantas de tabaco por la cepa Psm Ph3 coincide con los resultados previamente descritos (Pirc *et al.*, 2015), pudiendo deberse, como se ha descrito en el primer capítulo de esta tesis doctoral, a las diferencias encontradas en el repertorio de efectores de esta cepa con respecto al resto. La no aparición de una HR en las hojas de tabaco tras la inoculación de la cepa Psn ESC23 podría deberse a que se han utilizado diferentes variedades de tabaco en nuestros ensayos, puesto que es conocido que la especificidad de huésped determinada por el T3SS y su repertorio de T3E en *P. syringae* no ocurre solamente a nivel de especie-patovar sino también de raza-cultivar (Collmer *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2002; Fouts *et al.*, 2003; Cunnac *et al.*, 2009; Lindeberg *et al.*, 2009; Mansfield, 2009). En el ensayo HR aquí realizado en hojas de tomate, todas las cepas silvestres de *P. savastanoi* indujeron una HR, estableciendo que la var. Moneymaker es un buen modelo para estudiar la funcionalidad del T3SS en cepas de *P. savastanoi*, como previamente se ha descrito para el patovar Psm (Pirc *et al.*, 2015).

Regulón HrpL de Psv NCPPB 3335

La virulencia de las cepas del complejo *P. syringae* requiere de la expresión de genes inducidos por el factor de transcripción HrpL, pero el regulón HrpL hasta la fecha solo se había estudiado usando *microarrays* y *RNAseq* en cepas patógenas

de huéspedes herbáceos (Ferreira *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014). En este capítulo se ha realizado la identificación de genes regulados por HrpL en la cepa Psv NCPPB 3335, patógena de huéspedes leñosos, mediante dos abordajes distintos: (i) análisis comparativo RNAseq y, (ii) predicción bioinformática de genes dependientes de HrpL en el genoma de la cepa Psv NCPPB 3335.

En las condiciones en las que se ha realizado el estudio comparativo RNAseq se han identificado un total de 53 genes cuya expresión se ve alterada en ausencia del factor transcripcional HrpL. El mayor número de genes que sufren una reducción en su expresión son genes que codifican proteínas estructurales del T3SS, indicando que la ausencia del regulador HrpL provoca mayoritariamente, una alteración de este sistema. Además, mediante RT-qPCR, se observó una reducción, en la cepa mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la silvestre, del 98% de la expresión del gen *hrpA*, que codifica para el pilus del T3SS. Estos resultados indican que, en las condiciones utilizadas *in vitro*, el T3SS del mutante $\Delta hrpL$ no es funcional, lo que coinciden con los resultados obtenidos previamente *in planta* realizados con la cepa mutantes $\Delta hrpL::nptII$ (Matas *et al.*, 2014).

Los únicos genes del clúster T3SS que no aparecen reprimidos en la cepa mutante $\Delta hrpL$ en el análisis RNAseq fueron *hrcS* y *hrpK*. En los datos de expresión diferencial el gen *hrcS* presenta un $\log_2$ (tasa de cambio) de -4,15, lo que indica que esta reprimido 17 veces en el mutante $\Delta hrpL$, pero no presenta un valor q inferior a 0,05, por lo que no se consideró una expresión diferencial significativa. Este gen se encuentra en la cuarta posición del operón *hrpP*, en el cual, todos los demás genes están significativamente reprimidos en la cepa mutante $\Delta hrpL$, sugiriendo que realmente este gen si esté reprimido, pero no se haya identificado debido a posibles variaciones en la abundancia de sus transcritos entre las réplicas biológicas. Por el contrario, el gen *hrpK*, reprimido en mutantes *hrpL* de otras cepas del complejo *P. syringae* (Mucyn *et al.*, 2014), se encontró sobreexpresado en el mutante $\Delta hrpL$ de Psv NCPPB 3335. Se ha descrito que la proteína codificada por el gen *hrpK* de Pto DC3000 es secretada y podría

funcionar como un translocador de efectores a través de la membrana plasmática del huésped (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005). En Pto DC3000, este gen ocupa el primer lugar de un operón junto con el efector *hopB1* (Charity *et al.*, 2003), mientras que en Psv NCPPB 3335 este gen forma un operón con *shcA* (PSA3335_RS10690) y *hopA2* (*hopPsyB*) (PSA3335_RS10695), tal y como se ha descrito en otras cepas de *P. syringae*, como por ejemplo, *P. syringae* pv. *syringae* 61 (Charity *et al.*, 2003). En Psv NCPPB 3335, *shcA* y *hopA2* también están sobreexpresados en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre, siendo los únicos genes de sus categorías cuya expresión está aumentada. Estos datos sugieren que el operón *hrpK* (PSA3335_RS10685-PSA3335_RS10695) en Psv NCPPB 3335, se encuentra reprimido directa o indirectamente por el factor de transcripción HrpL. Otros genes asociados al T3SS identificados mediante *RNAseq* y/o predicción bioinformática en Psv NCPPB 3335 son *hopAK1*, *hrpW1*, *hrpH*, *shcV*, *shcF* y *shcM*, todos ellos identificados en el regulón HrpL de al menos una de las seis cepas de *P. syringae* analizadas hasta la fecha (Tabla 5).

De los 31 T3E que constituyen el repertorio de T3E de Psv NCPPB 3335, en este estudio se han identificado como parte del regulón HrpL un total de 16 genes codificantes de T3E, 12 de ellos identificados en el análisis *RNAseq* y nueve identificados bioinformáticamente (Figura 10). Entre estos 16 genes, no se ha incluido *hopA2*, cuya expresión está sobreexpresada en el mutante $\Delta hrpL$, indicando que HrpL reprime su expresión (Tabla 6, Figura 10). Para estos 16 genes, excepto para *avrRpm2*, se había demostrado previamente su dependencia de HrpL experimentalmente en cepas del complejo *P. syringae* y/o Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014) (Tabla 6). Matas *et al.* (2014) identificó una caja *hrp* para *avrRpm2* y demostró la translocación de la proteína codificante a través del T3SS de Psv NCPPB 3335. En este estudio *RNAseq*, se ha observado que la expresión de *avrRpm2* está reprimida en la cepa mutante $\Delta hrpL$ (Tabla 6), lo que demuestra su dependencia del factor HrpL. Además, *avrRpm2* forma un operón con el gen de la chaperona *shcF* (PSA3335_RS25240), el cual es el primer gen del operón y su expresión también se encontró reprimida en la cepa mutante $\Delta hrpL$ (Tabla 5). En nuestra predicción bioinformática se detectó la caja *hrp* del

operón y la secuencia N-terminal de translocación a través del T3SS para AvrRpm2. Este resultado coincide con lo previamente descrito, ya que la chaperona SchF es necesaria para la estabilidad en la bacteria de la familia de efectores HopF y para su translocación a través del T3SS (Lo *et al.*, 2017).

En este capítulo se ha demostrado la dependencia del factor HrpL mediante *RNAseq* para un total de 12 genes codificadores de T3E (Tabla 6, Figura 10). Entre estos T3E, no se han identificado todos los T3E de Psv NCPPB 3335 cuya dependencia del factor HrpL se había demostrado previamente en otros estudios mediante RT-qPCR (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). De hecho, en las RT-qPCRs realizadas con las mismas muestras de RNA utilizadas para la secuenciación *RNAseq*, se demuestra la dependencia del factor HrpL para *avrPto1* y *hopAO2*, mientras que, mediante *RNAseq* solo se identificó para *avrPto1* (Figura 4, Tabla 6). La secuenciación *RNAseq* es una técnica diferente a la RT-qPCR en el que el procesamiento de los datos es totalmente distinto, por lo que no es extraño obtener diferencias en los niveles de expresión de un mismo gen (Rubio *et al.*, 2015). Se piensa que las diferencias en los niveles de expresión observados entre *RNAseq* y RT-qPCR podrían deberse al proceso bioinformático realizado en el análisis de *RNAseq*, en el que se incluyen varios factores que pueden afectar la reproducibilidad de los perfiles de expresión cuantitativa, como son, las opciones de alineamiento, la estimación de la expresión de la transcripción, etc. (Labaj *et al.*, 2011).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las publicaciones previas de Psv NCPPB 3335 y los resultados obtenidos en este capítulo, podríamos decir que el regulón HrpL de Psv NCPPB 3335 hoy día está compuesto por al menos 21 de los 31 genes codificadores de T3E previamente descritos en esta cepa (Figura 9B). Para aquellos T3E no detectados en este estudio o en estudios previos (Figura 9B), no podemos afirmar que no estén regulados por HrpL, pues se sabe que la translocación de T3E a través del T3SS no es igual para todos los T3E y que existe una regulación espaciotemporal de su expresión y translocación (Büttner, 2016; Henry *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017; Castiblanco *et al.*, 2018; McAtee *et al.*, 2018;

Bian *et al.*, 2019). En este estudio hemos analizado una imagen de la regulación espaciotemporal realizada por HrpL en la transcripción de los genes de Psv NCPPB 3335, correspondiente a las 6 horas de inducción en medio Hrp, por tanto, hay que tener en cuenta que la regulación de los genes es dinámica y que pueden existir genes de T3E que se estén expresando a tiempos diferentes.

Además de los T3E descritos, en el análisis *RNAseq* se identificó como reprimido en el mutante $\Delta hrpL$ el pseudogen PSA3335_RS02560, que codifica una proteína similar al T3E XopAD de *Xanthomonas*. En el genoma de Psv NCPPB 3335 este gen aparece dividido en dos marcos abiertos de lectura, los pseudogenes PSA3335_RS02560 y PSA3335_RS02565. Aunque ambos pseudogenes codifican proteínas ricas en las repeticiones SKWP características de XopAD (Moreira *et al.*, 2010), solo la expresión de PSA3335_RS02560 se identificó como reprimida en el *RNAseq*. También se ha identificado bioinformáticamente una caja *hrp* y la secuencia N-terminal de translocación a través del T3SS (Tabla 6) para PSA3335_RS02560 y su proteína codificante, lo que sugiere que podría tratarse de un nuevo T3E de Psv NCPPB 3335. El gen PSA3335_RS02560 es homólogo al gen PSPPH_1525 de Pph 1448A, el cual se induce por HrpL y, en un estudio reciente, se ha descrito que se encuentra bajo la regulación de HrpS (Wang *et al.*, 2018). Aunque algunos estudios no consideran a PSPPH_1525 como un gen codificante de un T3E, la translocación a través del T3SS de la proteína codificada por su homólogo *mlr6361* se ha demostrado en *Mesorhizobium loti*, gen que tiene un papel en el rango de huésped de esta cepa (Sánchez *et al.*, 2009; Okazaki *et al.*, 2010). Por tanto, estudiar la translocación de este gen en Psv NCPPB 3335, así como, la interferencia con los sistemas de defensa de las plantas es necesario para poder determinar si este gen codifica un nuevo T3E de Psv NCPPB 3335.

Con respecto al resto de genes ED, se ha identificado un gen codificador de una proteína hipotética mediante *RNAseq* (PSA3335_RS07405) y otras dos mediante predicción bioinformática de la caja *hrp* (PSA3335_RS11510 y PSA3335_RS10865), en cuyas proteínas codificantes, también se ha detectado la secuencia N-terminal de translocación a través del T3SS, sugiriendo que podrían

tratarse de nuevos T3E de Psv NCPPB 3335 (Tablas 7 y 8). Solo para la proteína hipotética identificada mediante *RNAseq* se ha demostrado previamente su dependencia del factor HrpL en otra cepa del complejo *P. syringae* (Tabla 7). La proteína codificada por el gen PSA3335_RS10865 corresponde con la proteína HP0393 identificada en Matas *et al.* (2014), para la que se demostró que no se translocaba a través del T3SS. La proteína codificada por el gen PSA3335_RS11510, ya se identificó como un nuevo posible T3E presente en todas las cepas secuenciadas de los patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral (Capítulo 1, Tabla 5). En total mediante los análisis genómicos, transcriptómicos y bioinformáticos se han identificado en Psv NCPPB 3335 tres genes que podrían codificar nuevos T3E, el gen PSA3335_RS02560, que codifica una proteína similar a XopAD de *Xanthohomonas*, y los genes PSA3335_RS07405 y PSA3335_RS11510 que codifican proteínas hipotéticas. Futuros ensayos de translocación y de interferencia con los sistemas de defensa de estas tres proteínas son necesarios para demostrar si estos genes codifican nuevos T3E no descritos.

En los genes ED en el *RNAseq*, se ha identificado el gen *hsvA*, cuya expresión aparece reprimida en el mutante $\Delta hrpL$ con respecto a la cepa silvestre, el cual codifica la primera enzima del operón *hsv* de la síntesis de la toxina fevamina A (O'Neill *et al.*, 2018). El operón implicado en la síntesis de la fevamina A está compuesto por tres genes, *hsvA*, *hsvB* y *hsvC*, los cuales están regulados por HrpL en Pto DC3000, Pla 107 y Por 1_6 (Tabla 7). En Psv NCPPB 3335 solo se ha detectado bajo la regulación de HrpL el primer gen del operon, *hsvA* y una proteína hipotética truncada (PSA3335_RS29775) que se encuentra aguas arriba del gen *hsvA*, que podría estar relacionada con la función de esta toxina. La fevamina A, es una molécula compuesta por una espermidina modificada, L-fenilalanina y L-valina, que contribuye a la virulencia de Pto DC3000 en *Arabidopsis* suprimiendo la respuesta inmune inducida por flagelina (O'Neill *et al.*, 2018). También se ha descrito en *Erwinia amylovora*, en la cual este operón es necesario para la virulencia completa de esta cepa en brotes de manzano (Oh *et al.*, 2005). Estudiar si el operón de la fevamina A es funcional y tiene un papel en

la virulencia de Psv NCPPB 3335 y otras cepas de *P. savastanoi*, ayudaría a entender el papel de esta toxina en la patogénesis de cepas del complejo *P. syringae* que infectan huéspedes leñosos.

En la categoría de señalización se ha identificado un gen, cuya expresión es inducida por HrpL, codificante de un receptor de sideróforos dependiente de TonB (proteína FecA) (PSA3335_RS09570) (Tabla 7). La proteína FecA se ha descrito en Pto DC3000, estando implicada en el transporte de alta afinidad de quelatos de dicitrato de hierro (III) hacia el interior de la bacteria (Jones and Wildermuth, 2011). En este estudio, se sugiere que este transporte puede ser importante para la captación de hierro, el crecimiento bacteriano y la virulencia de Pto (Jones and Wildermuth, 2011), por lo que en Psv NCPPB 3335 podría tener un papel similar. El otro gen identificado en esta categoría es una proteína hipotética que presenta homología con una *N*-acil homoserina lactona (AHL) sintasa (PSA3335_RS05360) (Tabla 7). Este gen es distinto del gen *pssI* previamente caracterizado en Psv NCPPB 3335, que aunque no tiene un papel en la virulencia de esta cepa, es necesario para la síntesis de AHL (Caballo-Ponce *et al.*, 2018). Las AHL están involucradas en la interferencia de la comunicación interbacteriana mediada por el sistema *quorum sensing* (QS), sistema relevante para la comunicación entre miembros de la comunidad bacteriana de los tumores de olivo, como por ejemplo entre Psv y *Erwinia toletana*. Se ha descrito que estas especies bacterianas comparten señales QS y cooperan entre sí produciendo una enfermedad más agresiva en la planta de olivo (Caballo-Ponce *et al.*, 2018), por lo que esta proteína regulada por HrpL podría tener un papel relevante en la interferencia de la comunicación interbacteriana en el olivo.

El único gen identificado en la categoría metabolitos secundarios, es el gen PSA3335_RS20310 que codifica una proteína FAD (*flavine adenine dinucleótido*), cuya dependencia de HrpL se ha descrito en otras cepas de *P. syringae* (Tabla 7). Esta proteína es similar a ApbE de *Pseudomonas stutzeri*, la cual está implicada en la maduración de la proteína NosR requerida para la reducción de óxido nítrico (Zhang *et al.*, 2017). La activación de la respuesta inmune ETI (*Effector-triggered*

immunity) está asociada con la rápida producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Mata-Pérez and Spoel, 2019), por lo que esta proteína podría tener un papel en la respuesta a estrés oxidativo de Psv NCPPB 3335.

En la predicción bioinformática, se identificaron 26 genes más posiblemente regulados por HrpL que no fueron identificados mediante *RNAseq* (Tabla 8), entre los que cabe destacar los dos alelos *iaaLPsv* e *iaaLPsn* de Psv NCPPB 3335 (Tabla 8). Estos genes están implicados en la síntesis de la fitohormona ácido indol-3-acético-Lisina (IAA-Lys) en cepas de Psn, aunque su papel en la virulencia de *P. savastanoi* no está muy claro y es dependiente de cepa (Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). La dependencia de HrpL de *iaaL* se ha descrito en Pto DC3000 y Por 1_6 (Tabla 8) (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014; Castillo-Lizardo *et al.*, 2015).

En resumen, en Psv NCPPB 3335 el factor de transcripción HrpL induce la expresión de al menos 53 genes, de los cuales 49 han sido identificados mediante *RNAseq* en este trabajo y ocho mediante RT-qPCR en estudios previamente publicados (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b), y reprime la expresión de cuatro genes. Dentro del regulón HrpL de esta cepa se encuentran genes estructurales y reguladores del T3SS, T3E y genes no relacionados con el T3SS, lo que coincide con lo previamente publicado para otras cepas de *P. syringae* (Mucyn *et al.*, 2014). Aún quedan por estudiar aquellos genes cuya regulación dependiente de HrpL ha sido previamente publicada en otras cepas pero que no se ha detectado en nuestro ensayo, y de los 26 genes identificados exclusivamente bioinformáticamente. En este trabajo se muestra la integración de datos transcriptómicos de nueva generación con datos genómicos, con el objetivo de identificar nuevos genes de Psv NCPPB 3335 que puedan tener un posible papel en la virulencia de este patógeno.

Capítulo III

Efectores del sistema de secreción tipo III implicados en el rango de huésped de *Pseudomonas savastanoi*

Los resultados obtenidos en la filogenia de HopAO en este Capítulo se han incluido en la siguiente publicación:

Castañeda-Ojeda, M.P., **Moreno-Pérez, A.**, Ramos, C., and López-Solanilla, E. (2017). Suppression of plant immune responses by the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 type III effector tyrosine phosphatases HopAO1 and HopAO2. *Frontiers in Plant Science* 8, 680. doi: 10.3389/fpls.2017.00680 (Anexo I).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

La translocación de efectores (T3E) del sistema de secreción tipo III (T3SS) por bacterias patógenas es un elemento clave en el establecimiento de la infección. En bacterias patógenas de plantas, estas proteínas interfieren principalmente con el sistema inmune de las plantas en dos líneas de defensa principales: la inmunidad PTI (*pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity*) y la inmunidad ETI (*effector-triggered immunity*) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006). Por este motivo, el T3SS y su repertorio de T3E se han reconocido como los determinantes principales de la especificidad de huésped en *Pseudomonas syringae*, tanto a nivel de especie-patovar como de raza-cultivar (Fouts *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011). Aunque la mayoría de los resultados publicados se han obtenido en bacterias patógenas de huéspedes herbáceos, recientemente, varios patosistemas leñosos se han utilizado como modelos para el estudio del papel de los T3E y otros factores de virulencia en la especialización en huéspedes leñosos (McCann *et al.*, 2013; Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b; Hulin *et al.*, 2018).

La especie *Pseudomonas savastanoi*, englobada dentro del filogruppo (FG) 3 del complejo *P. syringae*, está constituida por cinco patovares aislados de huéspedes leñosos, pv. *savastanoi* (Psv, aislados de olivo), pv. *nerii* (Psn, aislados de adelfa), pv. *mandevillae* (Psm, aislados de dipladenia), pv. *fraxini* (Psf, aislados de fresno) y pv. *retacarpa* (Psr, aislados de retama) (Caballo-Ponce, 2017; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a). En el Capítulo II de esta Tesis Doctoral se demostró, que al igual que para las cepas de Psv y Psn (Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Cerboneschi *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a), la presencia de un T3SS activo y funcional es necesario tanto para la inducción de síntomas en sus respectivos huéspedes como para la inducción de la denominada respuesta de hipersensibilidad (HR) en huéspedes resistentes en cepas de Psm, Psf y Psr.

En el Capítulo I de esta tesis doctoral se realizó la identificación del repertorio de T3E de las 21 cepas de *P. savastanoi* secuenciadas hasta el momento, entre los que se incluían cepas pertenecientes a los 5 patovares aislados de huéspedes

leñosos, y se realizó una comparativa con el objetivo de identificar aquellos T3E que pudieran explicar las diferencias encontradas en el rango de huésped de estos patovares. Para ello se seleccionaron aquellos T3E cuya presencia, ausencia o truncamiento fuese exclusivo de un patovar concreto. Los T3E con un posible papel en el rango de huésped se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. T3E identificados con un posible papel en el rango de huésped de *P. savastanoi*.

Patovares ^a	Psv	Psn	Psm	Psf	Psr
Inducción de síntomas	olivo fresno	olivo adelfa fresno	olivo adelfa dipladenia fresno	olivo fresno	retama
T3E presentes		HopAT1	HopAT1 HopAY1	HopX1 ^b HopZ1 ^c	AvrRps4 HopZ5 HopF1
T3E truncados o ausente		AvrPto1 HopA2	AvrPto1 HopA2 HopAS1 HopBL1 HopBL2	HopD1 ^c	HopAF1-2 HopG1

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

^bExclusivo de Psf, pero presente en la cepa Psv ICMP 13519

^cEn todas las cepas de Psf menos en una.

Los efectores marcados en negrita son aquellos que se van a analizar funcionalmente en este Capítulo.

Se excluyeron de este estudio, entre otros, HopX1, por haberse identificado no solamente en las 3 cepas de Psf, sino también en una de las cepas de Psn analizadas. También se excluyeron HopZ1 y HopD1, por no haberse identificado en el genoma de una de las cepas de Psf analizadas. Entre los T3E seleccionados se encuentra AvrPto1, truncado exclusivamente en todas las cepas que infectan adelfa (las 4 cepas de Psn y Psm Ph3), así como AvrRps4, HopF1 y HopZ5, 3 T3E exclusivos de las cepas de Psr, únicas capaces de infectar retama.

Teniendo en cuenta que los marcos abiertos de lectura de HopBL1 y HopBL2 se encuentran truncados específicamente en la cepa Ph3 de Psm, estos dos efectores se seleccionaron también para analizar su papel en el rango de huésped de esta cepa. Además, considerando que la translocación, dependencia del factor HrpL e interferencia con los sistemas de defensa de la planta de estos 2 T3E se ha descrito previamente en Psv NCPPB 3335 (Matas *et al.*, 2014), en este trabajo se ha estudiado también su papel en la virulencia de Psv y Psn en plantas de olivo

y adelfa. De otro lado, y teniendo en cuenta que estos dos efectores y HopAO1 forman parte del *core* de T3E de *P. savastanoi* (Capítulo I, Moreno-Pérez et al., 2020) y han sido asociados con huéspedes leñosos (Matas et al., 2014; Nowell et al., 2016), se analizó en este Capítulo la distribución de estos 3 T3E en el complejo *P. syringae*. La filogenia de HopAO1 y de su homólogo HopAO2 mostrada más adelante, se incluyó en una publicación en la que también se llevó a cabo un análisis funcional de estos dos T3E en Psv NCPPB 3335 (Castañeda-Ojeda et al., 2017b) (Anexo I). Los resultados funcionales de estos dos efectores, no se han incluido en esta Tesis Doctoral por formar parte de la defendida en 2014 por M. Pilar Castañeda Ojeda.

Los Resultados y Discusión de este Capítulo se han dividido en dos apartados, en el apartado 3.1. se incluyen los análisis filogenéticos de T3E de *P. savastanoi* asociados a huéspedes leñosos, así como la caracterización funcional y los ensayos de virulencia relacionados con dos de estos T3E, HopBL1 y HopBL2. En el apartado 3.2. se incluyen los análisis bioinformáticos y ensayos de virulencia y rango de huésped relacionados con AvrPto1, AvrRps4, HopF1 y HopZ5.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos utilizados en este Capítulo se describen en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente. Las cepas de *P. savastanoi* y *Agrobacterium tumefaciens* se incubaron a 28 °C y las de *Escherichia coli* a 37 °C, en medio *Lysogenic Broth* (LB) (Bertani, 1951) al 0,5% de NaCl y sin glucosa o en medio SOB (*Super Optimal Broth*) (Hanahan, 1983). Cuando fue necesario, los medios líquidos y sólidos se suplementaron con los siguientes antibióticos (cantidades en µg/ml) para *P. savastanoi*/*E. coli*/*A. tumefaciens*: ampicilina (Ap) 400/100/-, kanamicina (Km) 7/50/25, gentamicina (Gm) 5/10/20, nitrofurantoina (Nf) 20/-/-, cicloheximida (Ch) 100/-/-, espectinomicina (Sp) -/50/-, rifampicina (Rf) -/-/100 y carbenicilina (Carb) -/-/50.

Tabla 2. Cepas bacterianas usadas en este estudio.

Cepa	Características relevantes ^a	Referencias
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>F</i> -, ϕ 80 <i>dlacZ</i> M15, (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> - <i>mk</i> -), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	Hanahan (1983)
GM2929	<i>F</i> -, <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>glnV44</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>recF143</i> . (Sp ^R Cm ^R).	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>Pseudomonas savastanoi</i>		
pv. savastanoi		
NCPBP 3335	Cepa silvestre aislada de olivo	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2007)
NCPBP 3335 Δ <i>hopBL1</i>	Mutante en el gen <i>hopBL1</i> derivado de NCPBP 3335 mediante inserción del plásmido pCR2.1 (Km ^R)	Este trabajo
NCPBP 3335 Δ <i>hopBL2</i>	Mutante en el gen <i>hopBL2</i> derivado de NCPBP 3335 mediante inserción del plásmido pCR2.1 (Km ^R)	Este trabajo
pv. nerii		
ESC23	Cepa silvestre aislada de adelfa	Tegli <i>et al.</i> (2011)
ESC23 Δ <i>hopBL1</i>	Mutante en el gen <i>hopBL1</i> derivado de ESC23 mediante inserción del plásmido pCR2.1 (Km ^R)	Este trabajo

Tabla 2. Continuación.

Cepa	Características relevantes ^a	Referencias
ESC23 $\Delta hopBL2$	Mutante en el gen <i>hopBL2</i> derivado de ESC23 mediante inserción del plásmido pCR2.1 (Km ^R)	Este trabajo
CFBP 5062	Cepa silvestre aislada de adelfa	Janse (1991)
CFBP 5062 $\Delta hopBL1$	Mutante en el gen <i>hopBL1</i> derivado de CFBP 5062 mediante inserción del plásmido pCR2.1 (Km ^R)	Este trabajo
CFBP 5062 $\Delta hopBL2$	Mutante en el gen <i>hopBL2</i> derivado de CFBP 5062 mediante inserción del plásmido pCR2.1 (Km ^R)	Este trabajo
pv. mandevillae		
Ph3	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Eltlbany <i>et al.</i> (2012)
Ph5	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Eltlbany <i>et al.</i> (2012)
MSI13L	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Caballo-Ponce and Ramos (2016)
NIBZ1413	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Pirc <i>et al.</i> (2015)
1397	Cepa silvestre aislada de dipladenia	Putnam <i>et al.</i> (2010)
pv. fraxini		
NCPBP 1006	Cepa silvestre aislada de fresno	Janse (1981)
pv. retacarpa		
CECT 4861	Cepa silvestre aislada de adelfa	Álvarez <i>et al.</i> (1998)
<i>Pseudomonas syringae</i>		
pv. tomato		Cuppels (1986)
DC3000	Cepa silvestre aislada de tabaco.	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101 (pMP90)	Cepa que contiene un plásmido Vir que codifica la maquinaria de transferencia T-DNA (Rf ^R , Gm ^R)	Koncz and Schell (1986)

^aKm, kanamicina; Gm, gentamicina; Cm, cloranfenicol; Sp, espectinomicina; Rf, rifampicina.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio.

Nombre	Descripción ^a	Referencia
pGEM-T-Easy vector	Vector de clonación que contiene un ori f1 y el gen <i>lacZ</i> (Ap ^R)	(Promega, EEUU)
pGEM-T- <i>hopBL2-Ph3</i>	Vector derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen <i>hopBL2</i> de Psm Ph3 (Ap ^R)	Este trabajo
pGEMt-avrRps4	Vector derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen <i>avrRps4</i> de Psr CECT 4861 (Ap ^R)	Este trabajo
pGEM-T- <i>hopZ5</i>	Vector derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen <i>hopZ5</i> de Psr CECT 4861 (Ap ^R)	Este trabajo

Tabla 3. Continuación.

Nombre	Descripción ^a	Referencia
pGEM-T- <i>hopF1</i>	Vector derivado de pGEM-T <i>Easy</i> que contiene el gen <i>hopF1</i> de Psr CECT 4861 (Ap ^R)	Este trabajo
pCR2.1	Clonación TA, <i>lacZα</i> , ColE1, ori f1 (Ap ^R , Km ^R)	Invitrogen, EEUU
pAMP-1	Vector derivado de pCR2.1, contiene aproximadamente 1,2 Kb de la región intermedia del gen <i>hopBL1</i> de Psv NCPPB 3335 (Ap ^R , Km ^R)	Este trabajo
pAMP-2	Vector derivado de pCR2.1, contiene aproximadamente 1 Kb de la región intermedia del gen <i>hopBL2</i> de Psv NCPPB 3335 (Ap ^R , Km ^R)	Este trabajo
pENTR/SD/D-TOPO	Vector de entrada <i>Gateway</i> (Km ^R)	(Invitrogen Corp.; CA, USA)
pENTR- <i>avrPto1</i>	Vector de entrada <i>Gateway</i> que contiene inserto el gen <i>avrPto1</i> de Psv NCPPB 3335 (Km ^R)	Este trabajo
pENTR- <i>hopBL2</i>	Vector de entrada <i>Gateway</i> que contiene inserto el gen <i>hopBL2</i> de Psv NCPPB 3335 (Km ^R)	Matas <i>et al.</i> (2014)
pCPP5040	Vector de destino <i>Gateway</i> , que permite la expresión constitutiva de proteínas fusionadas a un epítipo C-terminal HA a partir de un promotor constitutivo <i>nptII</i> (Gm ^R , Cm ^R)	Lopez-Solanilla <i>et al.</i> (2004)
pCPP5040- <i>avrPto1</i>	Vector derivado de pCPP5040 que contiene el gen <i>avrPto1</i> de Psv NCPPB 3335 fusionado a un epítipo C-terminal HA (Gm ^R)	Este trabajo
pEXP- <i>hopBL1</i>	Vector derivado de pCPP5040 que contiene el gen <i>hopBL1</i> de Psv NCPPB 3335 fusionado a un epítipo C-terminal HA (Gm ^R)	Matas <i>et al.</i> (2014)
pEXP- <i>hopBL2</i>	Vector derivado de pCPP5040 que contiene el gen <i>hopBL2</i> de Psv NCPPB 3335 fusionado a un epítipo C-terminal HA (Gm ^R)	Matas <i>et al.</i> (2014)
pAMEX	Vector derivado de pBBR-MCS4 que permite la expresión constitutiva de proteínas a partir de un promotor constitutivo <i>nptII</i> (Ap ^R , Km ^R)	Macho <i>et al.</i> (2009)
p3T3E-Psr	Vector derivado de pAMEX que contiene los genes <i>avrRps4</i> , <i>hopZ5</i> y <i>hopF1</i> de Psr CECT 4861 (Km ^R)	Este trabajo
pGWB5	Vector de destino <i>Gateway</i> , vector binario que permite la expresión desde el promotor 35S de proteínas fusionadas a GFP en el extremo C-terminal (Sp ^R , Cm ^R)	(Tsuyoshi Nakagawa, Shimane University, Japan)
pGWB5- <i>hopBL2-GFP</i>	Vector derivado del vector binario pGWB5 que contiene el gen <i>hopBL2</i> de Psv NCPPB 3335 fusionado a GFP (Sp ^R)	Este trabajo
pGWB505- <i>lti6B</i>	Vector derivado del vector binario pGWB505 que expresa desde el promotor 35S el marcador de membrana plasmática LTI6B fusionado a la proteína GFP (Sp ^R)	Tania Y. Toruño y Gitta Coaker, Universidad de California Davis

Tabla 3. Continuación.

Nombre	Descripción ^a	Referencia
pGB3-YFP	Vector binario derivado de pGB3 y construido mediante tecnología <i>Golden Gate</i> que expresa la proteína YFP libre desde el promotor NOS (Carb ^R)	Signe Lolle y Gitta Coaker, Universidad de California Davis
pCMU-PDESr	Vector que expresa desde el promotor <i>AtUBQ10</i> el marcador de plasmodesmos PDLP1 fusionado a la proteína fluorescente mCherry en el extremo C-terminal (Sp ^R)	Ivanov and Harrison (2014)
pCMU-MTUBr	Vector que expresa desde el promotor <i>AtUBQ10</i> el marcador de microtúbulos MAP4-MBD fusionado a la proteína fluorescente mCherry en el extremo N-terminal (Sp ^R)	Ivanov and Harrison (2014)

^aAp, ampicilina; Km, kanamicina; Gm, gentamicina; Cm, cloranfenicol; Sp, espectinomicina; Carb, carbenicilina; Rf, rifampicina; HA, cola de histidina; GFP, proteína verde fluorescente; YFP, proteína amarilla fluorescente.

Construcción de mutantes en los genes *hopBL1* y *hopBL2*

Se realizó la construcción de mutantes de pérdida de función en los genes *hopBL1* y *hopBL2* por integración del plásmido pCR2.1 (*Invitrogen*, CA, USA), en las cepas de *P. savastanoi* Psv NCPPB 3335, Psn ESC23 y Psn CFBP 5062, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos Generales. Los plásmidos utilizados se muestran en la Tabla 3.

Construcción de plásmidos y cepas complementadas

El gen *avrPto1* se amplificó mediante una pareja de oligonucleótidos específica (Tabla 4) incluyendo el ORF (*Open Reading frame*) sin codón de STOP. El producto de PCR se clonó en el plásmido de clonación pENTR/SD/TOPO (*Invitrogen*, California, USA) y se secuenció antes de subclonarlo en el vector destino. Usando la tecnología *Gateway*, el gen *avrPTo1* se transfirió mediante recombinación desde el plásmido pENTR/SD/TOPO al plásmido de amplio espectro de huésped pCPP5040 (Tabla 3), utilizando el kit de enzimas *Gateway*[®] LR *clonase*[®] (*Invitrogen*, California, USA) y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Para los complementantes de HopBL1 y HopBL2 se utilizaron los plásmidos derivados de pCPP5040, pEXP-*hopBL1* y pEXP-*hopBL2*, previamente publicados (Matas *et al.*, 2014) (Tabla 3).

Los genes de los T3E *avrRps4*, *hopZ5* y *hopF1* se amplificaron mediante una pareja de oligonucleótidos específica (Tabla 4) incluyendo el RBS (*ribosoma binding site*), el ORF completo, el codón de *STOP* y las dianas de corte de las endonucleasas que permitieron su posterior clonación en el vector destino. Los productos de PCR se clonaron en el plásmido de clonación pGEM-T *Easy* (Promega, USA) y se secuenciaron antes de subclonarlos en el vector destino. Posteriormente, los tres insertos se digirieron utilizando las endonucleasas adecuadas y se clonaron mediante una reacción de ligación en el plásmido de amplio espectro de huésped pAMEX (Tabla 3), siguiendo los procedimientos descritos en Material y Métodos Generales.

Los plásmidos se transformaron en las diferentes cepas de *Escherichia coli* y *P. savastanoi* siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos Generales.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Cepa	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3' ^a
Psv NCPB 3335	Mut- <i>hopBL1</i> -F	ACTGAGTATCGATACAGC
	Mut- <i>hopBL1</i> -R	AACGGCAGATTGTCCACAT
	Mut- <i>hopBL2</i> -F	GGCATTTCATTAAACGGTA
	Mut- <i>hopBL2</i> -R	GATTGAAGAAAGATCGCCAA
	TOPO- <i>hopBL2</i> -F	CACCATGTGGAACCTTAACAAC
	TOPO- <i>hopBL2</i> -R	TTCGGTTCGTTTCAATAT
	<i>avrPto1</i> -F	CACCATGGGAAATATATGTGTC
	<i>avrPto1</i> -R	CCAGTTCCTGTAAGGGCT
Psr CECT 4861	<i>XhoI</i> - <i>hopZ5</i> -F	AACCACTCGAGCTAACATCCCCCACTTAG
	<i>Clal</i> - <i>hopZ5</i> -R	AACCAATCGATTAGGATTCTATCGCTTTTC
	<i>Clal</i> - <i>hopF1</i> -F	AACCAATCGATAGTTGTATATAAAACCATCTGG
	<i>Bam</i> HI- <i>hopF1</i> -R	AACCAGGATCCCTAATCGAGGATATTGACCG
	<i>Bam</i> HI- <i>avrRps4</i> -F	AACCAGGATCCCTCATGCGCATTAAATTC
	<i>SpeI</i> - <i>avrRps4</i> -R	AACCAACTAGTTTATTGGTTGATTCTGCG

^aLa secuencia reconocida por enzimas de restricción aparece subrayada en la secuencia del oligonucleótido

Construcción de plásmidos y cepas para ensayos de localización subcelular de HopBL2

Se partió del plásmido de entrada *Gateway* pENTR-*hopBL2* previamente publicado (Matas *et al.*, 2014) (Tabla 3), que contiene el ORF del gen *hopBL2* sin codón *STOP*. Usando la tecnología *Gateway*, el gen *hopBL2* se transfirió mediante recombinación desde pENTR-*hopBL2* al plásmido pGWB5, utilizando el kit de enzimas *Gateway*® LR clonase® (Invitrogen, California, USA) y siguiendo las

instrucciones indicadas por el fabricante. El plásmido resultante, pGWB5-*hopBL2-GFP*, expresa una fusión traduccional de *hopBL2* al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) (Tabla 3).

El plásmido pGWB5-*hopBL2-GFP* y los que expresan la proteína amarilla fluorescente (YFP) libre o los genes marcadores de membrana plasmática, microtúbulos y plasmodesmos fusionados a genes de proteínas fluorescentes (Tabla 3), se transformaron en células de *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) electrocompetentes obtenidas como se detalla a continuación. Se realizó un preinóculo con una colonia de la cepa en 5 ml de LB suplementado con la mitad de la concentración de antibióticos indicada en el apartado “Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento”, y se incubó en agitación (250 rpm) a 28 °C durante toda la noche. Este preinóculo, se añadió a 50 ml de LB, también suplementado con la mitad de la concentración de antibióticos, en un matraz de 250 ml, y se incubó en agitación (250 rpm) a 28 °C hasta que alcanzó una DO_{600nm} de 1,0-1,5 (aproximadamente 5-6 h). A continuación, se incubaron los cultivos en hielo durante 20 min. A partir de este momento, todos los pasos se hicieron en hielo o a 4 °C. Se transfirieron los cultivos a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 4000 rpm durante 4 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el precipitado celular en 50 ml de agua bidestilada a 4 °C. Se volvió a centrifugar a 4000 rpm durante 4 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 ml de agua bidestilada a 4 °C. Se centrifugo de nuevo a la misma velocidad, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de glicerol al 10% (V/V) a 4 °C. Se centrifugó a la misma velocidad, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en un volumen final de 1,5 ml de glicerol al 10%(V/V) a 4 °C, las muestras se alicuotaron en fracciones de 100 µl y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Para la transformación, se mezclaron 50-100 µl de células electrocompetentes con 1-3 µl de plásmido y se aplicó a la mezcla un pulso de 1500V en un electroporador *Electroporator 2510* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Las cubetas de electroporación se mantuvieron en hielo hasta la electroporación, e inmediatamente después del pulso, se añadió 1 ml de LB y las suspensiones

celulares se transfirieron a un tubo de 1,5 ml y se incubaron durante 1 h en agitación a 28 °C. Tras la hora de recuperación, se sembraron las células en placas de LB con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 28 °C durante 2-3 días.

Bioensayos en plantas

- Ensayos de virulencia en plantas de olivo micropropagadas *in vitro*

Las plantas de olivo (*Olea europea*) micropropagadas *in vitro* proceden de la germinación de una semilla del cultivar Arbequina. La micropropagación y el cultivo de las plantas de olivo *in vitro*, se llevó a cabo según los protocolos ya descritos (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009) en la empresa Guzmán Biotech (<https://www.guzmanbiotech.com/>) (Málaga, España). Las plantas de olivo micropropagadas *in vitro* se cultivaron en medio DKW (Driver and Kuniyuki, 1984), cuya composición se detalla en la Tabla 5. El medio DKW se suplementa de forma distinta en cada uno de los tres periodos del cultivo: i) DKW de proliferación: micronutrientes 10 ml/l; vitaminas 10 ml/l; sacarosa, 30 g/l; ácido indolbutírico (IBA), 0.1 mg/ml; y benciladenina (BA), 0.1 mg/ml; ii) DKW de enraizamiento: micronutrientes 5 ml/l; sacarosa, 20g/l; e IBA, 0.1 mg/ml; y iii) DKW de mantenimiento: micronutrientes 5 ml/l; sacarosa, 20g/l.

Tabla 5. Composición medio DKW.

DKW	Composición
Base	NH ₄ NO ₃ , 1,42 g/l; Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O, 1,37 g/l; CaCl ₂ 2H ₂ O, 112,5 mg/ml; K ₂ SO ₄ , 1,56 g/l; MgSO ₄ 7H ₂ O, 361,5 mg/ml; KH ₂ PO ₄ , 265 mg/ml; FeSO ₄ 7H ₂ O, 33,8 mg/ml; Na ₂ -EDTA, 45,5 mg/ml; Mioinositol, 1 g/ml; pH 5,74.
Micronutrientes	MnSO ₄ 4H ₂ O, 3,3 g/ml; H ₃ BO ₃ , 480 mg/ml; Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O, 170 mg/ml; Na ₂ MO ₄ 2H ₂ O, 36 mg/ml; CuSO ₄ 5H ₂ O, 9,6 mg/ml.
Vitaminas DKW	Tiamina-HCl, 196 mg/ml; Glicina, 196 mg/ml; ácido nicotínico, 96 mg/ml.

Para preparar el inóculo, las células bacterianas se incubaron en placas de LB durante 48 horas a 28 °C. Posteriormente, se recogió biomasa de cada una de ellas y se resuspendió en MgCl₂ 10 mM. Se realizaron dos lavados con MgCl₂ 10 mM y las suspensiones bacterianas se ajustaron a una DO_{600nm} de 0,5 (10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). La comprobación de la dosis inicial se realizó mediante diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas y siembra en placa.

Para llevar a cabo la inoculación, se extrajeron las plantas de olivo *in vitro* del medio DKW con ayuda de unas pinzas. Con un bisturí se extrajo una de las hojas del segundo entrenudo basal y en la herida producida se depositaron 2 µl de la dilución 10^{-2} de la suspensión bacteriana (aproximadamente 10^3 - 10^4 UFC). Se repitió el proceso, dejando un entrenudo sin inocular, de forma que se inoculan dos puntos por olivo *in vitro*. La planta inoculada se devolvió al medio de cultivo y se incubó durante 30 días en una cámara de cultivo a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y un ciclo de 16 h de luz. Pasados 30 dpi, se procedió a la visualización de los síntomas producidos por las cepas de *P. savastanoi* mediante un microscopio estereoscópico (Leica MZ FLIII; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

- **Ensayos de virulencia en huéspedes leñosos**

La virulencia de las cepas de *P. savastanoi* se analizó en plantas de *Olea europea* (olivo) derivadas de la germinación *in vitro* de semillas (originalmente recolectadas de una planta de la variedad Arbequina), plantas de *Nerium oleander* (adelfa) variedad rosa de flores simples, suministradas por Viveros Guzmán (Málaga, España), plantas de *Mandevilla* spp. (dipladenia) variedad de flores rosas, y plantas de *Fraxinus excelsior* (fresno) y *Retama sphaerocarpa* (retama) nativas de Valladolid y suministradas por Viveros Gutiérrez (Valladolid, España). La preparación del inoculo y la inoculación se realizó tal y como se detalla en Material y Métodos Generales. En todos los ensayos de virulencia realizados en este Capítulo se utilizaron tres plantas por cepa, inoculadas en 10-12 lesiones por planta y cepa. Para estimar las densidades poblacionales, se utilizó el mismo procedimiento descrito en Material y Métodos Generales. Para ello se escindieron tres puntos inoculados procedentes de tres plantas diferentes para cada cepa.

- **Ensayo de localización subcelular de HopBL2 en hojas de *Nicotiana benthamiana***

La cepa *A. tumefaciens* GV3101 (Tabla 2) se transformó con los plásmidos pGWB5-hopBL2-GFP, pGWB505-lti6B-GFP, pGB3-YFP, pCMU-MTUBr y pCMU-PDESr (Tabla 3), tal y como se ha descrito anteriormente. En el ensayo de

localización subcelular, se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de 4-5 semanas cultivadas en una cámara de cultivo a 24 °C con un fotoperiodo de 10/14 h luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 150 uE/m²/s. Las cepas de *A. tumefaciens* se incubaron en placas de LB suplementado con los antibióticos necesarios durante 2-3 días a 28 °C y, posteriormente, se inocularon en medio líquido y se incubaron durante toda la noche en agitación a 28 °C. De estos cultivos, se centrifugaron 2 ml a 12000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en 1 ml de medio de infiltración (MES pH5,6 1M, MgCl₂ 1M, acetosiringona 100mM y agua bidestilada). Las suspensiones bacterianas se ajustaron con el mismo medio a DO_{600nm} de 0.4 y se incubaron durante 1,5-2 h a temperatura ambiente. Para realizar las inoculaciones, se realizaron pequeñas heridas superficiales en la cara abaxial de la hoja con una aguja hipodérmica y, posteriormente, se introdujeron las suspensiones bacterianas en el espacio periplásmico utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Las imágenes de fluorescencia se realizaron a las 24 h posinfiltración en un microscopio confocal Zeiss LSM 980-Airyscan2. Para los ensayos de colocación de HopBL2, se realizaron coinfiltraciones en hojas de *N. benthamiana* con cepas de *A. tumefaciens* que expresaban el marcador de plasmodesmos PDPL1 o el marcador de microtúbulos MAP4-MDB.

Análisis filogenéticos

El estudio de la filogenia de los T3E objeto de estudio en el complejo *P. syringae* se realizó utilizando el método de máxima verosimilitud (Jones *et al.*, 1992). Para ello se realizó una búsqueda BLAST de las secuencias de proteínas de estos T3E con el *software* Geneious v7.1.13 (Kearse *et al.*, 2012) y utilizando una base de datos constituida por más de 100 genomas del complejo *P. syringae*. Además, para la construcción del árbol filogenético se incluyeron las secuencias proteicas de estos T3E identificadas en cepas del complejo *P. syringae* en Dillon *et al.* (2019a). En este estudio solo se utilizaron las secuencias que mostraron como mínimo un 80 % de identidad sobre al menos el 80 % de la secuencia descrita de estos T3E (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Baltrus *et al.*, 2011; Matas *et al.*, 2014)

(Tabla A1- Anexo Capítulo III). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa CLUSTALW mediante el *software* MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). El árbol filogenético se construyó mediante el método de máxima verosimilitud con MEGA7. La topología del árbol filogenético obtenida fue validada estadísticamente mediante el método *Bootstrap* (100 réplicas).

3.1 Efectores del T3SS de *P. savastanoi* asociados a huéspedes leñosos

RESULTADOS

Distribución en el complejo *P. syringae* de core T3E de *P. savastanoi* asociados a huéspedes leñosos

En el Capítulo I de esta tesis doctoral, se han identificado tres de los T3E previamente asociados a huéspedes leñosos (Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016), HopBL1, HopBL2 y HopAO1, formando parte del *soft-core* (95% de los genomas analizados) del repertorio de T3E de *P. savastanoi*. Anteriormente, la distribución de la familia de T3E HopBL se estudió en un conjunto de 22 cepas del complejo *P. syringae* aisladas de huéspedes herbáceos y leñosos mediante *colony blot* (Matas *et al.*, 2014), y la distribución del T3E HopAO1 se estudió mediante BLAST en las 64 cepas del complejo *P. syringae* cuya secuencia estaba disponible en ese momento (Nowell *et al.*, 2016). El aumento durante los últimos años del número de genomas disponibles de cepas del complejo *P. syringae*, nos ha permitido llevar a cabo un estudio en mayor profundidad de la distribución de estos T3E dentro del complejo. Además, en este estudio se ha incluido HopAO2 identificado en Psv NCPPB 3335, que presenta una identidad aminoacídica del 93% (100% cobertura) con HopAO2 de *P. syringae* pv. *actinidiae* MAFF302091 y del 33% con HopAO1 de Psv NCPPB 3335. La distribución de este T3E en el complejo *P. syringae* aún no ha sido estudiada. HopAO2 forma parte del *soft-core* de repertorio de T3E de *P. savastanoi*, y dado que pertenece a la misma familia que HopAO1, nos planteamos si también pudiese estar asociado a huéspedes leñosos.

La filogenia de HopAO1 se construyó con el alineamiento de 462-468 aminoácidos de 64 ortólogos (Tabla A1- Anexo Capítulo III) usando el método de máxima verosimilitud (Figura 1). Las secuencias de HopAO1 de las cepas secuenciadas de Psn y Psr, así como, las cepas Psv PseNe107 y Psv ICMP1411, las cuales están posiblemente truncadas (Capítulo I, Figura 9), no se incluyeron en este análisis. Los resultados revelan la división de HopAO1 en dos grupos

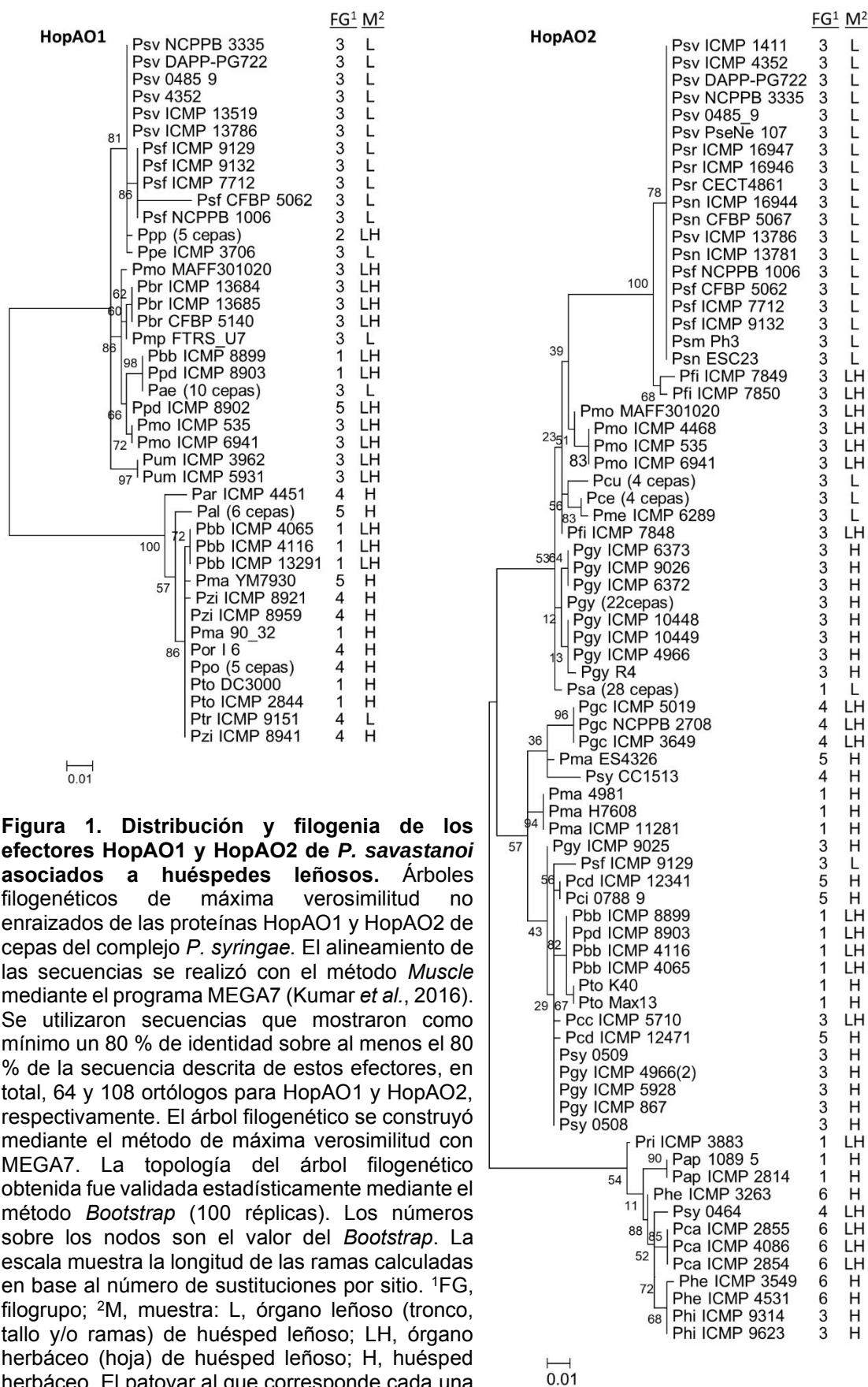


Figura 1. Distribución y filogenia de los efectores HopAO1 y HopAO2 de *P. savastanoi* asociados a huéspedes leñosos. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud no enraizados de las proteínas HopAO1 y HopAO2 de cepas del complejo *P. syringae*. El alineamiento de las secuencias se realizó con el método *Muscle* mediante el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se utilizaron secuencias que mostraron como mínimo un 80 % de identidad sobre al menos el 80 % de la secuencia descrita de estos efectores, en total, 64 y 108 ortólogos para HopAO1 y HopAO2, respectivamente. El árbol filogenético se construyó mediante el método de máxima verosimilitud con MEGA7. La topología del árbol filogenético obtenida fue validada estadísticamente mediante el método *Bootstrap* (100 réplicas). Los números sobre los nodos son el valor del *Bootstrap*. La escala muestra la longitud de las ramas calculadas en base al número de sustituciones por sitio. ¹FG, filogrupo; ²M, muestra: L, órgano leñoso (tronco, tallo y/o ramas) de huésped leñoso; LH, órgano herbáceo (hoja) de huésped leñoso; H, huésped herbáceo. El patovar al que corresponde cada una de las abreviaturas se indica en la Tabla A1 del Anexo de este Capítulo.

principales, en uno de ellos se incluyeron principalmente cepas del FG3 aisladas de huéspedes leñosos, aunque también se incluyeron ocho cepas de los FG1, FG2 y FG5 aisladas de manchas foliares y manchas de frutos. Las cepas de Psv y Psf analizadas se agruparon en una subrama de este grupo con las cepas de *P. syringae* pv. *papulans*, aisladas de manchas foliares de manzano, y la cepa *P. syringae* pv. *persicae* ICMP 3706, aislada de tejido infectado de ciruelo mirobolano, todas pertenecientes al FG3. El segundo grupo está compuesto por 24 cepas, de las cuales, 20 se aislaron de huéspedes herbáceos y pertenecen a los FG1, FG4, y FG5. De las cuatro cepas restante, tres de ellas pertenecen al FG1 y se aislaron órganos herbáceos de huéspedes leñosos, y la última pertenece al FG4 y se aisló de órganos leñosos de huéspedes leñosos (Figura 1). Por tanto, y aunque HopAO1 se codifica mayoritariamente en cepas de *P. syringae* aisladas de huéspedes leñosos, también se codifica en cepas aisladas de huéspedes herbáceos.

La filogenia de HopAO2 se construyó con el alineamiento de 282-339 aminoácidos de 108 ortólogos (Tabla A1- Anexo Capítulo III) usando el método de máxima verosimilitud (Figura 1). El árbol filogenético mostró 2 grupos principales, en uno de ellos se agrupan 8 cepas de los FG1, FG3 y FG6, aisladas de huéspedes herbáceos y otras 4 de los FG4 y FG6 aisladas de órganos herbáceos de huéspedes leñosos. El otro grupo principal se divide en dos subgrupos, en uno de ellos se agrupan principalmente cepas pertenecientes al FG3 y al FG1 aisladas de órganos leñosos de huéspedes leñosos, aunque también se agrupan siete cepas de *P. syringae* pv. *ficuserectae* y *mori* (FG3) aisladas de órganos herbáceos de huéspedes leñosos y 29 cepas de *P. syringae* pv. *glycinea* (FG3) aisladas de huéspedes herbáceos. En el otro subgrupo se agrupan 25 cepas, de las cuales 24 se aislaron de huéspedes herbáceos u órganos herbáceos de huéspedes leñosos, y pertenecientes a los FG1, FG3, FG4 y FG5. La cepa restante corresponde con el alelo truncado de HopAO2 de Psf ICMP 9129 aislada de excrecencias de fresno (Figura 1). La distribución de las secuencias de HopAO2 de estas cepas no está relacionada con su FG, lo que sugiere la existencia de transferencia horizontal en el complejo *P. syringae* de este T3E.

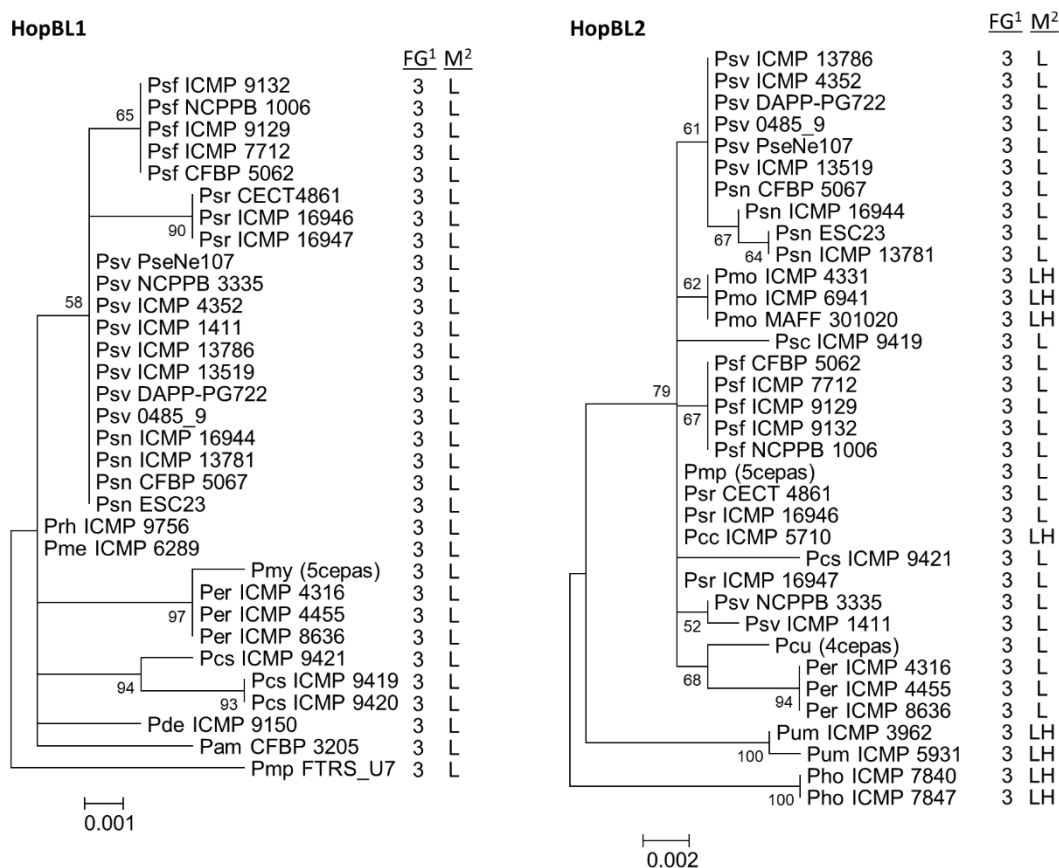


Figura 2. Distribución y filogenia de los efectores HopBL1 y HopBL2 de *P. savastanoi* asociados a huéspedes leñosos. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud no enraizados de las proteínas HopBL1 y HopBL2 de cepas del complejo *P. syringae*. El alineamiento de las secuencias se realizó con el método *Muscle* mediante el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se utilizaron secuencias que mostraron como mínimo un 80 % de identidad sobre al menos el 80 % de la secuencia descrita de estos efectores, en total, 36 y 42 ortólogos para HopBL1 y HopBL2, respectivamente. El árbol filogenético se construyó mediante el método de máxima verosimilitud con MEGA7. La topología del árbol filogenético obtenida fue validada estadísticamente mediante el método *Bootstrap* (100 réplicas). Los números sobre los nodos son el valor del *Bootstrap*. La escala muestra la longitud de las ramas calculadas en base al número de sustituciones por sitio. ¹ FG, filogrupo; ² M, muestra: L, órgano leñoso (tronco, tallo y/o ramas) de huésped leñoso; LH, órgano herbáceo (hoja) de huésped leñoso; H, huésped herbáceo. El patovar al que corresponde cada una de las abreviaturas se indica en la Tabla A1 del Anexo de este Capítulo.

La filogenia de HopBL1 se construyó con el alineamiento de 716-733 aminoácidos de 36 ortólogos (Tabla A1- Anexo Capítulo III) usando el método de máxima verosimilitud (Figura 2). El ortólogo de la cepa Psm Ph3 se excluyó por estar truncado. Este T3E solo se encontró en cepas del FG3 aisladas de órganos leñosos de huéspedes leñosos. Todas las cepas forman un clado, a excepción de la cepa *P. syringae* pv. morsprunorum FTRS_U7 que apareció separada del resto. Dentro de este clado existen tres subramas, una constituida por las cepas de la especie *P. savastanoi*, otra por las cepas de *P. syringae* pv.

erobotryae y *P. syringae* pv. myricae, y por último la subrama en la que se agrupan las cepas de *P. syringae* pv. castaneae.

La filogenia de HopBL2 se construyó con el alineamiento de 750-751 aminoácidos de 42 ortólogos (Tabla A1- Anexo Capítulo III) utilizando el método de máxima verosimilitud (Figura 2). El ortólogo de la cepa Psm Ph3 se excluyó también por estar truncado. De igual manera que para HopBL1, HopBL2 solo se encontró en cepas del FG3 aisladas, la mayoría de ellas, de órganos leñosos de huéspedes leñosos. Todas las cepas se agruparon en un clado a excepción de las cepas *P. syringae* pv. photiniae y *P. syringae* pv. ulmi, ambas aisladas de órganos herbáceos de huéspedes leñosos. Las otras cepas aisladas de órganos herbáceos de huéspedes leñosos se encontraron formando parte del clado, en el que las cepas de *P. syringae* pv. mori se agruparon en una subrama. El resto de cepas del clado se agruparon en cuatro subramas, en una de ellas se agruparon las cepas de Psn y la mayoría de cepas de Psv, mientras que las cepas de Psv NCPPB 3335 e ICMP 1411 se agruparon en otra subrama diferente. De las dos subramas restantes, una de ellas estaba constituida por las cepas de Psf analizadas y la otra por las cepas de *P. syringae* pv. cunninghamiae y *P. syringae* pv. erobotryae. El resto de las cepas del clado no se agruparon en subramas.

Papel en virulencia en plantas de olivo y adelfa de los efectores HopBL1 y HopBL2 de *P. savastanoi*

HopBL1 y HopBL2 se describieron por primera vez en la cepa Psv NCPPB 3335 y se caracterizan por presentar un dominio C-terminal SUMO proteasa (PF02902), previamente asociado con varios T3E de bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas*, como es XopD (Matas *et al.*, 2014). De ambos T3E se ha demostrado su transcripción dependiente de HrpL, su translocación a través del T3SS y su interferencia con los sistemas de defensa de la planta (Matas *et al.*, 2014). Debido a la presencia exclusiva de estos T3E efectores en cepas aisladas de huéspedes leñosos, resulta particularmente interesante analizar el papel de estos T3E en la virulencia de *P. savastanoi*. Para este estudio, se eligió la cepa Psv NCPPB 3335, descrita como una cepa modelo ideal para el estudio de la

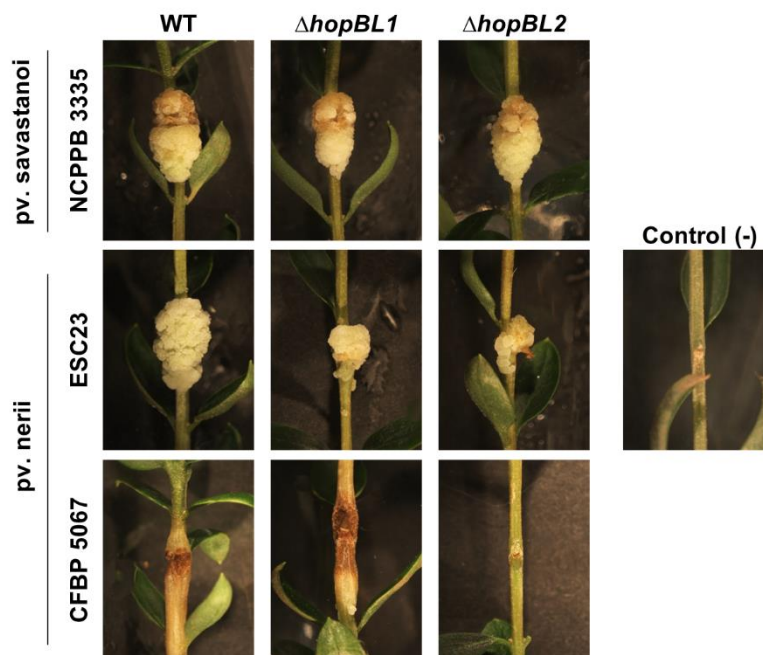


Figure 3. Papel de los efectores *hopBL1* y *hopBL2* en la virulencia de *P. savastanoi* pvs. *savastanoi* y *nerii* en plantas de olivo micropropagadas *in vitro*. Se muestran los síntomas producidos a 52 días posinoculación por las cepas silvestres y por sus mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$. C-, plantas inoculadas con $MgCl_2$ 10 mM.

patogenicidad y virulencia en huéspedes leñosos, y dos cepas del patovar Psn, ESC23 y CFBP 5067. Se construyeron cepas mutantes de *hopBL1* y *hopBL2* mediante la integración de un plásmido en el ORF de estos genes. Plantas de olivo micropropagas *in vitro* se inocularon con las cepas silvestres Psv NCPBP 3335, Psn ESC23 y Psn CFBP 5067 y sus mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$. A los 52 días posinoculación (dpi), los mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ derivados de la cepa Psv NCPBP 3335 indujeron tumores muy similares a los inducidos en la cepa silvestre (Figura 3). Sin embargo, los mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ derivados de la cepa Psn ESC23 produjeron tumores de un tamaño menor los producidos por la cepa silvestre (Figura 3). El mutante $\Delta hopBL1$ derivado de Psn CFBP 5067 produjo una necrosis acompañada de engrosamiento en el tallo del olivo similar al producido por la cepa silvestre, mientras que el mutante $\Delta hopBL2$ no indujo síntomas y las plantas inoculadas presentaron un fenotipo muy similar al obtenido en la inoculación del control negativo (Figura 3). Por tanto, en plantas de olivo micropropagadas, el papel de estos T3E en virulencia resultó ser dependiente de la cepa analizada, mientras que no se observó un papel relevante para la cepa de Psv NCPBP 3335, ambos efectores mostraron un papel en la

virulencia de Psn ESC23, y solo HopBL2 en Psn CFBP 5067.

A continuación, se realizó un estudio en mayor profundidad de los mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ de la cepa Psn ESC23 en plantas de olivo y adelfa adultas (leñosas). Se eligió esta cepa porque presentaba una atenuación de la virulencia para ambos mutantes y porque, como se muestra en el Capítulo I de esta tesis doctoral, produce síntomas visibles en el punto de inoculación tanto en plantas de olivo leñosas como en la variedad de adelfa utilizada en este trabajo. Se construyeron también las cepas mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ complementadas con los alelos HopBL1 y HopBL2 de Psv NCPPB 3335. Aunque la secuencias de HopBL1 es 100% idénticas entre ambas cepas, la secuencia de HopBL2 difiere en 5 de sus 751 aminoácidos. La clonación del gen *hopBL2* de Psn ESC23 en un vector de expresión de *E. coli* y *Pseudomonas* resultó infructuosa.

En las plantas de olivo leñosas, a los 90 dpi la cepa silvestre Psn ESC23 produjo la inducción de tumores en el 92% de los puntos inoculados (pi) y engrosamientos en el 8% de los pi (Figura 4), lo que coincide con los resultados previos (Capítulo I, Figura 3). El mutante $\Delta hopBL1$ produjo tumores en el 80 % de los pi, mientras que el resto de puntos mostraron un fenotipo similar al control negativo (Figura 4). La cepa complementada mostró una sintomatología similar a la cepa mutante $\Delta hopBL1$. Con respecto al mutante $\Delta hopBL2$, este produjo tumores en el 86% de los pi y engrosamiento en el 3%, mostrando el resto de los pi un fenotipo similar al control negativo (11%) (Figura 4). En la cepa complementada se observó una reducción en la virulencia, produciéndose un fenotipo similar al control negativo en el 52% de los pi (Figura 4). La cepa silvestre alcanzó una densidad poblacional de 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/lesión, lo que coincide con los recuentos obtenidos para esta cepa en olivo (Capítulo 1, Figura 4). El mutante $\Delta hopBL1$ alcanzó una población significativamente menor a la cepa silvestre de 10^3 UFC/lesión, mientras que la población alcanzada por el mutante $\Delta hopBL2$ es similar a la de la cepa silvestre. Con respecto a las cepas complementadas, no se obtuvieron recuentos viables del mutante $\Delta hopBL1$ complementado con *hopBL1* y del mutante $\Delta hopBL2$

complementado con *hopBL2-Psv* se obtuvieron recuentos inferiores a 10 UFC/lesión. Estos resultados sugieren que *hopBL1* podría tener un papel en la virulencia de Psn ESC23 en plantas de olivo lignificadas, mientras que *hopBL2* no. Además, la expresión de estos T3E desde un plásmido de expresión constitutiva afecta negativamente a la supervivencia de la bacteria en la planta.

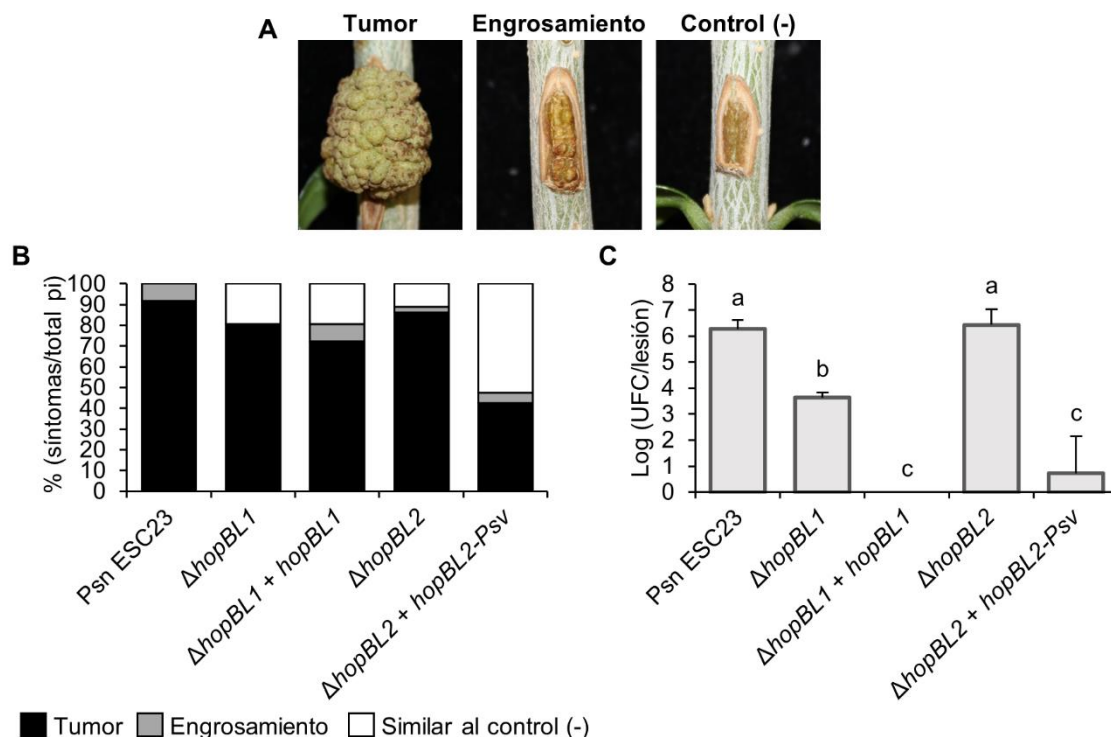


Figura 4. Papel en la virulencia de los efectores HopBL1 y HopBL2 de *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) ESC23 en plantas de olivo. (A) Diversidad de los síntomas generados por la cepa Psn ESC23 y sus mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ en plantas de olivo lignificadas a 90 días posinoculación (dpi). Control (-), plantas inoculadas con $MgCl_2$. **(B)** Porcentaje de puntos inoculados (pi), entre 36-40 por cepa, que muestran los diferentes síntomas generados a 90 dpi. **(C)** Densidades poblacionales alcanzadas por las cepas indicadas. Las barras representan la media de la población alcanzada en 2-3 réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) utilizando el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) para las comparaciones múltiples.

En las plantas de adelfa adultas inoculadas, a los 90 dpi, la cepa silvestre Psn ESC23 produjo síntomas en el 96 % de los pi (Figura 5), mientras que las cepas mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ mostraron una virulencia reducida. Por el contrario, el mutante $\Delta hopBL1$ indujo en la mayoría de los pi una necrosis leve o un fenotipo similar al control negativo (53% y 37% de los pi, respectivamente), y la cepa complementada con *hopBL1* recuperó parcialmente la virulencia de la cepa silvestre, produciendo engrosamientos acompañados de necrosis en un 19% de los pi (Figura 5). La cepa mutante $\Delta hopBL2$ produjo engrosamientos

acompañado de necrosis en menor proporción que la cepa silvestre (20% frente a 48% de los pi), y necrosis severa y leve en la mayoría de los pi (33% y 30%, respectivamente) (Figura 5). Sin embargo, la cepa complementada con *hopBL2-Psv* indujo una sintomatología similar a la cepa silvestre (Figura 5). La media de la población alcanzada por el mutante $\Delta hopBL1$ (10^5 UFC/lesión) fue significativamente inferior a la alcanzada por la cepa silvestre (10^7 UFC/lesión), mientras que la población alcanzada por la cepa complementada no se distinguió estadísticamente de las poblaciones alcanzadas por la cepa silvestre y por el mutante (Figura 5). La cepa mutante $\Delta hopBL2$, alcanzó una población bacteriana similar a la cepa silvestre (10^7 UFC/lesión), mientras que la población de la cepa complementada (10^5 UFC/lesión) fue significativamente inferior (Figura 5). Por tanto, aunque ambos efectores tienen un papel en la virulencia de Psn ESC23 en plantas de adelfa lignificadas, solo HopBL1 tiene también un papel en la supervivencia de la cepa en este huésped.

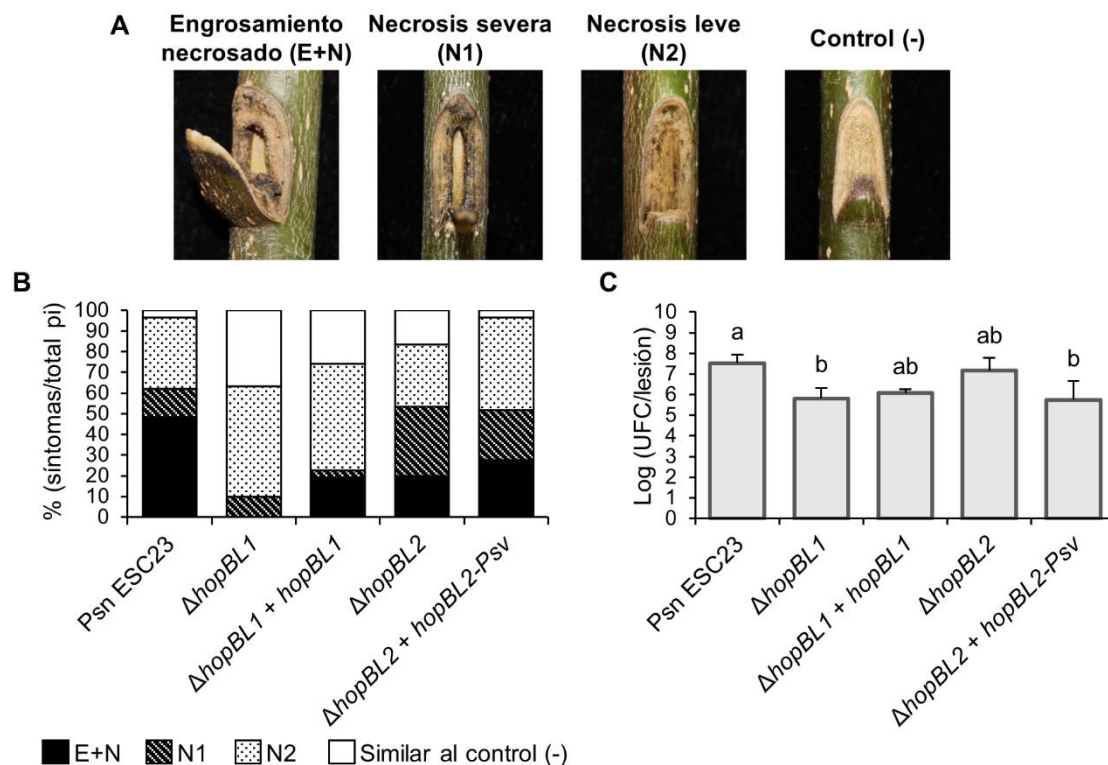
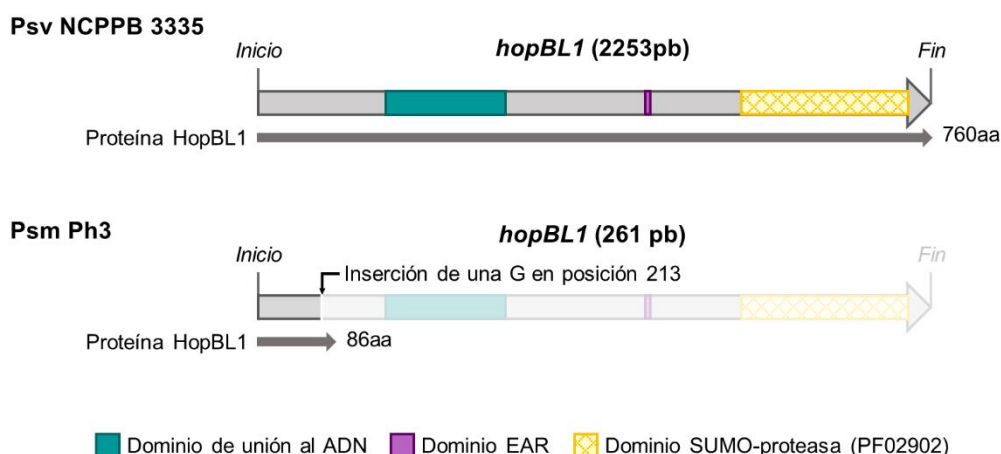


Figura 5. Papel en la virulencia de los efectores HopBL1 y HopBL2 de *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) ESC23 en plantas de adelfa. (A), (B) y (C) como se indica en el pie de la Figura 4, con las siguientes diferencias: (B) el número de pi infectados en plantas de adelfa fue de 29-31 por cepa; (C) la media de las densidades poblacionales se calculó a partir de 3 réplicas biológicas.

Las versiones funcionales de HopBL1 y HopBL2 no disminuyen la virulencia de Psm Ph3 en dipladenia

En el capítulo I de esta tesis doctoral se observó que los efectores *hopBL1* y *hopBL2* estaban truncados exclusivamente en la cepa Psm Ph3, única cepa aislada de dipladenia y secuenciada hasta la fecha. En la cepa Psm Ph3, se observó que el efector *hopBL1* presentaba una inserción de una guanina en la posición 213 que cambiaba la pauta de lectura y generaba una proteína de 86 aminoácidos (aa) en lugar de la proteína completa de 750 aa (Figura 6A). Como se muestra en la Figura 6A, la proteína que se produce en Psm Ph3 carece de los tres dominios funcionales descritos en HopBL1 (Matas *et al.*, 2014), por lo tanto, en esta cepa no sería funcional. Con el objetivo de comprobar si este truncamiento está conservado en el patovar Psm, se amplificó mediante PCR y se secuenció el gen *hopBL1* en el resto de todas las cepas de Psm descritas hasta el momento,

A



B

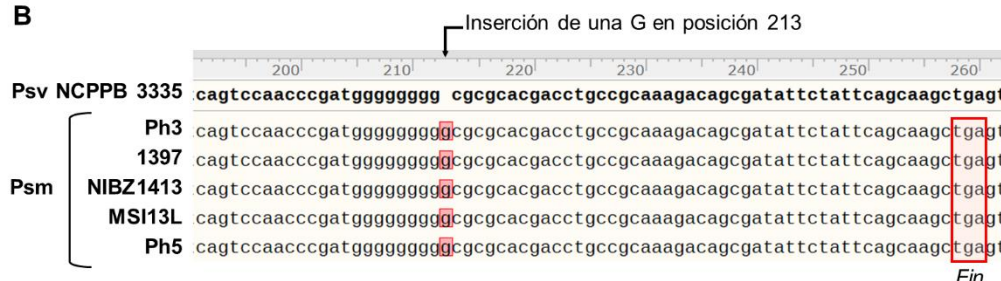


Figura 6. Comparativa del gen *hopBL1* y de la su proteína en aislados de *P. savastanoi* de dipladenia y olivo. (A) Esquema de la secuencia del gen *hopBL1* en la cepa de referencia *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 y en *P. savastanoi* pv. *mandevillae* (Psm) Ph3. (B) Comparativa de las secuencias del gen *hopBL1* en Psv NCPPB 3335 y en cinco cepas de Psm.

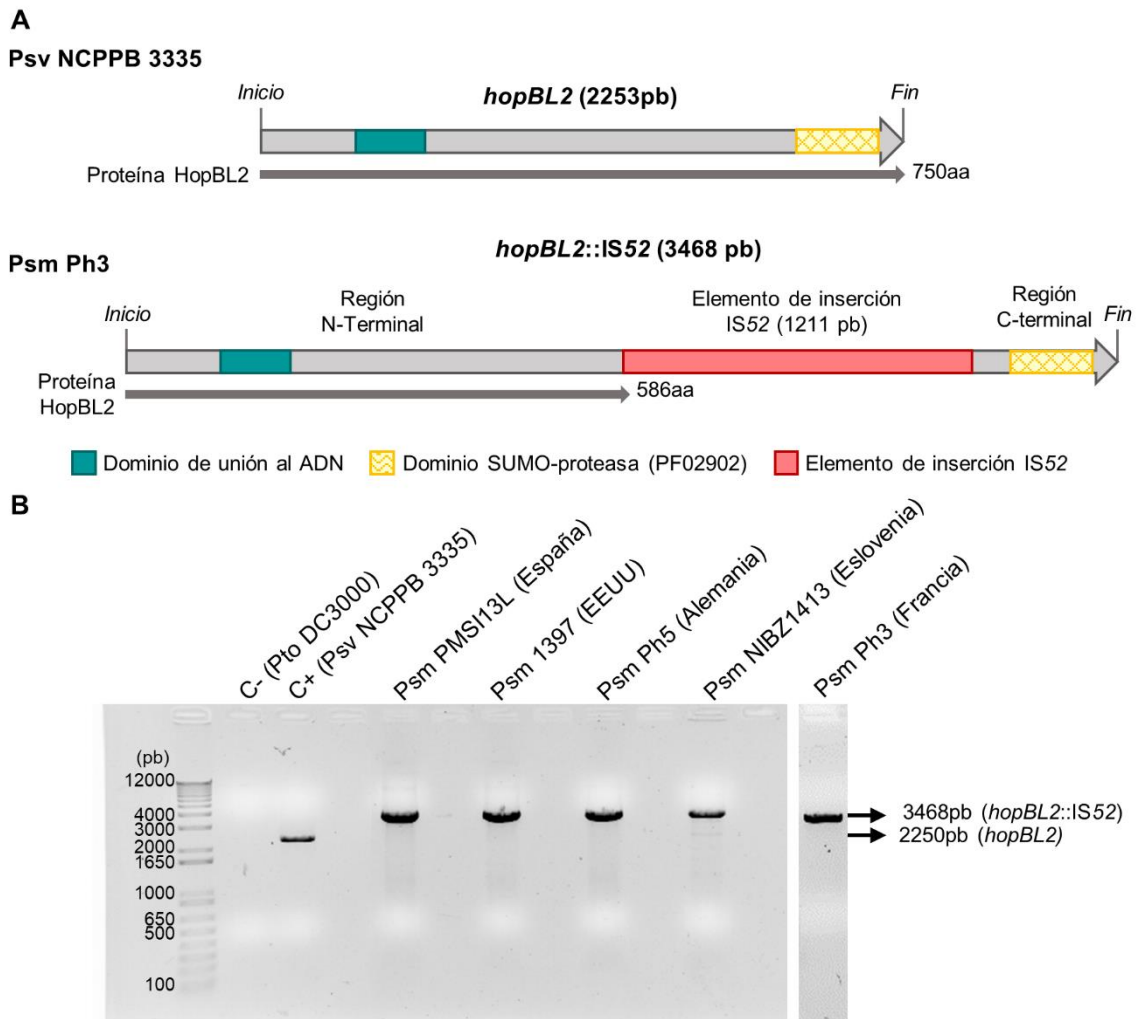


Figura 7. Comparativa de la secuencia del gen *hopBL2* en cepas de *P. savastanoi* aisladas de olivo y diptadenia. (A) Esquema de la secuencia del gen *hopBL2* en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 y en cepas de *P. savastanoi* pv. *mandevillae*. *hopBL2::IS52*, gen truncado por la inserción de una secuencia IS52. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos del gen *hopBL2* amplificados mediante PCR a partir de DNA genómico de cepas de *P. savastanoi* y *P. syringae* pv. *tomato* (Pto). C- y C+, control negativo y positivo, respectivamente.

procedentes de distintos lugares del mundo y disponibles en nuestro laboratorio. Como se observa en la Figura 6B, todas las cepas de Psm analizadas codifican la misma inserción. El gen *hopBL2* se encontró en el borrador del genoma de la cepa Psm Ph3 dividido en dos partes que cubrían el 100% de la secuencia de *hopBL2* de Psv NCPPB 3335. Con el objetivo de comprobar si este efector estaba completo en Psm Ph3, se amplificó por PCR y se observó que en esta cepa el fragmento generado fue 1000 pares de bases (pb) mayor que el de Psv NCPPB 3335. El fragmento con el gen *hopBL2* de Psm Ph3 se clonó en el plásmido *pGEM-T easy* (Tabla 3), se secuenció, y con la secuencia obtenida se realizó una búsqueda

mediante BLAST en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dentro de este gen se localizó un elemento de inserción IS52, de 1211 pb, en la posición 1743, que rompe la pauta de lectura y generaba una proteína de 586 aa en lugar de 750 aa. Por tanto, en HopBL2 de Psm Ph3 se ha perdido el dominio SUMO proteasa (PF02902), relacionado con la inhibición de la percepción inicial del patógeno por la planta (Matas *et al.*, 2014) (Figura 7A). Con el objetivo de comprobar si este truncamiento estaba conservado en el patovar Psm, se realizó una amplificación por PCR del gen *hopBL2* en todas las cepas descritas de Psm, utilizando como control negativo la cepa *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, en la que está ausente, y como control positivo la cepa Psv NCPPB 3335 (Figura 7B). De todas las cepas aisladas de dipladenia, se amplificó un fragmento de 3468 pb que correspondían con *hopBL2::IS52* (Figura 7B). En conclusión, todas las cepas de dipladenia analizadas presentan versiones truncadas de *hopBL1* y *hopBL2*, sugiriendo que estos T3E podrían estar siendo reconocidos por los sistemas de defensa de dipladenia.

Con el objetivo de comprobar el papel de estos T3E en la interacción de Psm con dipladenia, se construyeron cepas derivadas de la cepa Psm Ph3 que expresaban los T3E HopBL1 (pCPP5040:*hopBL1*) y HopBL2 (pCPP5040:*hopBL2*) de Psv NCPPB 3335. Con estas cepas se realizó un ensayo de patogenicidad en plantas de dipladenia de un año (Figura 8). En este ensayo se incluyó la cepa Psm Ph3 con el plásmido pCPP5040 vacío, para poder comprobar si la expresión del plásmido por si solo podía afectar al crecimiento de Psm Ph3 en la planta. A los 55 dpi, no se observaron diferencias ni en la sintomatología producida ni en la densidad poblacional alcanzada en las plantas de dipladenia entre la cepa silvestre Psm Ph3 y sus cepas derivadas portadoras de pCPP5040, pCPP5040:*hopBL1* y pCPP5040:*hopBL2* (Figura 8). Además, para comprobar que las cepas complementadas no perdían el plásmido, los recuentos se realizaron tanto en LB como en LB suplementado con Gm. No se observaron diferencias significativas de los recuentos obtenidos entre ambos medios, lo que indicó que el plásmido no se había perdido (Figura 8).

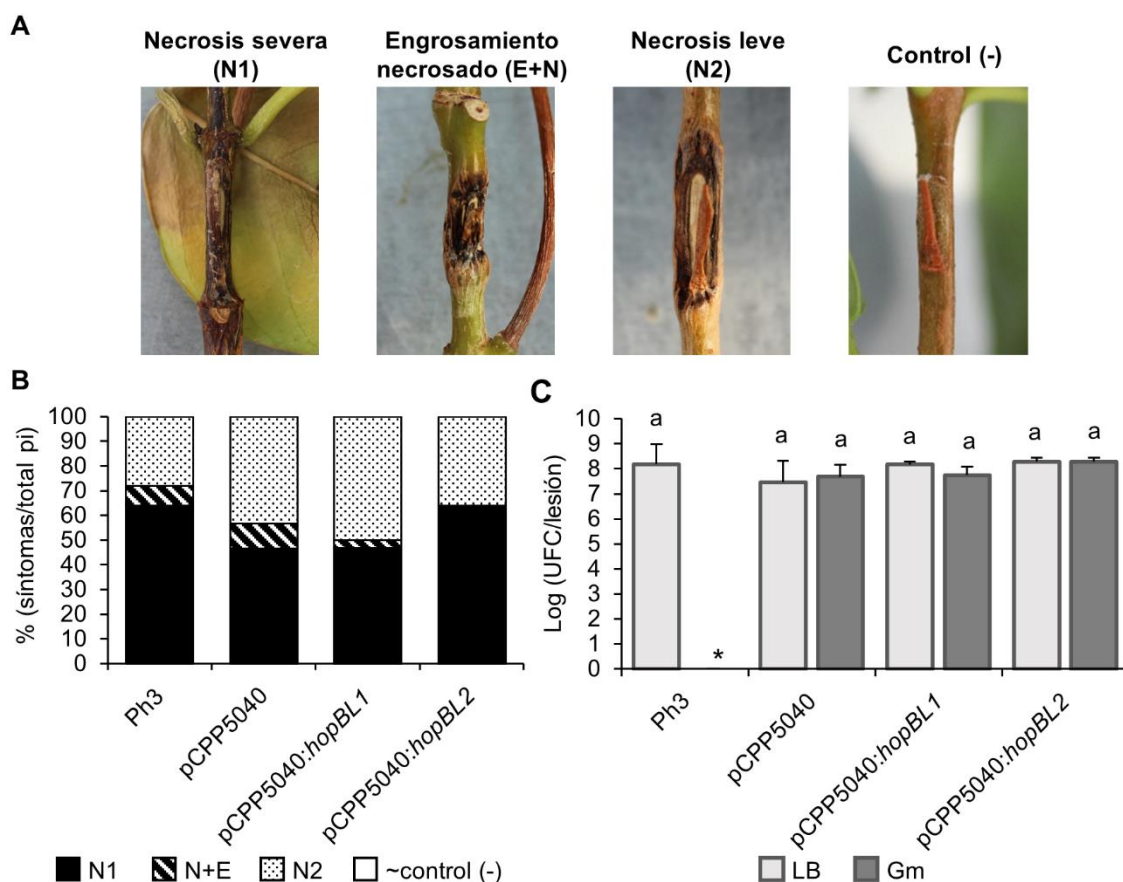


Figura 8. Ensayo de virulencia en dipladenia de la cepa de *P. savastanoi* pv. *mandevillae* (Psm) Ph3 y sus derivadas expresando los efectores HopBL1 y HopBL2 de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335. (A) Diversidad de síntomas generados por la cepa Psm Ph3 y sus cepas derivadas en dipladenia a 58 días posinoculación (dpi). Control (-), plantas inoculadas con MgCl₂. **(B)** Porcentaje de puntos inoculados (pi) que muestran los diferentes síntomas. En total se infectaron 3 plantas por cepa, cada una de las cuales se inoculó en aproximadamente 10 pi diferentes (25-30 pi por cepa en total). N1, necrosis severa; E+N, engrosamiento necrosado; N2, necrosis leve; ~Control (-), similar al fenotipo del control negativo. **(C)** Densidades poblacionales alcanzadas por la cepa Psm Ph3 y sus cepas derivadas en dipladenia. Las barras representan la media de la población alcanzada de tres réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. La letra “a” en todos indica que no se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) utilizando el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) para las comparaciones múltiples. Los recuentos se sembraron en medio LB y LB-Gm con el objetivo de analizar la pérdida del plásmido, el * indica que la cepa silvestre Psm Ph3 no crece en gentamicina (Gm).

Localización subcelular del efector HopBL2 en hojas de *N. benthamiana*

Con el objetivo de caracterizar el papel de HopBL2 *in planta*, se realizó una fusión traduccional del extremo C-terminal del T3E a GFP y se realizó una expresión transitoria de la misma mediada por *Agrobacterium* en hojas de *N. benthamiana*. Para determinar el tiempo adecuado para visualizar la localización subcelular, tras la infección por *Agrobacterium* de esta fusión, se analizó su

expresión mediante *Western Blot* tras 24 y 48 h, obteniéndose una mayor expresión a 24 h (datos no mostrados). La clonación del gen *hopBL1* en el vector pGWB5 también se realizó, pero no se consiguió detectar su expresión mediante *Western Blot* en las hojas de *N. benthamiana* ni a 24 ni a 48 h (datos no mostrados), por lo que no se analizó la localización subcelular de este T3E.

En el ensayo de localización subcelular se utilizaron como controles YFP libre y un marcador de membrana plasmática, LTI6B. Como se observa en la Figura 9, HopBL2 se localizó en el núcleo, concretamente en *loci* subnucleares. También se localizó en membrana y citoplasma, aunque la fluorescencia de HopBL2-GFP no se distribuyó de forma homogénea en estos compartimentos, en los que se observaron pequeños puntos fluorescentes (Figura 9).

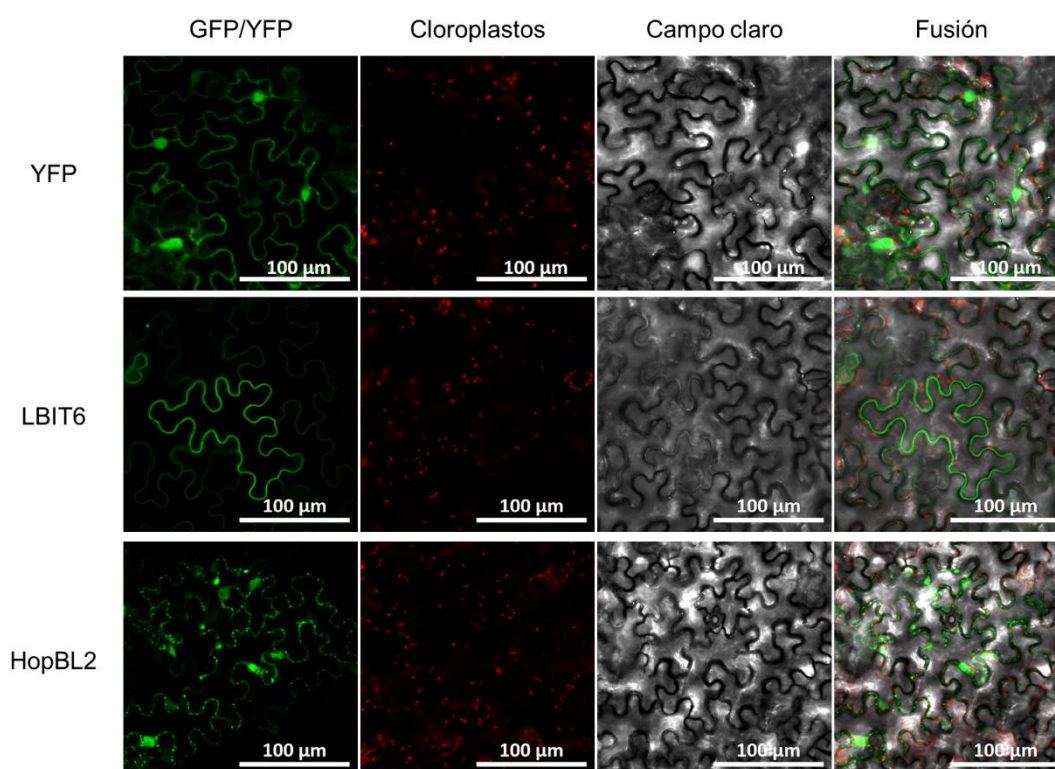


Figura 9. Localización subcelular de HopBL2 *in planta*. Se realizó una expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* en hojas de *N. Benthamiana* con la proteína amarilla fluorescente libre (YFP), el marcador de membrana plasmática LTI6B-GFP y HopBL2-GFP. Las imágenes de microscopía confocal mostradas se tomaron a 24 horas posinfiltración. En verde se muestra la fluorescencia de la GFP o YFP y en rojo la autofluorescencia de los cloroplastos. “Fusión” indica la superposición de las imágenes obtenidas para la GFP/YFP, la fluorescencia roja de los cloroplastos y el campo claro.

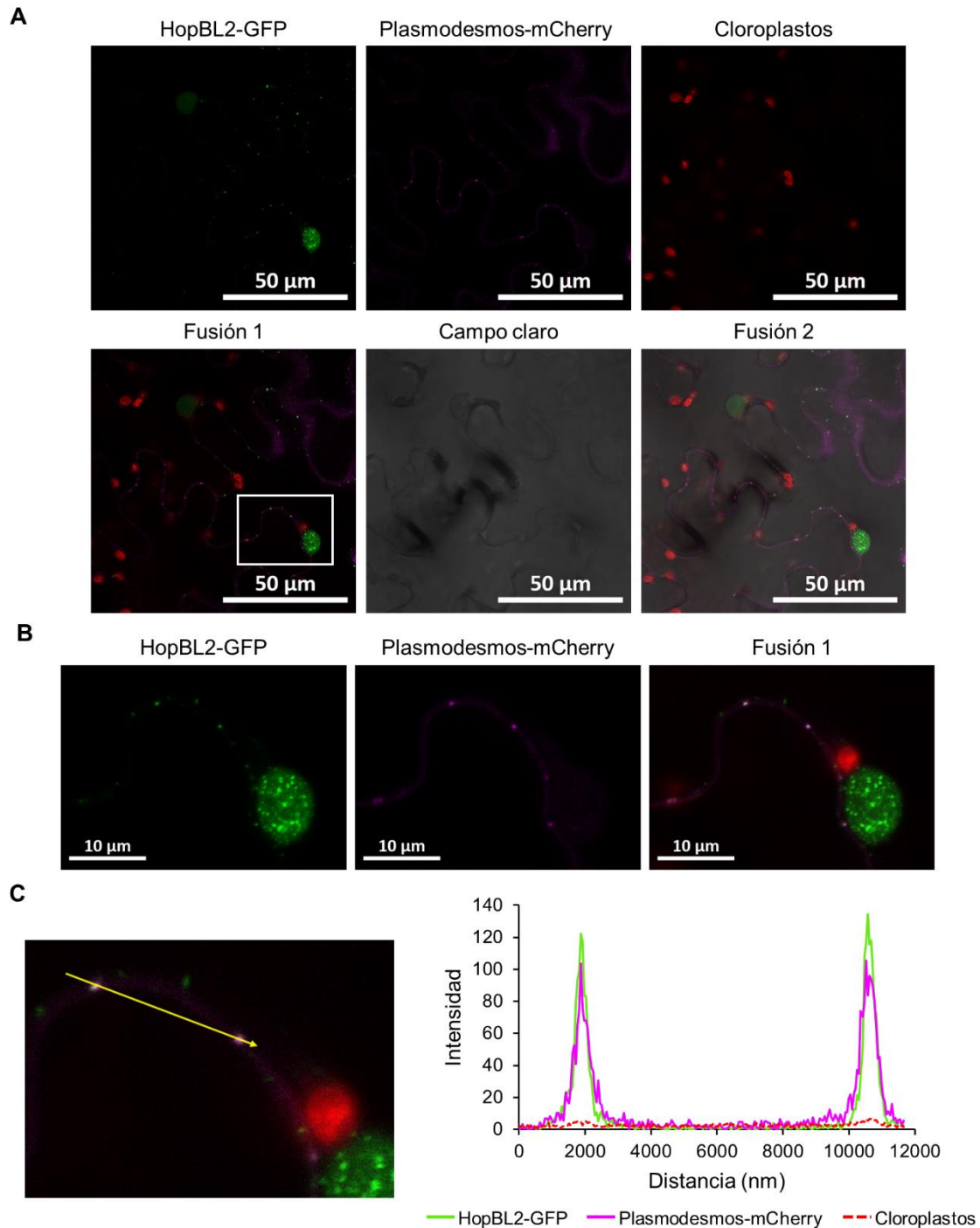


Figura 10. Colocalización subcelular de HopBL2 con plasmodesmos *in planta*. Se realizó una expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* en hojas de *N. Benthamiana* con HopBL2-GFP y PDPL1-mCherry (marcador de plasmodesmos). **(A)** Imágenes de microscopía confocal tomadas a 24 horas posinfiltración. En verde se muestra la fluorescencia de la GFP, en morado la fluorescencia de la mCherry y en rojo la autofluorescencia de los cloroplastos. “Fusión 1” indica la superposición de las imágenes de GFP + mCherry + cloroplastos y “Fusión 2” la superposición de GFP + mCherry + cloroplastos + campo claro. **(B)** Imagen aumentada de la región marcada en **(A)** con un recuadro. “Fusión 1” indica la superposición de GFP + mCherry + cloroplastos. **(C)** A la izquierda se muestra una zona aumentada de la imagen “Fusión 1” mostrada en **(B)**, a la derecha se muestra la representación gráfica de la intensidad de la fluorescencia emitida a lo largo de la zona marcada con una flecha amarilla en la imagen de la izquierda. El inicio de la flecha corresponde con el 0 del eje de las X en la gráfica.

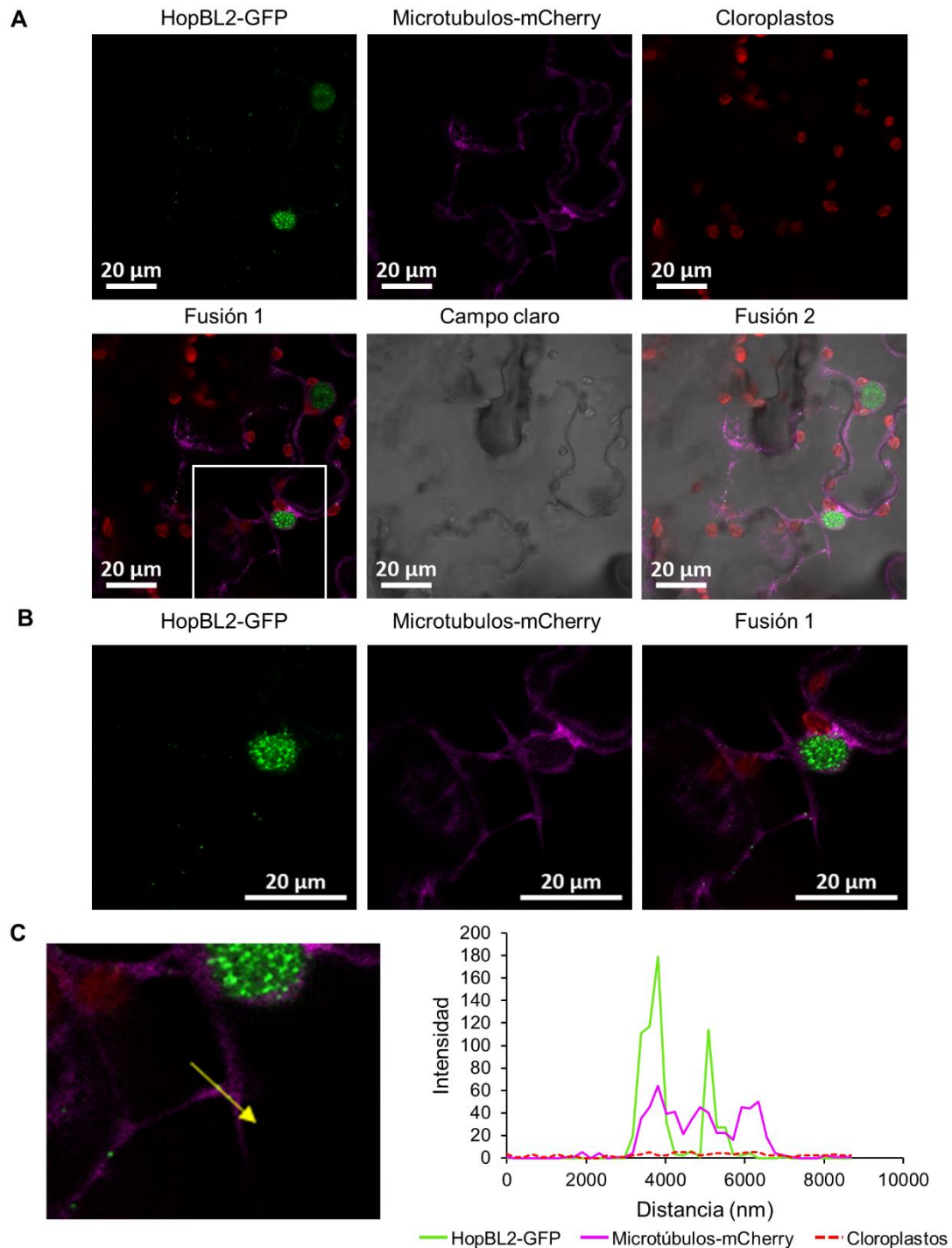


Figura 11. Colocalización subcelular de HopBL2 con microtúbulos *in planta*. Se realizó una expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* en hojas de *N. Benthamiana* con HopBL2-GFP y mCherry-MAP4-MDB (marcador de microtúbulos). **(A)** Imágenes de microscopía confocal obtenidas a 24 horas posinfiltración. En verde se muestra la fluorescencia de la GFP, en morado la fluorescencia de la mCherry y en rojo la autofluorescencia de los cloroplastos. “Fusión 1” indica la superposición de las imágenes de GFP + mCherry + cloroplastos y “Fusión 2” la superposición de GFP + mCherry + cloroplastos + campo claro. **(B)** Imagen aumentada de la región marcada en **(A)** con un recuadro. “Fusión 1” indica la superposición de las imágenes de GFP + mCherry + cloroplastos. **(C)** A la izquierda se muestra una zona aumentada de la imagen “Fusión 1” mostrada en **(B)**, a la derecha se muestra la intensidad de la fluorescencia emitida a lo largo de la zona marcada con la flecha amarilla. El inicio de la flecha corresponde con el 0 del eje de las X en la gráfica.

El patrón de punteado observado en la localización de HopBL2-GFP en la membrana resulta similar al observado por otros autores en la localización de marcadores de plasmodesmos (Thomas *et al.*, 2008), por lo que se decidió realizar un ensayo de colocalización de HopBL2-GFP con el marcador de plasmodesmos PDL1-mCherry (Ivanov and Harrison, 2014). Como resultado de la coinfiltración, se observaron puntos fluorescentes correspondientes a HopBL2 (fluorescencia verde), puntos correspondientes al marcador de plasmodesmos (fluorescencia violeta) y puntos que corresponden con la colocalización de ambas proteínas (fluorescencias verde + violeta = gris claro). Se analizó además la intensidad de la fluorescencia emitida por dos puntos grises, observándose claramente que existe un solapamiento de ambas señales, confirmándose la colocalización de HopBL2 con el marcador de plasmodesmos en las zonas que emitían ambas fluorescencias (Figura 10).

Además, durante la visualización de las muestras se observó que la localización de los puntos fluorescentes era variable, siguiendo algunos de ellos una trayectoria lineal de un lado a otro de la célula (datos no mostrados). Con el objetivo de analizar si este movimiento podría estar asociado a microtúbulos, se realizó una colocalización de HopBL2-GFP con el marcador de microtúbulos mCherry-MAP4-MDB (Ivanov and Harrison, 2014). En la Figura 11, se muestra que algunos puntos que emitían la fluorescencia verde de HopBL2-GFP, colocalizan con la fluorescencia violeta emitida por los microtúbulos. Además, se analizó la intensidad de la fluorescencia emitida por dos de estos puntos, confirmándose que, aunque la señal de los microtúbulos es más débil que la de HopBL2-GFP, existe colocalización de ambos marcadores (Figura 11).

DISCUSIÓN

La distribución de HopAO1, HopAO2, HopBL1 y HopBL2 en el complejo *P. syringae* está asociada con huéspedes leñosos

La distribución de T3E en cepas con diferente rango de huésped se está convirtiendo en un sello distintivo de la adaptación evolutiva de los patógenos bacterianos a sus respectivos huéspedes. Hemos analizado la presencia de los T3E pertenecientes al *soft-core* de los patovares aislados de huéspedes leñosos de *P. savastanoi* en diferentes cepas de *P. syringae*. Los resultados obtenidos para HopAO1, HopBL1 y HopBL2 (Figuras 1 y 2) coinciden con la asociación de estos T3E con huéspedes leñosos previamente descrita utilizando un número reducido de genomas (Matas *et al.*, 2014; Nowell *et al.*, 2016), y sugiere su diversificación dentro del complejo *P. syringae* en función de la naturaleza herbácea/leñosa de su huésped de aislamiento. En el caso de HopAO2, esta asociación no resulta tan evidente, dado que en la subrama de la filogenia en la que se agrupan las cepas aisladas de huéspedes leñosos también se localizan cepas de *P. syringae* pv. *glycinea* aisladas de huéspedes herbáceos. Estos resultados implican que no ha existido una separación clara de la secuencia de este efector en función de la naturaleza herbácea/leñosa de su huésped de aislamiento. Por el contrario, la filogenia de HopAO1 muestra una rama que se localizan exclusivamente cepas del FG1 (*P. syringae* pv. *berberidis* y *P. syringae* pv. *philadelphii*), FG2 (*P. syringae* pv. *papulans*) y FG3 (todas las cepas de *P. savastanoi* analizadas y *P. syringae* pv. *persicae*, pv. *meliae*, pv. *broussonetiae*, pv. *morsprunorum*, pv. *mori*, pv. *aesculi* y pv. *ulmi*), todas ellas aisladas de huéspedes leñosos, lo que sugiere una diversificación de la secuencia de este T3E dependiente de la naturaleza herbácea/leñosa del huésped de aislamiento.

Con respecto a HopBL1 y HopBL2, su presencia exclusiva en cepas del FG3 aisladas de huéspedes leñosos sugiere que la familia HopBL podría tener un papel relevante en la interacción con los huéspedes leñosos. Solo las cepas de *P. savastanoi* analizadas y las tres cepas de *P. syringae* pv. *eriobotryae* presentan ambos T3E, sugiriendo que en estas cepas estos T3E podrían jugar un papel

relevante en la interacción con sus respectivos huéspedes. De hecho, se ha descrito que un homólogo de HopBL1 (PsvA) es necesario para la patogenicidad de *P. syringae* pv. *eriobotryae* NAE 6 en níspero (Kamiuntén, 1999), lo que corrobora nuestra hipótesis.

Los efectores HopBL1 y HopBL2 tienen un papel en la virulencia de *P. savastanoi* en plantas de olivo y adelfa

En las inoculaciones artificiales realizadas en las plantas de olivos micropropagadas *in vitro* no lignificadas se observa que las cepas silvestres Psn NCPPB 3335 y Psn ESC23 producen tumores a los 52 dpi, mientras que la cepa Psn CFBP 5067 produce una necrosis acompañada de un engrosamiento. Diferencias en la sintomatología producida en olivos micropropagados *in vitro* por diferentes cepas de Psv y Psn ya se ha descrito previamente, sugiriéndose que se deben a las diferencias en la batería de factores de virulencia implicados en el desarrollo de los síntomas que presentan estas cepas (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). En las inoculaciones realizadas con las cepas mutantes $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ derivadas de estas tres cepas, se observó que el efecto en la virulencia también es dependiente de cepa. Que la mutación de un mismo factor de virulencia genere diferentes fenotipos mutantes en función de la cepa donde se ha realizado no es algo sorprendente, por ejemplo, mutantes de pérdida de función del gen *luxI*, responsable de la síntesis de las moléculas autoinductoras implicadas en la regulación quorum sensing (QS), muestran una virulencia reducida en la cepa Psv DAPP-PG722 (Hosni *et al.*, 2011) pero no en la cepa Psv NCPPB 3335 (Caballo-Ponce *et al.*, 2018). En el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, la comparativa genómica de 20 genomas de *P. savastanoi* han revelado diferencias en el contenido génico, tanto a nivel de cepa como de patovar, que podrían estar relacionadas con las diferencias observadas en la sintomatología y en el rango de huésped entre estas cepas (Moreno-Pérez *et al.*, 2020).

Debido a que los efectores HopBL1 y HopBL2 solo se identificaron en cepas del FG3 aisladas de huéspedes leñosos (Figura 2), fue necesario complementar los resultados obtenidos en olivos micropropagados *in vitro* no lignificados con

un ensayo de patogenicidad en huéspedes adultos lignificados. Para realizar este ensayo se seleccionó la cepa Psn ESC23 por tres motivos, sus mutantes en ambos efectores presentaban una reducción en la virulencia en las plantas de olivo micropropagadas *in vitro*, produce síntomas en las plantas de olivo adultas y, a diferencia de la cepa Psn CFBP 5067, produce síntomas en los puntos de inoculación en nuestro modelo de estudio de adelfa adulta (Capítulo I, Figura 2 y 3). En las plantas de olivo adulto inoculadas solo se observó una pequeña reducción de la virulencia y una disminución significativa de la supervivencia de la cepa mutante $\Delta hopBL1$, pero no en el mutante $\Delta hopBL2$ (Figura 4), lo que sugiere que solo HopBL1 tiene un papel en la virulencia de Psn ESC23 en olivo. La sobreexpresión de los genes de estos T3E desde el promotor constitutivo P_{nptII} en las cepas mutantes complementadas redujo la supervivencia en olivo de estas cepas, lo que sugiere que, la alteración de sus patrones de expresión naturales podría inducir cambios fisiológicos, en la bacteria y/o en el huésped, que resulten tóxicos para la cepa. Esta bajada de la supervivencia se ve reflejada en una gran reducción de la virulencia en la cepa complementada con *hopBL2*, pero que no es tan acusada en la cepa complementada con *hopBL1*, a pesar de que no se obtuvieron recuentos viables para esta cepa. Aunque la supervivencia y la sintomatología observada no se correlacionan al final del ensayo, no hemos realizado un estudio de la dinámica de la población de estas cepas a lo largo del proceso de infección, aspecto que sería de interés analizar, al igual que la expresión de estos genes en las cepas complementadas desde sus propios promotores, en lugar que desde promotores constitutivos fuertes.

En las inoculaciones artificiales realizadas en adelfa con los mutantes Psn ESC23 $\Delta hopBL1$ y $\Delta hopBL2$ se observó una reducción de la virulencia en ambos mutantes, siendo esta reducción mayor para el mutante $\Delta hopBL1$. Además, solo en este mutante se observó una reducción significativa de la población alcanzada con respecto a la cepa silvestre. Estos datos sugieren que, aunque ambos T3E juegan un papel en la virulencia de Psn ESC23 en adelfa, el papel de HopBL1 es más relevante. En Psv NCPPB 3335 se ha descrito que ambos T3E interfieren con la respuesta de defensa primaria (PTI) en tabaco (*Nicotiana tabacum*), pero solo

HopBL1 inhibe la inmunidad mediada por el reconocimiento de T3E (ETI) en tabaco (Matas *et al.*, 2014). Por lo tanto, al igual que en tabaco, estos T3E podrían también interferir de manera diferente con los sistemas de defensa en adelfa.

En el complejo *P. syringae* se ha descrito que PsvA, un homólogo de HopBL1 de localización plasmídica, es necesario para la patogenicidad de *P. syringae* pv. *eriobotryae* NAE 6 en níspero (Kamiuntten, 1999). Por el contrario, el homólogo de HopBL1, XopD, descrito en la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), agente causal de la mancha bacteriana del tomate y el pimiento, parece no ser esencial, puesto que mutantes de pérdida de función de *xopD* siguen siendo virulentos en tomate y pimiento (Noël *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Xcv contiene otro T3E con un dominio SUMO proteasa, AvrRxv, que podría tener una función redundante con XopD (Hotson *et al.*, 2003). En *P. savastanoi*, HopBL1 y HopBL2 podrían tener también funciones parcialmente solapantes que enmascaren el papel individual de estos T3E en la virulencia. Por lo tanto, construir un mutante doble en las cepas de *P. savastanoi* sería esencial para poder estudiar el papel de los T3E HopBL en la virulencia de *P. savastanoi*.

Las versiones funcionales de HopBL1 y HopBL2 no disminuyen la virulencia de Psm Ph3 en dipladenia

En las cinco cepas del patovar *mandevillae* analizadas en este estudio, los T3E *hopBL1* y *hopBL2* están truncados. Estas cepas han sido aisladas de diferentes lugares del planeta (Francia, España, Alemania, Eslovenia y EE. UU), indicando que el truncamiento de estos T3E está conservado dentro del patovar *mandevillae*. Se piensa que las cepas del patovar *mandevillae* provienen evolutivamente de cepas del patovar *nerii* (Eltlbany *et al.*, 2012), en cuyas cepas el ORF de estos T3E está completo, sugiriendo que el truncamiento de los genes de estos T3E puede haberse seleccionado durante la adaptación a las plantas de dipladenia. En el patovar *mandevillae*, el efector HopBL1 es probablemente no funcional, ya que la inserción de una guanina en la posición 213 del gen generaría una proteína de 86 aa que carece de los 3 dominios funcionales (dominio de unión

a DNA, dominio EAR y dominio SUMO proteasa). El efector HopBL2 podría ser no funcional en este patovar, porque presentan la inserción del elemento IS52 que rompe la pauta de lectura y genera una proteína que, aunque incluye el dominio de unión a DNA, no contiene el dominio SUMO proteasa. Las cepas de *P. savastanoi* presentan a lo largo de su genoma diferentes elementos de inserción, en concreto el elemento IS52 se ha descrito previamente en las cepas de *P. savastanoi* PB205-1L y TK2015-3 (Yamada *et al.*, 1986). En estas cepas, IS52, caracterizado por presentar un tamaño de 1209 pb y repeticiones terminales invertidas de 10 pb, está interrumpiendo el gen *iaaM*, involucrado en la síntesis de la fitohormona ácido indolacético (IAA). Se ha descrito que en su inserción están implicadas las secuencias de tetranucleótidos TTAG o CTAG, las cuales se duplican dentro de la secuencia del gen en el que se ha producido la inserción (Yamada *et al.*, 1986). El elemento IS52 en las cepas de Psm tiene un tamaño de 2011 pb y las mismas repeticiones invertidas terminales, así como presenta la secuencia CTAG a ambos lados de la inserción, lo que corresponde con lo previamente descrito. Dentro del complejo *P. syringae* se han descrito elementos de inserción inactivando genes de virulencia, por ejemplo, en la cepa *P. syringae* pv. tomato DC3000 se han descrito varios T3E inactivados por elementos de inserción, como son, *hopAG1::ISPssy*, *hopS1::ISPssy*, *hopH::ISP_{syr4}* y *hopD::IS52* (Wei *et al.*, 2007), este último, inactivado por el mismo elemento de inserción identificado en *hopBL2* de Psm.

En las inoculaciones artificiales realizadas con la cepa Psm Ph3 complementada con los T3E HopBL1 y HopBL2 de Psv NCPPB 3335, no se observaron diferencias ni en la virulencia ni en la densidad poblacional alcanzada por estas cepas con respecto a la cepa silvestre. Aunque estos resultados no concuerdan con nuestra hipótesis de que su truncamiento se haya seleccionado durante el proceso de adaptación de las cepas de *P. savastanoi* a diptadenia, es necesario considerar que, en nuestros ensayos, estos T3E se están expresando desde el promotor constitutivo fuerte P_{nptII} , alterándose su patrón de expresión natural. Por otro lado, el homólogo de HopBL1 presente en Xcv, XopD, tiene un papel durante las últimas etapas de la infección de Xcv de hojas de

tomate, sugiriendo que este efector o bien se secreta más tarde que otros T3E, o que deba alcanzar un umbral de concentración para que altere la transcripción del huésped (Kim *et al.*, 2008). Otro factor que considerar es el método de infección utilizado en nuestros ensayos, que supone la inoculación artificial en el tallo, que podría no reflejar el proceso de infección natural de plantas de dipladenia por cepas de Psm. Poner a punto un ensayo de infección similar al que se produce de forma natural podría ser interesante para estudiar el papel de estos T3E en el proceso natural de infección de Psm.

El efector HopBL2 se localiza en el núcleo, plasmodesmos y microtúbulos

En este estudio se ha observado que el efector HopBL2 se localiza en *loci* subnucleares (Figuras 9-11), lo que coincide con lo previamente descrito para el ortólogo de HopBL2 (XopD) descrito en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (Hotson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013). HopBL2 y XopD comparten dos dominios funcionales, que son, el dominio de unión a DNA (en el extremo N-terminal) y el dominio SUMO proteasa (en el extremo C-terminal). Además, XopD tiene dos dominios EAR que están ausentes en HopBL2. Se ha descrito que el extremo N-terminal de XopD es necesario y suficiente para la importación de XopD al núcleo (Hotson *et al.*, 2003), por lo que es posible que el extremo N-terminal de HopBL2, donde se encuentra el dominio de unión a DNA, sea necesario para su localización en el núcleo. XopD colocaliza en *loci* subnucleares con el factor de transcripción de tomate SIERF4, catalizando su desumoilación y reprimiendo la transcripción mediada por etileno requerida para la inmunidad del huésped frente a Xcv (Kim *et al.*, 2013). Se ha descrito que mutantes de los dominios EAR de XopD siguen produciendo, aunque en menor medida, la desumoilación de SIERF4 (Kim *et al.*, 2013), por lo que la ausencia del dominio EAR en HopBL2 no significa que este efector tenga un papel diferente a XopD durante la infección de los huéspedes de *P. savastanoi*. En un estudio reciente se ha descrito que XopD activa el factor de transcripción nuclear bHLH132, requerido para un crecimiento y desarrollo normal de plantas de tomate y para la resistencia de las mismas frente a Xcv (Kim and Mudgett, 2019).

Además de la localización de HopBL2 en el núcleo, se observó un patrón punteado a lo largo de la membrana, no observado en los ensayos de localización de XopD en este compartimento, y que colocaliza parcialmente con plasmodesmos (Figura 10). Los plasmodesmos son canales revestidos de membrana que establecen una vía de comunicación simplástica entre células vecinas en plantas. Los plasmodesmos son dinámicos, y durante el proceso de infección, el disparo de la respuesta de defensa PTI produce su cierre. A pesar de esto, en hongos, se ha demostrado la translocación a través de los plasmodesmos del efector PWL2 de *Magnaporthe oryzae*, antes de la invasión de la hifa, y del efector See1 de *Ustilago maydis*, necesario para la formación del tumor (Cheval and Faulkner, 2018). Además, recientemente, se ha descrito que HopO1-1 de *P. syringae* pv. tomato DC3000 colocaliza con plasmodesmos y modula su función aumentando el flujo molecular dependiente de éstos, maximizando la propagación de la infección bacteriana (Aung *et al.*, 2019). Entonces, la colocalización de HopBL2 con plasmodesmos podría ser porque su proteína diana se encuentre asociada a los plasmodesmos, porque esté interfiriendo con el transporte intercelular mediado por plasmodesmos o porque está utilizando los plasmodesmos para movilizarse entre células vecinas. Un estudio en mayor profundidad de la interacción de HopBL2 con los plasmodesmos podría aclarar si HopBL2 modula su función en las células vegetales o solo los utiliza para desplazarse.

Durante la visualización de la localización de HopBL2, también se observó que algunos de los puntos fluorescentes externos al núcleo se encontraban en movimiento, siguiendo una trayectoria lineal de un lado a otro de la célula y colocalizando, algunos de ellos, con microtúbulos. Los microtúbulos de las células eucariotas juegan un papel en la defensa frente a patógenos, habiéndose descrito T3E que afectan al citoesqueleto de los microtúbulos, tanto en plantas como en animales (Hardham, 2013). En el complejo *P. syringae*, se han descrito dos T3E que interactúan con microtúbulos, HopZ1a y HopAE1. HopZ1a causa una gran reducción de la red de microtúbulos en *Arabidopsis thaliana*, mediante la acetilación de la β -tubulina, impidiendo su incorporación a los microtúbulos e

interfiriendo con la polimerización de éstos (Lee *et al.*, 2012; Rufián *et al.*, 2020). HopAE1 disocia MAP65 de los microtúbulos, un componente importante de éstos, inhibiendo la secreción de proteínas en la planta y la inmunidad asociada a la pared celular (Guo *et al.*, 2016). Nuestros resultados no son suficientes para afirmar que HopBL2 modifique de algún modo la red de microtúbulos, pero sugieren que este T3E podría moverse intracelularmente utilizando los microtúbulos, tal y como se ha descrito para ciertas proteínas víricas, como la proteína del movimiento del virus del mosaico del tabaco, virus asociado a plasmodesmos (Kragler *et al.*, 2003; Ouko *et al.*, 2010; Hardham, 2013).

En resumen, la localización nuclear de HopBL2 y sus dominios de unión al DNA y SUMO proteasa sugieren que este efector podría modular la transcripción de genes del huésped. Además, su colocalización con microtúbulos y plasmodesmos, nos indica que HopBL2 podría moverse intra e intercelularmente utilizando estos compartimentos dentro de la planta o que podría estar interfiriendo en el transporte intercelular.

3.2 Estudio del papel en el rango de huésped de los efectores AvrPto1, AvrRps4, HopF1 y HopZ5 de *P. savastanoi*

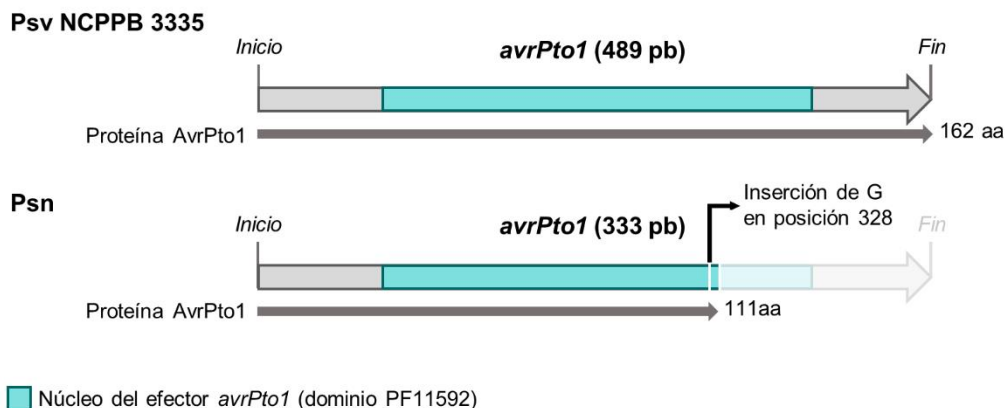
RESULTADOS

La expresión de AvrPto1 de Psv en Psn ESC23 reduce la virulencia en adelfa

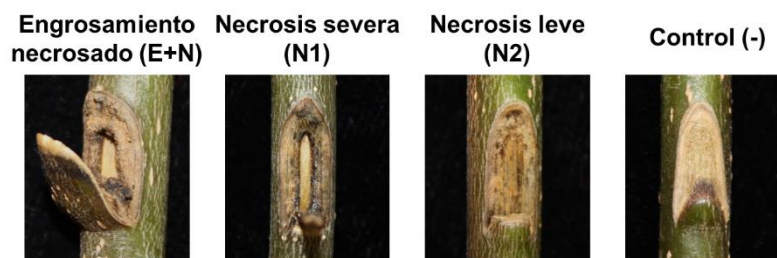
En las 4 cepas secuenciadas del patovar Psn, el efector *avrPto1* tiene una inserción de una guanina en la posición 328 que rompe la pauta de lectura y genera un codón de fin prematuro (Figura 12A). La proteína que se produce sería 51 aa más corta que la que presentan la cepa de referencia Psv NCPBB 3335 y el resto de las cepas de *P. savastanoi*.

Se ha descrito que las mutaciones puntuales que afectan a la región C-terminal de AvrPto eliminan la avirulencia en tabaco (Shan *et al.*, 2000), por lo que cabría pensar que este truncamiento específico en cepas de Psn podría estar evitando el reconocimiento de AvrPto1 por genes de resistencia en la planta de adelfa. Con el objetivo de determinar si la translocación de la versión completa de AvrPto1 en la planta tiene un efecto en la virulencia y en la supervivencia de cepas de Psn en adelfa, se ha complementado la cepa silvestre Psn ESC23 con el alelo completo de *avrPto1* de la cepa de Psv NCPBB 3335 (*avrPto1-Psv*) desde el plásmido de amplio espectro pCPP5040. Plantas de adelfa de un año se inocularon con la cepa silvestre Psn ESC23 y su cepa derivada pCPPB5040:*avrPto1-Psv*, y los síntomas se observaron a los 90 dpi (Figura 12B, C, D). En las plantas inoculadas con la cepa que contiene pCPP5040:*avrPto1-Psv* se observaron menos engrosamientos necróticos y necrosis severas que en las plantas infectadas con la cepa silvestre. Sin embargo, y aunque la población alcanzada por la cepa con el plásmido pCPP5040:*avrPto1-Psv* fue algo inferior a la de la cepa silvestre, las diferencias poblacionales entre ambas cepas no resultaron estadísticamente significativas.

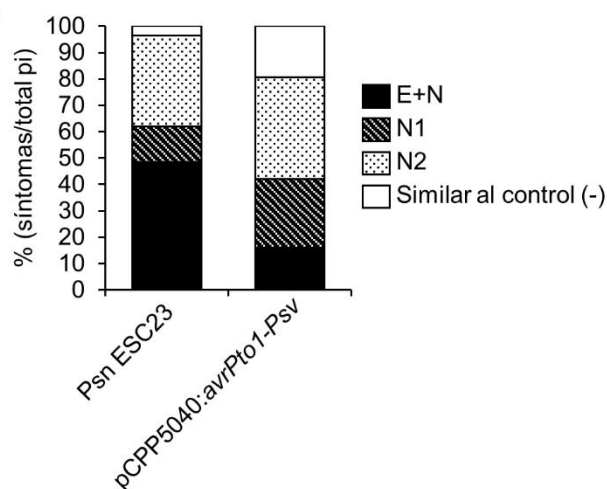
A



B



C



D

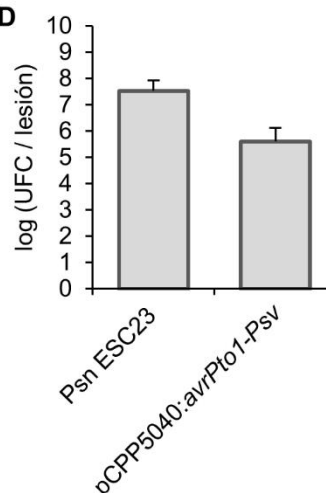


Figura 12. Ensayo de virulencia de la cepa *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) ESC23 y de su derivada expresando el efector AvrPto1 de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335. (A) Esquema de la secuencia del gen *avrPto1* en Psv NCPPB 3335 y del truncamiento de este gen en cepas de Psn. **(B)** Diversidad de los síntomas generados en adelfa a 90 días posinoculación (dpi) por la cepa silvestre y la cepa expresando el gen *avrPto1* de Psv NCPPB 3335 (pCPP5040:*avrPto1*-Psv). Control (-), plantas inoculadas con MgCl₂. **(C)** Porcentaje de puntos inoculados (pi). En total de infectaron 3 plantas por cepa, cada una de las cuales se inoculó en aproximadamente 10 pi diferentes (29-31 pi por cepa en total) a 90 dpi. **(D)** Densidades poblacionales alcanzadas por las cepas en adelfa a 90 dpi. Las barras representan la media de la población alcanzada, calculada de tres réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. No se encontraron diferencias significativas utilizando la prueba *Student's t*-test (Owen, 1965) ($P < 0,05$) para comparar dos muestras.

Papel de AvrRps4, HopZ5 y HopF1 en el rango de huésped de Psr

En *P. savastanoi*, los genes *avrRps4*, *hopZ5* y *hopF1* solo están presentes en los genomas de todas las cepas del patovar Psr analizadas en el capítulo I de esta Tesis Doctoral. Con el objetivo de estudiar si la presencia de estos tres T3E está asociada a su huésped de aislamiento, se analizó la distribución de estos tres T3E en las cepas del complejo *P. syringae*, ordenadas en base a la familia del huésped de aislamiento (Tabla 6). Para ello se compararon las secuencias de los T3E codificados por estos genes en más de 400 genomas del complejo *P. syringae* (Lo *et al.*, 2017; Dillon *et al.*, 2019a). La presencia de al menos uno de estos T3E se identificó en 185 cepas del complejo *P. syringae* patógenas de huéspedes pertenecientes a 24 familias distintas (Tabla 6). De estas 24 familias, la combinación de AvrRps4 y HopF1 se encontró en cepas que infectan las familias *Amaranthaceae* (*P. syringae* pv. *aptata* CIMP 11935), *Fagaceae* (*P. syringae* pv. *castaneae* ICMP 9419 e ICMP 9420), *Solanaceae* (*P. syringae* pv. *mellea* N6801) y, *Fabaceae* (seis cepas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* aisladas de lobia (judía jacinto), judía y kuzdu, y cuatro cepas de *P. syringae* pv. *pisi* aisladas de guisante) (Tabla 6). La combinación de AvrRps4 y HopZ5 solo se encontró en cepas que infectan la familia *Fabaceae* (seis cepas de *P. syringae* pv. *phaseolicola*), mientras que la combinación HopZ5 y HopF1 no se identificó. Las únicas cepas que contenían los tres T3E fueron las tres cepas de *P. savastanoi* pv. *retacarpa* aisladas de la retama, perteneciente a la familia *Fabaceae* (Tabla 6). Cepas aisladas del resto de las familias codifican uno o como máximo dos de estos T3E (Tabla 6). Estos resultados indican que la presencia y o combinación de estos T3E podría estar asociada a la interacción de cepas del complejo *P. syringae* con huéspedes pertenecientes a la familia *Fabaceae*.

Con el objetivo de profundizar en el papel en el rango de huésped de Psr de estos tres T3E, se construyó un plásmido que expresa estos 3 efectores desde el promotor constitutivo P_{nptIII} (p3T3E-Psr) (Tabla 3), y se transformó una cepa modelo de cada patovar de *P. savastanoi* (Psv NCPPB 3335, Psn ESC23, Psm Ph3 y Psf NCPPB 1006) con este plásmido. A continuación, estos transformantes se

incluyeron en dos abordajes experimentales dirigidos a analizar el papel conjunto de estos T3E papel en el rango de huésped de *P. savastanoi*.

Tabla 6. Distribución de AvrRps4, HopZ5 y HopF1 en el complejo *P. syringae*.

Familia ^a	Huésped	Patovar	FG ^b	Cepa ^c	AvrRps4	HopZ5	HopF1
<i>Actinidiaceae</i>	kiwi	actinidiae	1	PsaICMP18884 (18)	-	+	-
	kiwi	actinidiae	1	PsaICMP18883 (11)	-	-	+
<i>Adoxaceae</i>	viburnum	viburni	1	PviiCMP3963	+	-	-
<i>Amaranthaceae</i>	remolacha	aptata	2	PttICMP11935	+	-	+
<i>Amaryllidaceae</i>	puerro	porri	4	PpolCMP16803 (4)	+	-	-
<i>Apiaceae</i>	cilantro	coriandricola	5	PcdICMP12341(2)	-	-	+
	cilantro	cilantro	5	Pci0788_9	-	-	+
<i>Araliaceae</i>	kakuremino	dendropanacis	3	PdelCMP9150	-	-	+
<i>Asteraceae</i>	vara de oro	solidagae	2	PsolCMP16926 (3)	-	-	+
	girasol	helianthi	6	PhelCMP3549 (2)	-	-	+
	caléndula	tagetis	6	PtgICMP6369 (3)	-	-	+
<i>Berberidaceae</i>	bérbero	berberidis	1	PbbICMP4065 (2)	-	+	-
<i>Betulaceae</i>	avellano	avellanae	1	PavICMP9749 (2)	+	-	-
<i>Brassicaceae</i>	Coliflor	maculicola	1	PmaM6	-	-	+
<i>Cannabaceae</i>	urajiroenoki	tremae	4	PtriCMP9151	+	-	-
<i>Caricaceae</i>	papaya	caricapapayae	6	PcalCMP2855 (4)	-	-	+
<i>Cucurbitaceae</i>	cantalupo	syringae	2	PsyCC457	-	+	-
<i>Daphniphyllaceae</i>	himeyuzuriha	daphniphylli	3	PdalCMP9757	+	-	-
<i>Fabaceae</i>	kudzu	glycinea	3	PgylCMP4324	+	-	+
	soja	glycinea	3	PgylCMP4333 (2)	-	-	+
	soja	glycinea	3	PgylCMP10448 (6)	+	-	-
	soja	glycinea	3	PgylCMP9923	-	-	+
	judía	phaseolicola	3	Pph1448A (4)	+	-	-
	judía	phaseolicola	3	Psy0506 (20)	+	-	-
	lobia	phaseolicola	2	Pph1449B	+	-	+
	judía	phaseolicola	3	PphICMP2740 (3)	+	-	+
	kudzu	phaseolicola	3	PphK4 (2)	+	-	+
	judía	phaseolicola	3	Psy0508 (6)	+	+	-
	judía	phaseolicola	3	Psy0515	-	+	-
	judía	syringae	2	Psy0555	+	-	-
	guisante	pisi	2	Ppi1704B (3)	+	-	-
	guisante	pisi	2	PpiICMP4433 (4)	+	-	+
	retama	retacarpa	3	PsrCECT4861 (3)	+	+	+
<i>Fagaceae</i>	castaño japonés	castaneae	3	PcsiCMP9419 (2)	+	-	+
	castaño japonés	castaneae	3	PcsiCMP9421	+	-	-
<i>Meliaceae</i>	cinamono	meliae	3	PmeICMP6289	+	-	-
<i>Moraceae</i>	morera de japon	broussonetiae	3	PbriCMP13650 (3)	+	-	-
<i>Poaceae</i>	avena	coronafaciens	4	Pcn3113 (3)	+	-	-
	avena	striafaciens	4	PsfICMP4418	+	-	-
<i>Ranunculaceae</i>	delfinio	delphinii	1	PdplCMP13052 (4)	-	+	-
<i>Rosaceae</i>	nectarina	persicae	1	PpelCMP5786	+	-	-
	fotinia de hoja roja	photinia	3	PholCMP7840 (2)	-	-	+
	Almendro	amygdali	3	PamICMP3918	-	-	+
<i>Rubiaceae</i>	planta del café	garcae	4	PgclCMP4323 (2)	+	-	-
	planta del café	garcae	4	Psy0432 (34)	+	-	-
	planta del café	tabaci	3	Psy0479 (4)	+	-	-
<i>Solanaceae</i>	tabaco	mellea	3	PmeN6801	+	-	+
	tabaco	mellea	3	PmeICMP5711	-	-	+
	tabaco	tabaci	3	PtalCMP2835 (4)	-	-	+

Tabla 6. Continuación.

Familia ^a	Huésped	Patovar	FG ^b	Cepa ^c	AvrRps4	HopZ5	HopF1
<i>Theaceae</i>	árbol del té	theae	1	PthICMP3923 (3)	-	-	+

^aFamilia a la que pertenece el huésped.

^bFG, filogruppo

^cEntre paréntesis se indica el número de cepas identificadas con esas características.

En primer lugar, nos planteamos si la expresión heteróloga de estos T3E en cepas de Psv, Psn, Psm, y Psf, ninguna de las cuales infecta retama (Capítulo I, Figura 2 y 3), es suficiente para inducir síntomas en este huésped. Como control positivo, se incluyó en los ensayos a la cepa Psr CECT 4861, y como control negativo plantas inoculadas con MgCl₂ 10 mM. A los 90 dpi, la cepa Psr CECT 4861 produjo la sintomatología característica descrita previamente en retama (Álvarez *et al.*, 1998) y en el Capítulo I, alcanzando una población bacteriana de 10⁷-10⁸ UFC/lesión (Figura 13). Por el contrario, y en consonancia con nuestros resultados anteriores, las cepas silvestres de Psv, Psn, Psm y Psf fueron asintomáticas en el 90-100% de los pi, aunque en el 10% de los pi inoculados con la cepa Psv se produjo una pequeña necrosis alrededor de la zona inoculada. De las plantas inoculadas con las cepas que expresaban los tres T3E, solo las infectadas con Psv p3T3E-Psr mostraron un mayor número de pi con necrosis que las infectadas con cepa silvestre (51%), sin embargo, esta cepa no sobrevivió en las plantas de retama (Figura 13). En las plantas infectadas con las cepas complementadas de Psn, Psm y Psf no se observaron diferencias ni en la sintomatología inducida ni en las densidades poblacionales alcanzadas (10-10⁴ UFC/lesión) con respecto a sus cepas silvestres. Estos resultados indican que la expresión de estos tres T3E en la cepa de Psv disminuye su supervivencia en retama, aunque la expresión en cepas de Psv, Psn, Psm y Psf no es suficiente para infectar plantas de retama.

En segundo lugar, nos planteamos si la expresión de estos T3E en cepas pertenecientes al resto de patovares de *P. savastanoi* podría disminuir la virulencia de las cepas en sus respectivos huéspedes, quizás debido a su reconocimiento por los sistemas de defensa, restringiendo el rango de huésped

de Psr. Se llevaron a cabo inoculaciones de las cepas silvestres Psv NCPBB 3335, Psn ESC23, Psm Ph3 y Psf NCPBB 1006 y de sus cepas derivadas con el plásmido p3T3E-Psr en sus respectivos huéspedes (olivo, adelfa, dipladenia y fresno, respectivamente) (Figura 14). Como control del experimento se inoculó en cada uno de estos huéspedes la cepa Psr CECT 4861, y como control negativo se usaron plantas inoculadas con $MgCl_2$ 10 mM.

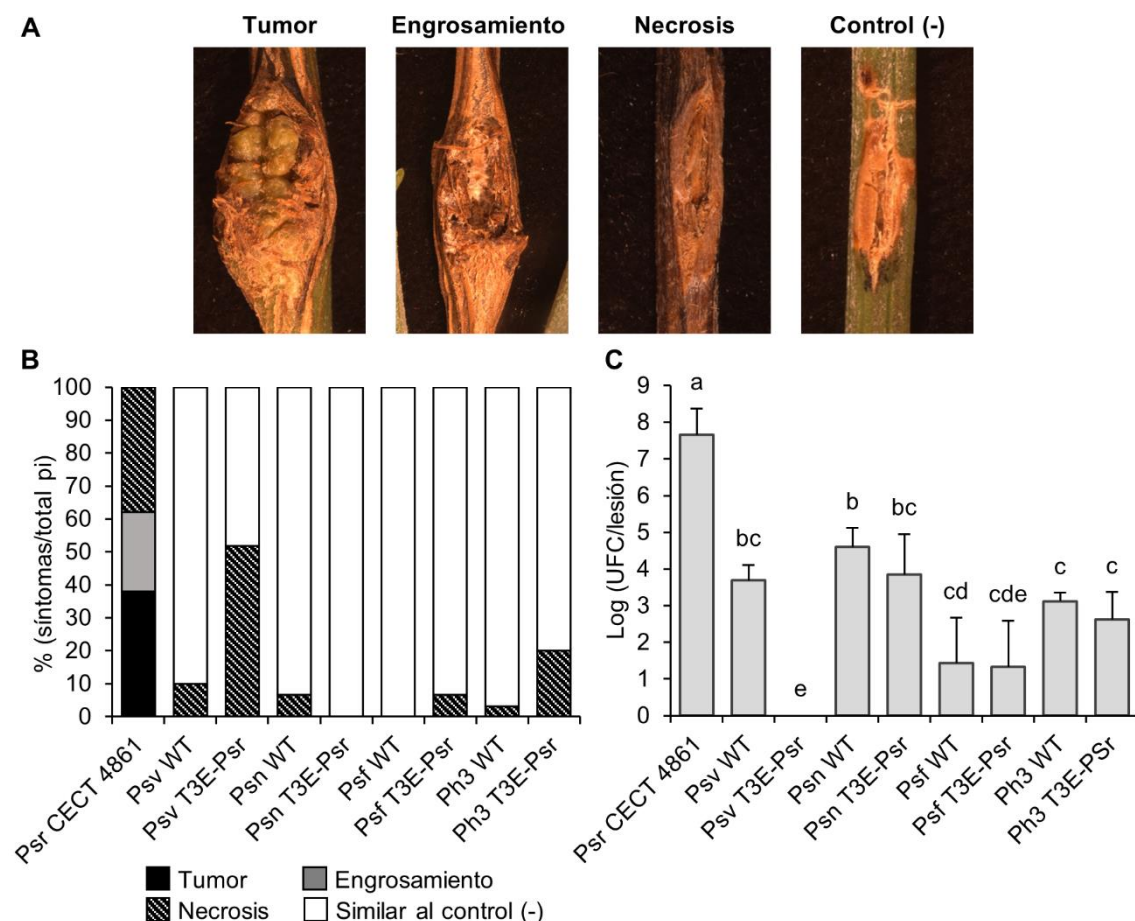


Figura 13. Ensayo de virulencia en retama de cepas de *P. savastanoi* que expresan los efectores codificados exclusivamente por cepas del patovar retacarpa AvrRps4, HopZ5 y HopF1. (A) Diversidad de los síntomas generados por las cepas de *P. savastanoi* en retama a 90 días postinoculación (dpi); Control (-), plantas inoculadas con $MgCl_2$. **(B)** Porcentaje de puntos inoculados (pi). En total se infectaron 3 plantas por cepa, cada una de las cuales se inoculó en aproximadamente 10 pi diferentes (26-32 por cepa en total). Se muestran los diferentes síntomas generados por cada cepa a 90 dpi **(C)** Densidades poblacionales alcanzadas por las cepas de *P. savastanoi* silvestres y sus cepas derivadas en plantas de retama a 90 dpi. Las barras representan la media de la población alcanzada de tres réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) utilizando el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) para las comparaciones múltiples. Psv, Psn, Psf, Psm y Psr corresponden con *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPBB 3335, *P. savastanoi* pv. *nerii* ESC23, *P. savastanoi* pv. *fraxini* NCPBB 1006, *P. savastanoi* pv. *mandevillae* Ph3 y *P. savastanoi* pv. *retacarpa* CECT4861, respectivamente. WT, cepas silvestres; T3E-Psr, cepas complementadas con los tres efectores AvrRps4, HopZ5 y HopF1 de Psr CECT4861.

En olivo, no se observaron diferencias en la sintomatología inducida por la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 (Psv WT) y la cepa Psv p3T3E-Psr a 90 dpi, y la cepa Psr CECT 4861 solo produjo leves engrosamientos en un 45% de los pi (Figura 14A, B). Sin embargo, y aunque la población bacteriana alcanzada por la cepa silvestre de Psv fue algo inferior (10^4 UFC/lesión) a las alcanzada en experimentos anteriores (Capítulo I, Figura 4), la cepa Psv p3T3E-Psr no sobrevivió en los tejidos de olivo (Figura 14C).

En adelfa, solo se observaron a 90 dpi síntomas en las plantas inoculadas con la cepa silvestre Psn ESC23 (Figura 14A, B), que alcanzó una población de aproximadamente 10^6 UFC/lesión (Figura 14C). Por el contrario, las cepas Psn ESC23 p3T3E-Psr y Psr CECT 4861 no produjeron síntomas y sus poblaciones fueron similares entre sí y dos órdenes de magnitud inferiores a los de Psn ESC23 (Figura 14). Estos resultados sugieren que estos efectores, o alguno de ellos, podrían ser reconocidos por el sistema de defensa de la adelfa, impidiendo que se produzca la infección.

En fresno, la cepa silvestre Psf NCPPB 1006 produjo a 90 dpi excrecencias en la mayoría de los pi, alcanzando 10^5 UFC/lesión (Figura 14). Sin embargo, Psf NCPPB 1006 p3T3E-Psr no indujo síntomas en fresno, donde alcanzó un nivel poblacional significativamente inferior (10 UFC/lesión) a las cepas silvestres Psf NCPPB 1006 y Psr CECT 4861 (Figura 14). Psr CECT 4861 indujo leves engrosamientos en el 69% de los pi, donde alcanzó aproximadamente 10^3 UFC/lesión (Figura 14). Estos resultados sugieren que estos tres T3E, o alguno de ellos, podrían ser reconocidos por el sistema de defensa del fresno, interfiriendo con el proceso de infección de Psf en su huésped.

Por último, en dipladenia, la cepa silvestre Psm Ph3 produjo a 90 dpi necrosis muy severas en la mayoría de los pi, en los que alcanzó 10^7 - 10^8 UFC/lesión (Figura 14). Sin embargo, la cepa de Psm Ph3 p3T3E-Psr produjo en la mayoría de los pi engrosamientos y alcanzó niveles poblacionales intermedios entre los de la cepa Psm Ph3 silvestre y Psr CECT 4861 (10^6 - 10^7 UFC/lesión) (Figura 14). Psr CECT 4861 no produjo síntomas en la mayoría de los pi y alcanzó el tamaño

poblacional más bajo (10^2 - 10^3 UFC/lesión) (Figura 14). Estos resultados sugieren que la expresión de estos tres T3E exclusivos de Psr disminuye la virulencia de la cepa Psm Ph3 en dipladenia y la supervivencia de esta cepa en su huésped de aislamiento.

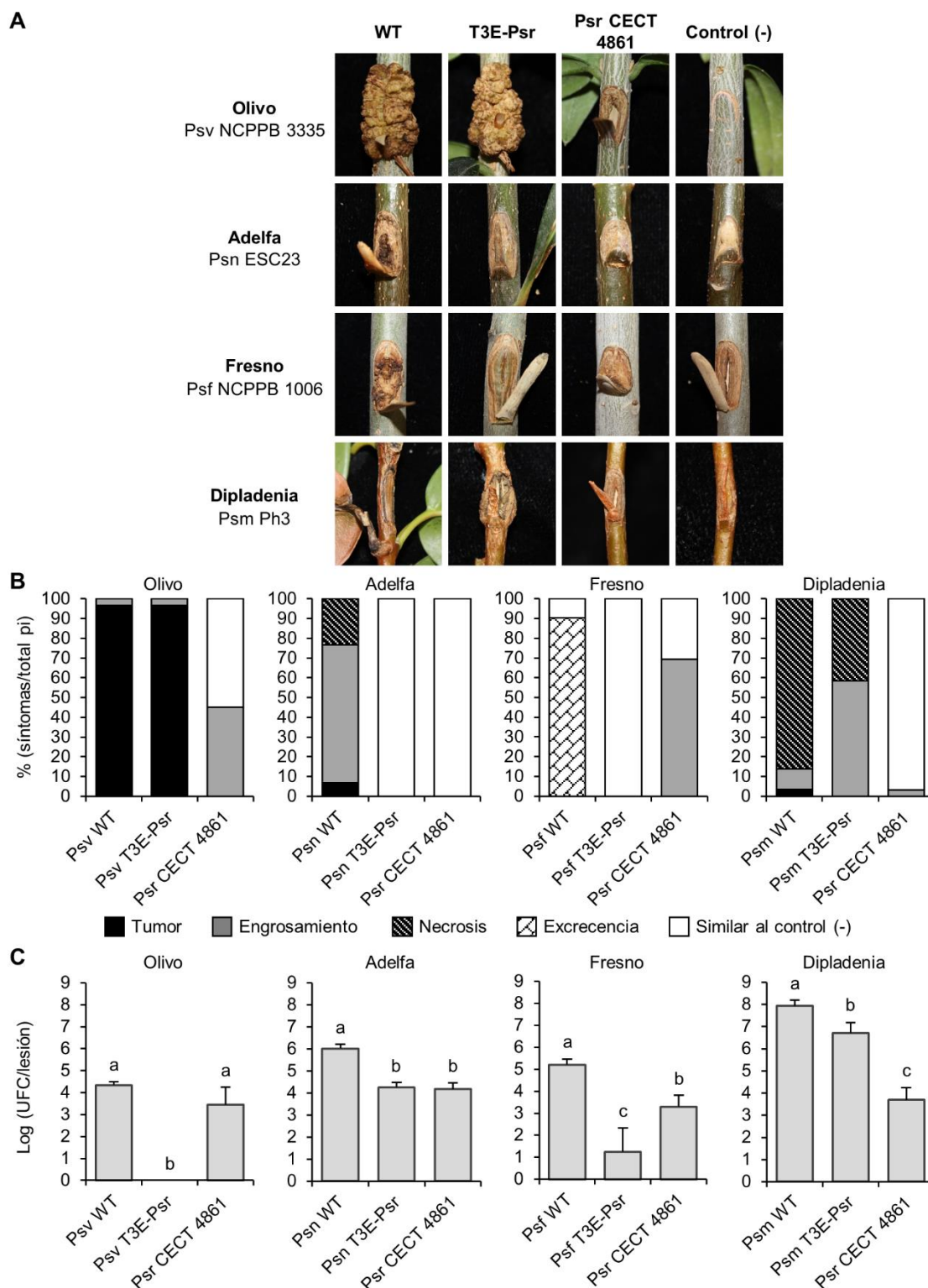


Figura 14. Ensayo de virulencia de cepas de *P. savastanoi* que expresan los efectores

exclusivos de las cepas del pv. retacarpa (AvrRps4, HopZ5 y HopF1) en sus respectivos huéspedes. (A) Síntomas generados a 90 días posinoculación (dpi) por las cepas de *P. savastanoi* en sus respectivos huéspedes. En todos los ensayos se incluyó la cepa de *P. savastanoi* pv. retacarpa (Psr) CECT 4861. Control (-), cepas inoculadas con MgCl₂. **(B)** Porcentaje de puntos inoculados (pi). En total de infectaron 3 plantas por cepa, cada una de las cuales se inoculó en aproximadamente 10 pi diferentes (26-34 pi por cepa en total). Se muestran los diferentes síntomas generados a 90 dpi por cada cepa en olivo, adelfa, fresno y dipladenia. **(C)** Densidades poblacionales alcanzadas por las cepas a 90dpi en cada huésped. Las barras representan la media de la población alcanzada de tres réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) utilizando el test estadístico ANOVA y el test de Bonferroni (Dunn, 1961) para las comparaciones múltiples. Psv, Psn, Psf y Psm corresponden con *P. savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335, *P. savastanoi* pv. nerii ESC23, *P. savastanoi* pv. fraxini NCPPB 1006, *P. savastanoi* pv. mandevillae Ph3, respectivamente. WT, cepas silvestres; T3E-Psr, cepas complementadas con los tres efectores AvrRps4, HopZ5 y HopF1.

DISCUSIÓN

La expresión de AvrPto1 de Psv en Psn ESC23 produce una reducción de su virulencia en adelfa

El efector AvrPto1 está truncado exclusivamente en las 4 cepas del patovar *nerii* analizadas en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral y en el aislado de *dipladenia* Ph3, únicas cepas de *P. savastanoi* capaces de desarrollar síntomas en plantas de adelfa. Estas cepas presentan una versión truncada de AvrPto1 en la que se genera una proteína de 111 aminoácidos que carece del extremo C-terminal. En un estudio llevado a cabo por Shan *et al.* (2000), se observó que mutaciones puntuales en la región C-terminal de este efector no inducían la producción de HR en plantas de tabaco, pero sí en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Esto sugiere que, al igual que en tabaco, la región C-terminal de AvrPto1 podría ser reconocida por la planta de adelfa, impidiéndose la infección por cepas que portan el alelo completo. Se ha descrito que AvrPto1 interacciona con los dominios quinasa de los receptores de reconocimiento de los PAMP del huésped FLS2 y EFR e inhiben la respuesta inmune PTI incluyendo las cascadas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Además, se une al receptor RLK (*receptor like-kinases*) BAK1 e impide la formación del complejo FLS2-BAK1, lo que impide también la respuesta inmune mediada por BAK1 frente a diversos PAMP y la señalización de brasinoesteroides (Büttner, 2016). Se ha demostrado que mutaciones puntuales en el extremo C-terminal de AvrPto (P146L y S147R) no afectaba a la supresión de la PTI ni a la unión a BAK1, por lo que el alelo truncado de Psn podría seguir siendo funcional (He *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2008).

En las plantas de adelfa inoculadas con la cepa Psn ESC23 que expresa *avrPto1* de Psv se observó una reducción en la virulencia con respecto a la cepa silvestre, aunque no se observó una reducción de la población bacteriana alcanzada al final del ensayo. Estos resultados sugieren que la región C-terminal de AvrPto1 podría ser reconocida por los sistemas de defensa de la adelfa, puesto que se produce una reducción en la virulencia, pero que este reconocimiento no es suficiente para

impedir la infección.

AvrRps4, HopZ5 y HopF1 tienen un papel en el rango de huésped de Psr

En el Capítulo I identificamos tres T3E exclusivos de cepas de Psr en *P. savastanoi*, AvrRps4, HopZ5 y HopF1. La distribución obtenida de estos T3E en el complejo *P. syringae* está asociada al huésped de aislamiento, aunque no hemos observado una diferenciación en base al filogrupo al que pertenecen las cepas analizadas (Tabla 6). Estos resultados sugieren que la adquisición de estos T3E se haya producido mediante transferencia horizontal, y que su diversificación dentro del complejo *P. syringae* esté asociada a la adaptación al huésped. La mayoría de las cepas que presentan estos T3E han sido aisladas de huéspedes pertenecientes a la familia *Fabaceae*, lo que sugiere que estos T3E podrían tener un papel relevante en la interacción con esta familia de plantas, y su presencia podría ser esencial para el desarrollo de la infección en las mismas. En consonancia con esta observación, el único huésped de *P. savastanoi* que pertenece a la familia *Fabaceae* es la retama, por lo que la adquisición de estos T3E en *P. savastanoi* podría haberse producido durante la adaptación de la especie a este huésped.

La expresión heteróloga de estos tres T3E simultáneamente en cepas de Psv, Psn, Psm y Psf no les confiere la capacidad de infectar retama ni aumenta su supervivencia en retama. Solo se observó un aumento destacable de la inducción de la necrosis inducida en retama por la cepa de Psv expresando los T3E (50% de los pi) con respecto a la cepa silvestre (10% de los pi). Este aumento, no fue uniforme en las 3 réplicas biológicas (datos no mostrados), dado que en dos de ellas se produjo una necrosis en el 10-20% de los pi, mientras que en la tercera planta todas las ramas aparecieron necrosadas. Sería, por tanto, necesario contar con un mayor número de réplicas biológicas de este ensayo. Que la expresión de estos 3 T3E en cepas de Psv, Psn, Psm y Psf no les haya proporcionado la capacidad de infectar retama no es algo sorprendente, dado que estas cepas codifican T3E que no se encuentran en cepas de Psr, como HopG1 y una versión completa del HopAF1-2, que podrían estar siendo reconocidos por genes de

resistencia en retama, impidiendo la infección. De hecho, se ha descrito que HopG1 podría actuar como un factor de avirulencia en cerezo, pues solo está presente en cepas no patogénicas y se encuentra siempre ausente o truncado en las cepas patogénicas (Hulin *et al.*, 2018). Este T3E, podría tener un papel similar en la infección de retama. La construcción en un futuro de mutantes de pérdida de función de *avrRps4*, *hopZ5* y *hopF1* en cepas de Psr es esencial para poder dilucidar el papel de estos T3E en la virulencia de Psr en retama.

La expresión heteróloga de los T3E *avrRps4*, *hopZ5* y *hopF1* en Psv, Psn, Psm y Psf afecta a la inducción de síntomas y/o supervivencia en sus respectivos huéspedes. La cepa Psv p3T3E-Psr no mostró diferencias en la sintomatología producida en olivo con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, no se obtuvieron recuentos viables de esta cepa en olivo al final del ensayo. Estos resultados sugieren que estos efectores están siendo reconocidos en estadios tardíos de la infección, permitiéndole a la bacteria permanecer el tiempo suficiente en la planta para inducir el desarrollo de un tumor. El seguimiento temporal del proceso de infección sería necesario para poder correlacionar la inducción de síntomas con la presencia de la bacteria en la planta. La cepa Ph3 p3T3E-Psr produjo una sintomatología diferente a la de la cepa silvestre en dipladenia. Ph3 p3T3E-Psr no produjo tumores, aunque produjo una mayor proporción de engrosamiento que de necrosis. Además, se observó una reducción significativa del tamaño poblacional al final del ensayo con respecto al de la cepa silvestre, aunque sin llegar a los niveles alcanzados por Psr CECT 4861. Esto sugiere que estos T3E podrían estar siendo reconocidos por los sistemas de defensa de dipladenia, disminuyendo el crecimiento bacteriano y alterando la sintomatología producida. Por último, las cepas de Psn y Psf que expresaban los efectores *avrRps4*, *hopZ5* y *hopF1* fueron asintomáticas en fresno y adelfa. Además, su supervivencia en planta se redujo significativamente con respecto a la cepa silvestre, alcanzando tamaños poblacionales similares a los alcanzados por la cepa Psr CECT 4861, o incluso menores en el caso de Psf. Esto implica que estos efectores, o alguno de ellos, podrían estar siendo reconocidos por proteínas de resistencia (R) en adelfa y fresno, impidiendo que el patógeno produzca la

infección. Se ha descrito que estos tres T3E contribuyen a la virulencia de cepas de *P. syringae* aunque también funcionan como factores de avirulencia, por ejemplo, AvrRps4 es reconocido por las proteínas R RRS1 y RPS4 de *Arabidopsis thaliana* disparando un HR en los ecotipos que las contienen (Hinsch and Staskawicz, 1996; Halane *et al.*, 2018). HopF1 juega un papel doble en las plantas de judía, por un lado, promueve el crecimiento bacteriano en los cultivares sensibles, mientras que, por el otro, desencadena una ETI en aquellos cultivares que tengan el gen de resistencia *R1* (Tsiamis *et al.*, 2000). Con respecto a HopZ5, se ha identificado en *Nicotiana benthamiana* que el gen *SGT1* podría estar implicado en la inducción de la HR, mientras que en *A. thaliana* la proteína SOBER1 actúa como un supresor de la inmunidad disparada por este T3E (Choi *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018). Por tanto, aunque estos T3E pueden funcionar como factores de virulencia en retama, podrían estar funcionando como factores de avirulencia en el resto de los huéspedes de *P. savastanoi*, determinando el estrecho rango de huésped que presentan las cepas de Psr.

ANEXO CAPÍTULO III

Tabla A1. Listado de cepas del complejo *P. syringae* que codifican ortólogos de HopAO1, HopAO2, HopBL1 y HopBL2.

Cepas	Patovar	Abr. ^a	FG ^b	Huésped	M ^c	Número de acceso ^d
HopAO1						
Pae 2113	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LIKY00000000
Pae 2250	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	ACXT00000000
Pae 2279	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LILH00000000
Pae 2306	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LILI00000000
Pae 2315	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LIHX00000000
Pae 2329	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LILK00000000
Pae 2336	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LILL00000000
Pae 0893-23	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	AEAD00000000
Pae ICMP 8947	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	LJPN00000000
Pae NCPPB 3681	aesculi	Pae	3	Castaño de indias	L	ACXS00000000
Pal ICMP 15200	alisalensis	Pal	5	Rábano	H	LJPP00000000
Pal ICMP 15201	alisalensis	Pal	5	Rábano	H	RBPH00000000
Pal ICMP 15203	alisalensis	Pal	5	Coliflor	H	RBPJ00000000
Pal ICMP 15205	alisalensis	Pal	5	Coliflor	H	RBPI00000000
Pal PSa1_3	alisalensis	Pal	5	na	na	2512564082
Pal BS91	alisalensis	Pal	5	na	na	2516653056
Par ICMP 4451	atropurpurea	Par	4	Brome	H	RBUX00000000
Pbb ICMP 4116	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	LJPU00000000
Pbb ICMP 4065	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	RBRC00000000
Pbb ICMP 13291	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	RBQP00000000
Pbb ICMP 8899	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	RBOD00000000
Pbr CFBP 5140	broussonetiae	Pbr	3	Morera de papel	LH	LIH00000000
Pbr ICMP 13684	broussonetiae	Pbr	3	Morera de papel	LH	RBTE00000000
Pbr ICMP 13685	broussonetiae	Pbr	3	Morera de papel	LH	RBSL00000000
Psf CFBP 5062	fraxini	Psf	3	Fresno	L	LIIC00000000
Psf NCPPB 1006	fraxini	Psf	3	Fresno	L	NIAW00000000
Psf ICMP 7712	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSC00000000
Psf ICMP 9129	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSA00000000
Psf ICMP 9132	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSB00000000
Pma YM7930	maculicola	Pma	5	Rábano	H	LGLD00000000
Pma 90_32	maculicola	Pma	1	Coliflor	H	LGLH00000000
Pmo MAFF301020	mori	Pmo	3	Morera	LH	AEAG00000000
Pmo ICMP 535	mori	Pmo	3	Morera	LH	RBRD00000000
Pmo ICMP 6941	mori	Pmo	3	Morera	LH	RBDT00000000
Pmp FTRS_U7	morsprunorum	Pmp	3	Albaricoque	L	LGLQ00000000
Por 1_6	orizae	Por	4	Arroz	H	RBOG00000000
Ppp CFBP 1754	papulans	Ppp	2	Manzano	LH	LIHW00000000
Ppp ICMP 4040	papulans	Ppp	2	Manzano	LH	RBPA00000000
Ppp ICMP 4048	papulans	Ppp	2	Manzano	LH	LJRB00000000
Ppp ICMP 4050	papulans	Ppp	2	Manzano	LH	RBUS00000000
Ppp ICMP 4986	papulans	Ppp	2	Manzano	LH	RBPE00000000
Ppe ICMP 3706	persicae	Ppe	3	Ciruelo mirobolano	L	RBQE00000000
Ppd ICMP 8903	philadelphi	Ppd	1	Celinda	LH	LJQY00000000
Ppd ICMP 8902	philadelphi	Ppd	5	Celinda	LH	RBQB00000000
Ppo ICMP 8961	porri	Ppo	4	Puerro	H	LJRA00000000
Ppo LMG 28495	porri	Ppo	4	Puerro	H	JTHM00000000
Ppo ICMP 16803	porri	Ppo	4	Puerro	H	RBVD00000000
Ppo ICMP 16805	porri	Ppo	4	Puerro	H	RBVE00000000
Ppo ICMP 8960	porri	Ppo	4	Puerro	H	RBUH00000000
Psv DAPP-PG722	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JOJV00000000
Psv ICMP 4352	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	LJRJ00000000
Psv NCPPB 3335	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	FR820586

Tabla 5. Continuación.

Ortólogos	Patovar	Abr. ^a	FG ^b	Huésped	M ^c	Número de acceso ^d
Psv 0485_9	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNY00000000
Psv ICMP 13519	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNW00000000
Psv ICMP 13786	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBTN00000000
Pto DC3000	tomato	Pto	1	Tomate	H	AE016853
Pto ICMP 2844	tomato	Pto	1	Tomate	H	LJRN00000000
Ptr ICMP 9151	tremae	Ptr	4	Urajiroenoki	L	LJRO00000000
Pum ICMP 3962	ulmi	Pum	3	Olmo	LH	LJRQ00000000
Pum ICMP 5931	ulmi	Pum	3	Olmo	LH	RBR000000000
Pzi ICMP 8921	zizaniae	Pzi	4	Arroz silveste	H	LJRT00000000
Pzi ICMP 8959	zizaniae	Pzi	4	Arroz silveste	H	RBPM00000000
Pzi ICMP 8941	zizaniae	Pzi	4	Arroz silveste	H	RBOZ00000000
HopAO2						
Psa MAFF302091	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AEAL00000000
Psa CFBP 7286	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AGNO00000000
Psa CH2010_6	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AGUH00000000
Psa CRAFRU8_43	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AFTG00000000
Psa ICMP 18708	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJC00000000
Psa ICMP 18744	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANGD00000000
Psa ICMP 18800	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJD00000000
Psa ICMP 18801	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOKQ00000000
Psa ICMP 18884	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	CM002751
Psa ICMP 18886	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOJT00000000
Psa ICMP 19068	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOJX01000000
Psa ICMP 19070	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOJY01000000
Psa ICMP 19079	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOKL01000000
Psa ICMP 19097	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOKN01000000
Psa ICMP 19101	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOKM01000000
Psa ICMP 19102	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOKA01000000
Psa ICMP 19103	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOJQ01000000
Psa ICMP 19104	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AOJZ01000000
Psa ICMP 19439	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJM00000000
Psa ICMP 19455	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJK00000000
Psa ICMP 9617	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	CM002753
Psa ICMP 9853	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJB00000000
Psa NCPPB 3739	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AFTH01000000
Psa NCPPB 3871	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AFTF00000000
Psa PA459	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	AGNQ00000000
Psa Shaanxi_M7	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJJ00000000
Psa TP1	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJG00000000
Psa TP6_1	actinidiae	Psa	1	kiwifruit	L	ANJH00000000
Pap 1089_5	apii	Pap	1	Apio	H	RBPL00000000
Pap ICMP 2814	apii	Pap	1	Apio	H	LJPR00000000
Pbb ICMP 4116	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	LJPU00000000
Pbb ICMP 4065	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	RBRC00000000
Pbb ICMP 8899	berberidis	Pbb	1	Bérbero	LH	RBOD00000000
Pca ICMP 2854	caricapapayae	Pca	6	Papaya	LH	RBVC00000000
Pca ICMP 2855	caricapapayae	Pca	6	Papaya	LH	LJPW00000000
Pca ICMP 4086	caricapapayae	Pca	6	Papaya	LH	RBOC00000000
Pce ICMP 17524	cerasicola	Pce	3	Cerezo	L	LJQA00000000
Pce ICMP 17525	cerasicola	Pce	3	Cerezo	L	RBTI00000000
Pce ICMP 13927	cerasicola	Pce	3	Cerezo	L	RBSV00000000
Pce ICMP 13928	cerasicola	Pce	3	Cerezo	L	RBSU00000000
Pcc ICMP 5710	ciccaronei	Pcc	3	Algarrobo	LH	LJPY00000000
Pci 0788_9	cilantro	Pci	5	Cilantro	H	LGLN00000000
Pcd ICMP 12471	coriandricola	Pcd	5	Cilantro	H	LJPZ00000000
Pcu ICMP 11894	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	LJQE00000000

Tabla 5. Continuación.

Ortólogos	Patovar	Abr. ^a	FG ^b	Huésped	M ^c	Número de acceso ^d
Pcu ICMP 11895	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	RBUE00000000
Pcu ICMP 11897	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	RBUN00000000
Pcu ICMP 11899	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	RBUM00000000
Psf CFBP 5062	fraxini	Psf	3	Fresno	L	LIIC00000000
Psf NCPPB 1006	fraxini	Psf	3	Fresno	L	NIAW00000000
Psf ICMP 7712	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSC00000000
Psf ICMP 9132	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSB00000000
Psf ICMP 9129	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSA00000000
Pfi ICMP 7848	ficuserectae	Pfi	3	Ficus	LH	LJQJ00000000
Pfi ICMP 7849	ficuserectae	Pfi	3	Ficus	LH	RBSO00000000
Pfi ICMP 7850	ficuserectae	Pfi	3	Ficus	LH	RBSN00000000
Pgc ICMP 3649	garcae	Pgc	4	Arbol del café	LH	RBSI00000000
Pgc ICMP 5019	garcae	Pgc	4	Arbol del café	LH	RBSH00000000
Pgc NCPPB 2708	garcae	Pgc	4	Arbol del café	LH	RBSK00000000
Pgy B076	glycinea	Pgy	3	Soja	H	AEGG00000000
Pgy BR1	glycinea	Pgy	3	Soja	H	LGLO00000000
Pgy ICMP 10450	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBOS00000000
Pgy ICMP 10451	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBOR00000000
Pgy ICMP 2189	glycinea	Pgy	3	Soja	H	LJQL00000000
Pgy ICMP 2400	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBRU00000000
Pgy ICMP 3482	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBRR00000000
Pgy ICMP 4180	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBQN00000000
Pgy ICMP 4181	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBQY00000000
Pgy ICMP 4182	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBQX00000000
Pgy ICMP 4402	glycinea	Pgy	3	kudzu	H	RBOL00000000
Pgy ICMP 4630	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBRN00000000
Pgy ICMP 4631	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBRM00000000
Pgy ICMP 5027	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBUC00000000
Pgy ICMP 5378	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBRF00000000
Pgy ICMP 5559	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBQW00000000
Pgy ICMP 5560	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBQV00000000
Pgy ICMP 5562	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBQU00000000
Pgy ICMP 7082	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBVH00000000
Pgy KN44	glycinea	Pgy	3	Soja	H	LGLP00000000
Pgy LN10	glycinea	Pgy	3	Soja	H	LGLM00000000
Pgy UnB647	glycinea	Pgy	3	Judía	H	LGLL00000000
Pgy ICMP 10448	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBOU00000000
Pgy ICMP 10449	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBOT00000000
Pgy ICMP 4966	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBUD00000000
Pgy ICMP 6372	glycinea	Pgy	3	Judía	H	RBPS00000000
Pgy ICMP 6373	glycinea	Pgy	3	Judía	H	RBPR00000000
Pgy ICMP 9026	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBTU00000000
Pgy R4	glycinea	Pgy	3	Soja	H	ADWY00000000
Pgy ICMP 4966(2)	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBUD00000000
Pgy ICMP 5928	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBOQ00000000
Pgy ICMP 867	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBPT00000000
Pgy ICMP 9025	glycinea	Pgy	3	Soja	H	RBTU00000000
Phe ICMP 4531	helianthi	Phe	6	Girasol	H	LJQM00000000
Phe ICMP 3263	helianthi	Phe	6	Girasol	H	RBUT00000000
Phe ICMP 3549	helianthi	Phe	6	Girasol	H	RBRP00000000
Phi ICMP 9314	hibisci	Phi	3	Hibisco Chino	LH	RBDP00000000
Phi ICMP 9623	hibisci	Phi	3	Hibisco Chino	LH	LJQN00000000

Tabla 5. Continuación.

Ortólogos	Patovar	Abr. ^a	FG ^b	Huésped	M ^c	Número de acceso ^d
Pma ES4326	maculicola	Pma	5	Rábano	H	AEAK00000000
Pma 4981	maculicola	Pma	1	Coliflor	H	RBOO00000000
Pma H7608	maculicola	Pma	1	Col	H	LGLG00000000
Pma ICMP 11281	maculicola	Pma	1	Berza	H	RBUQ00000000
Psm Ph3	mandevillae	Psm	3	Dipladenia	L	NIAX00000000
Pme ICMP 6289	meliae	Pme	3	Cinamomo	L	LJQT00000000
Pmo MAFF301020	mori	Pmo	3	Morera japonesa	LH	AEAG00000000
Pmo ICMP 4468	mori	Pmo	3	Morera blanca	LH	RBRW00000000
Pmo ICMP 535	mori	Pmo	3	Morera	LH	RBRD00000000
Pmo ICMP 6941	mori	Pmo	3	Morera blanca	LH	RBTD00000000
Psn CFBP 5067	nerii	Psn	3	Adelfa	L	LIHX00000000
Psn ESC23	nerii	Psn	3	Adelfa	L	NIAY00000000
Psn ICMP 16944	nerii	Psn	3	Adelfa	L	RBUB00000000
Psn ICMP 13781	nerii	Psn	3	Adelfa	L	RBTO00000000
Ppd ICMP 8903	philadelphi	Ppd	1	Celinda	LH	LJQY00000000
Psr CECT 4861	retacarpa	Psr	3	Retama	L	NBYW00000000
Psr ICMP 16946	retacarpa	Psr	3	Retama	L	RBQM00000000
Psr ICMP 16947	retacarpa	Psr	3	Retama	L	RBNM00000000
Pri ICMP 3883	ribicola	Pri	1	Grosella dorada	LH	RBNR00000000
Psv DAPP-PG722	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JOJV00000000
Psv ICMP 4352	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	LJRJ00000000
Psv NCPPB 3335	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	CP008742
Psv PseNe107	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JYHF00000000
Psv ICMP 1411	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBPf00000000
Psv ICMP 13786	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBTN00000000
Psv 0485_9	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNY00000000
Psy 0508	phaseolicola	Psy	3	Judía	H	QPAO00000000
Psy 0509	phaseolicola	Psy	3	Judía	H	QPAP00000000
Psy CC1513	syringae	Psy	4	Hutchinsia alpina	H	AVEL00000000
Psy 0464	garcae	Psy	4	Arbol del café	LH	QPDl00000000
Pto K40	tomato	Pto	1	Tomate	H	ADFY00000000
Pto Max13	tomato	Pto	1	Tomate	H	ADFZ00000000
HopBL1						
Pam CFBP 3205	amygdali	Pam		Almendro	L	JYHB00000000
Pcs ICMP 9419	castaneae	Pcs	3	Castaño japonés	L	LJQD00000000
Pcs ICMP 9420	castaneae	Pcs	3	Castaño japonés	L	RBSX00000000
Pcs ICMP 9421	castaneae	Pcs	3	Castaño japonés	L	RBSW00000000
Pde ICMP 9150	dendropanacis	Pde	3	Hiedra	L	LJQG00000000
Per ICMP 4455	eriobotryae	Per	3	Níspero japonés	L	LJQI00000000
Per ICMP 4316	eriobotryae	Per	3	Níspero japonés	L	RBPV00000000
Per ICMP 8636	eriobotryae	Per	3	Níspero japonés	L	RBOA00000000
Psf CFBP 5062	fraxini	Psf	3	Fresno	L	LIIC00000000
Psf NCPPB 1006	fraxini	Psf	3	Fresno	L	NIAW00000000
Psf ICMP 7712	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSC00000000
Psf ICMP 9129	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSA00000000
Psf ICMP 9132	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSB00000000
Pme ICMP 6289	meliae	Pme	3	Cinamomo	L	LJQT00000000
Pmy AZ84488	myricae	Pmy	3	Arrayán chino	L	LGLA00000000
Pmy ICMP 11123	myricae	Pmy	3	Arrayán chino	L	RBUP00000000
Pmy ICMP 11510	myricae	Pmy	3	Arrayán chino	L	RBUL00000000
Pmy ICMP 7118	myricae	Pmy	3	Arrayán chino	L	LJQV00000000
Pmy ICMP 7120	myricae	Pmy	3	Arrayán chino	L	RBTJ00000000
Pmp FTRS_U7	morsprunorum	Pmp	3	Albaricoque	L	LGLQ00000000
Psn CFBP 5067	nerii	Psn	3	Adelfa	L	LIHX00000000
Psn ESC23	nerii	Psn	3	Adelfa	L	NIAY00000000
Psn ICMP 16944	nerii	Psn	3	Adelfa	L	RBUB00000000
Psn ICMP 13781	nerii	Psn	3	Adelfa	L	RBTO00000000

Tabla 5. Continuación.

Ortólogos	Patovar	Abr. ^a	FG ^b	Huésped	M ^c	Número de acceso ^d
Prh ICMP 9756	rhapiolepidis	Prh	3	Espino yeddo	L	LJRE00000000
Psr CECT 4861	retacarpa	Psr	3	Retama	L	NBYW00000000
Psr ICMP 16946	retacarpa	Psr	3	Retama	L	RBQM00000000
Psr ICMP 16947	retacarpa	Psr	3	Retama	L	RBNM00000000
Psv DAPP-PG722	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JOJV00000000
Psv ICMP 4352	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	LJRJ00000000
Psv NCPPB 3335	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	CP008742
Psv PseNe107	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JYHF00000000
Psv ICMP 1411	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBPf00000000
Psv ICMP 13519	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNW00000000
Psv ICMP 13786	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBTN00000000
Psv 0485_9	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNY00000000
HopBL2						
Pcs ICMP 9419	castaneae	Pcs	3	Castaña japos	L	LJQD00000000
Pcs ICMP 9421	castaneae	Pcs	3	Castaña japos	L	RBSW00000000
Pcc ICMP 5710	ciccaronei	Pcc	3	Algarrobo	LH	LJPY00000000
Pcu ICMP 11894	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	LJQE00000000
Pcu ICMP 11895	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	RBUE00000000
Pcu ICMP 11897	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	RBUN00000000
Pcu ICMP 11899	cunninghamiae	Pcu	3	Abeto de la cochinchina	L	RBUM00000000
Per ICMP 4455	eriobotryae	Per	3	Níspero japonés	L	LJQI00000000
Per ICMP 4316	eriobotryae	Per	3	Níspero japonés	L	RBPV00000000
Per ICMP 8636	eriobotryae	Per	3	Níspero japonés	L	RBOA00000000
Psf CFBP 5062	fraxini	Psf	3	Fresno	L	LIIC00000000
Psf NCPPB 1006	fraxini	Psf	3	Fresno	L	NIAW00000000
Psf ICMP 7712	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSC00000000
Psf ICMP 9129	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSA00000000
Psf ICMP 9132	fraxini	Psf	3	Fresno	L	RBSB00000000
Pmo ICMP 4331	mori	Pmo	3	Morera	LH	LJQU00000000
Pmo ICMP 6941	mori	Pmo	3	Morera	LH	RBDT00000000
Pmo MAFF301020	mori	Pmo	3	Morera	LH	AEAG00000000
Pmp 2341	morsprunorum	Pmp	3	Guindo	L	LIIB00000000
Pmp HRI-W5269	morsprunorum	Pmp	3	Guindo	L	LIHZ00000000
Pmp ICMP 3897	morsprunorum	Pmp	3	Ciruela	L	RBQD00000000
Pmp ICMP 4983	morsprunorum	Pmp	3	Cerezo	L	RBTY00000000
Pmp ICMP 568	morsprunorum	Pmp	3	Cerezo	L	RBPP00000000
Psn CFBP 5067	nerii	Psn	3	Adelfa	L	LIHX00000000
Psn ESC23	nerii	Psn	3	Adelfa	L	NIAY00000000
Psn ICMP 16944	nerii	Psn	3	Adelfa	L	RBUB00000000
Psn ICMP 13781	nerii	Psn	3	Adelfa	L	RBTO00000000
Pho ICMP 7840	photinae	Pho	3	Photinia japonés	LH	LJQO00000000
Pho ICMP 7847	photinae	Pho	3	Photinia japonés	LH	RBSP00000000
Psr CECT 4861	retacarpa	Psr	3	Retama	L	NBYW00000000
Psr ICMP 16946	retacarpa	Psr	3	Retama	L	RBQM00000000
Psr ICMP 16947	retacarpa	Psr	3	Retama	L	RBNM00000000
Psv DAPP-PG722	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JOJV00000000
Psv ICMP 4352	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	LJRJ00000000
Psv NCPPB 3335	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	CP008742
Psv PseNe107	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	JYHF00000000
Psv ICMP 1411	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBPf00000000
Psv ICMP 13519	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNW00000000
Psv ICMP 13786	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBTN00000000
Psv 0485_9	savastanoi	Psv	3	Olivo	L	RBNY00000000

Tabla 5. Continuación.

Ortólogos	Patovar	Abr. ^a	FG ^b	Huésped	M ^c	Número de acceso ^d
Pum ICMP 3962	ulmi	Pum	3	Olmo	LH	LJRQ00000000
Pum ICMP 5931	ulmi	Pum	3	Olmo	LH	RBR000000000

^aAbr., Abreviatura

^bFG, filogrupo

^cM, Muestra: L, órgano leñoso (tronco, tallo y/o ramas) de huésped leñoso; H, huésped herbáceo; LH, órgano herbáceo (hoja) de huésped leñoso.

^dNúmero de acceso en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de los genomas de las cepas de *P. syringae* en las que se han encontrado los ortólogos de estos T3E.

Discusión General



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En las últimas tres décadas, los efectores (T3E) del sistema de secreción tipo III (T3SS) han sido reconocidos como los factores principales y más versátiles que median las interacciones bacteria-patógeno (Hueck, 1998; Baltrus *et al.*, 2011; Büttner, 2012; Dillon *et al.*, 2019a). Los T3E se translocan a través del T3SS directamente desde el citoplasma bacteriano al citoplasma de la célula eucariota, donde realizan gran variedad de funciones que generalmente suprimen la inmunidad del huésped y permiten tanto a patógenos como a simbioses la colonización interna de plantas, animales y protistas (Staehelin and Krishnan, 2015; Büttner, 2016; Macho, 2016; Toruño *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2018; Bastedo *et al.*, 2019).

En las bacterias fitopatógenas, los T3E están involucrados tanto en el desarrollo de la enfermedad en huéspedes sensibles como en el desencadenamiento de la denominada respuesta de hipersensibilidad (HR) en huéspedes resistentes, definiéndose estos dos tipos de interacción como compatible e incompatible, respectivamente (Jones and Dangl, 2006). La adquisición del T3SS canónico (T-PAI) en un ancestro del complejo *Pseudomonas syringae* se reconoce como un paso crucial en la adaptación de estos patógenos a sus respectivos huéspedes, y la posterior expansión de los T3E se considera como el impulso principal de la posterior diversificación y especialización del huésped (Xin *et al.*, 2018). De hecho, los T3E han sido reconocidos como los determinantes principales de la especificidad de huésped en el complejo *P. syringae*, tanto a nivel de especie-patógeno como de raza-cultivar (Fouts *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2019a). Un ejemplo de ello, son las interacciones de las nueve razas descritas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* con ocho cultivares diferentes de judía (*Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*), en las que se ven implicados cinco genes de resistencia (R) del huésped y cinco genes del patógeno codificantes de T3E (Jenner *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1996; Mansfield *et al.*, 1997; Tsiamis *et al.*, 2000). Aunque durante los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento del papel de los T3E durante las interacciones huésped-patógeno (Büttner, 2016; Macho, 2016; Khan *et al.*, 2018), la información disponible sobre T3E asociados a huéspedes leñosos es aún escasa.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un estudio de la implicación del T3SS y de su repertorio de T3E en el rango de huésped de las cepas de los patovares (pv.) de *Pseudomonas savastanoi* aislados de huéspedes leñosos: pv. *savastanoi* (Psv), aisladas de olivo, pv. *nerii* (Psn), aisladas de adelfa, pv. *mandevillae* (Psm), aisladas de dipladenia, pv. *fraxini* (Psf), aisladas de fresno, y pv. *retacarpa* (Psr), aisladas de retama.

Inicialmente se realizaron análisis genómicos dirigidos a la identificación de genes asociados al T3SS implicados en el rango de huésped. A diferencia de otros estudios previamente publicados (Baltrus *et al.*, 2011; Nowell *et al.*, 2016; Baltrus *et al.*, 2017; Hulin *et al.*, 2018; Dillon *et al.*, 2019b), en esta Tesis los resultados obtenidos de los análisis genómicos se combinaron con pruebas de patogenicidad cruzada. Esta combinación resultó fundamental para la reclasificación de las cepas 0485_9 e ICMP 13786 dentro del patovar Psv y la posterior identificación de genes exclusivos de patovar. Por tanto, en esta Tesis Doctoral se demuestra que la combinación de los análisis bioinformáticos con pruebas de patogenicidad cruzada resulta fundamental para garantizar una correcta asignación de las cepas a sus patovares y fortalecer la relevancia de los resultados comparativos obtenidos.

En los resultados de esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la secuencia del clúster *hrp/hrc* que codifica los genes estructurales y reguladores del T3SS T-PAI está muy conservada en las 21 cepas secuenciadas de los cinco patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos. Además, se observó que mutantes del gen *hrpL*, regulador principal del T3SS, de una cepa modelo de cada patovar perdían la capacidad de inducir síntomas en sus respectivos huéspedes y de inducir HR en plantas de tabaco y tomate. Estos resultados coinciden con lo previamente descrito para cepas de Psv y Psn (Sisto *et al.*, 2004; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014; Cerboneschi *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017a) y demuestra por primera vez que un T3SS activo y funcional es esencial también para la patogénesis de las cepas de Psm, Psf y Psr. Dada la importancia del T3SS en estas cepas, analizar el contenido de T3E resulta esencial

para poder identificar factores implicados en el rango de huésped.

En esta Tesis doctoral se realizó la identificación del repertorio de T3E de las cepas secuenciadas de *P. savastanoi* en base a la homología con otros T3E previamente descritos. En este análisis se identificó el *core* de T3E de *P. savastanoi*, el cual está constituido por 21 T3E previamente conocidos y un nuevo posible T3E identificado en base a la presencia de una caja *hrp* presente en la región promotora de los genes regulados por el factor de transcripción HrpL. En estos 22 T3E, están presentes los únicos tres T3E del *core* de las cepas de los FG primarios del complejo *P. syringae*, que son AvrE1, HopAA1 y HopAJ2, así como, el T3E ampliamente distribuido HopM1. De estos T3E, cabe destacar la función de AvrE1 y HopM1, que aunque se ha descrito que suprimen la respuesta inmune PTI (*pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity*), su función primaria en la virulencia es el establecimiento de un apoplasto acuoso, proceso denominado *water soaking* y recientemente reconocido como uno de los principales mecanismos de virulencia de *P. syringae* junto con la inhibición del sistema inmune del huésped (Xin *et al.*, 2018). La presencia de estos T3E en todas las cepas analizadas de *P. savastanoi* sugiere que este proceso también puede ser importante en el proceso de infección de plantas leñosas. En *P. savastanoi* este proceso podría realizarse principalmente por AvrE1, puesto que la versión presente de HopM1 en estas cepas está truncada. Además de HopM1, dentro del *core* de *P. savastanoi* hay otros cuatro T3E (HopA2, HopAA1, HopAZ1 y HopW1) cuya secuencia está truncada en todas las cepas de *P. savastanoi*. Que estos T3E estén truncados en todas las cepas de *P. savastanoi* sugiere que es posible que en el proceso de adaptación a los huéspedes de *P. savastanoi* se hayan seleccionado las versiones truncadas para evitar que la bacteria sea reconocida por el sistema de defensa de sus huéspedes. Es conocido que durante el proceso de adaptación al huésped los T3E evolucionan evitando el reconocimiento al mismo tiempo que mantienen su papel en la virulencia (Dillon *et al.*, 2019b). De hecho, se ha demostrado que las versiones truncadas de HopAA1 y HopAZ1 de *P. savastanoi* se translocan a través del T3SS e inhiben la respuesta inmune PTI (Matas *et al.*, 2014). Dado que los cinco huéspedes de *P. savastanoi* de los patovares aquí

analizados pertenecen a familias de plantas leñosas diferentes, sería interesante analizar si estos cuatro T3E también están truncados en cepas aisladas de huéspedes leñosos del complejo *P. syringae*. Hasta la fecha se han identificado una serie de T3E cuya presencia/ausencia podría estar asociada con huéspedes leñosos (Nowell *et al.*, 2016), pero no se han tenido en cuenta los truncamientos, por lo que un futuro estudio poniendo especial atención en los truncamientos nos podría permitir identificar nuevos T3E asociados con plantas leñosas.

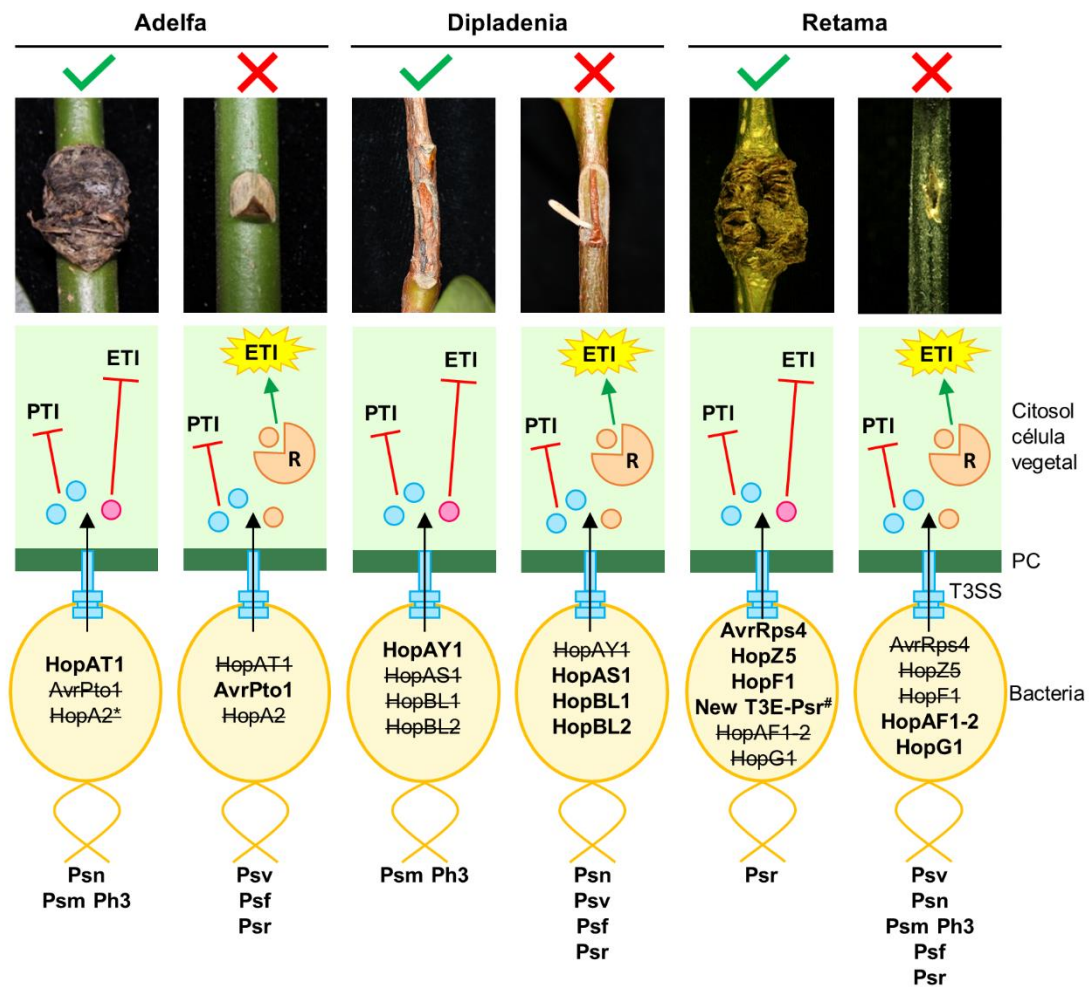


Figura 1. T3E identificados bioinformáticamente con un posible papel en la interacción de *P. savastanoi* con adelfa, dipladenia y retama. Los T3E en negrita representan los alelos completos, los tachados representan ausencia o truncamiento. *, versión truncada específica de las cepas de Psn. #, corresponde con WP_057446723, nuevo posible T3E exclusivo de Psr identificado bioinformáticamente. ✓, indica que la combinación de T3E marcados en negrita podrían ser necesaria para el desarrollo de la enfermedad en ese huésped, y X, indica que esa combinación de T3E podrían ser reconocidos por el sistema de defensa del huésped (proteínas R) impidiendo que se desarrolle la enfermedad. PTI, respuesta temprana mediada por el reconocimiento de patrones moleculares de los patógenos; ETI, respuesta mediada por el reconocimiento de T3E específicos; R, proteína de resistencia; PC, pared celular; T3SS, sistema de secreción tipo III. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *P. savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente.

En esta Tesis Doctoral se ha observado que la agrupación jerárquica de las cepas de *P. savastanoi* en base al contenido de T3E es similar a la filogenia generada mediante MLSA (*Multilocus sequence analysis*), indicando que cada uno de los cinco patovares codifican conjuntos característicos de T3E que podrían contribuir a definir su especificidad de huésped. La comparativa del conjunto de T3E ha permitido identificar T3E que, por su presencia, truncamiento o ausencia exclusiva en Psn, Psm y Psr, podrían contribuir a la interacción de *P. savastanoi* con adelfa, dipladenia y retama, respectivamente (Figura 1). Que no se hayan encontrado T3E específicos asociados a la interacción con olivo y fresno no es sorprendente, ya que en estos huéspedes las cepas de los patovares Psv, Psn, Psm y Psf pueden producir síntomas, e incluso la cepa Psr CECT 4861 es capaz de producir en algunos puntos leves engrosamientos. Por el contrario, en adelfa solo producen síntomas Psn y Psm, en dipladenia Psm y alguna cepa de Psn, y en retacarpa solo Psr, lo que indica que en estas cepas se ha producido una adaptación al huésped posterior, mediante la adquisición o pérdida de T3E, entre otros factores, que les han permitido evadir los sistemas de defensa de estos huéspedes y desarrollar la enfermedad.

De los T3E exclusivos de patovar identificados en el análisis genómico se ha realizado un estudio en mayor profundidad de HopBL1 y HopBL2, T3E asociados a huéspedes leñosos que están truncados en las cepas de Psm codificando proteínas no funcionales, AvrPto1, T3E truncado exclusivamente en las cepas que infectan adelfa, y los tres T3E exclusivos de las cepas de Psr, AvrRps4, HopF1 y HopZ5. Los resultados de los ensayos experimentales se muestran en las Figuras 2 y 3. En el análisis de la secuencia de estos T3E se observó que en el proceso de adaptación de las cepas de los distintos patovares de *P. savastanoi* a sus respectivos huéspedes no solo se había producido la pérdida o ganancia completa de T3E, sino que también la modificación de la secuencia mediante delección o inserción de bases y la inactivación por elementos de inserción. La frecuente asociación de T3E con elementos genéticos móviles permitió reconocer que la transferencia horizontal juega un papel muy importante en la diseminación de los T3E entre las cepas, pero recientemente, se

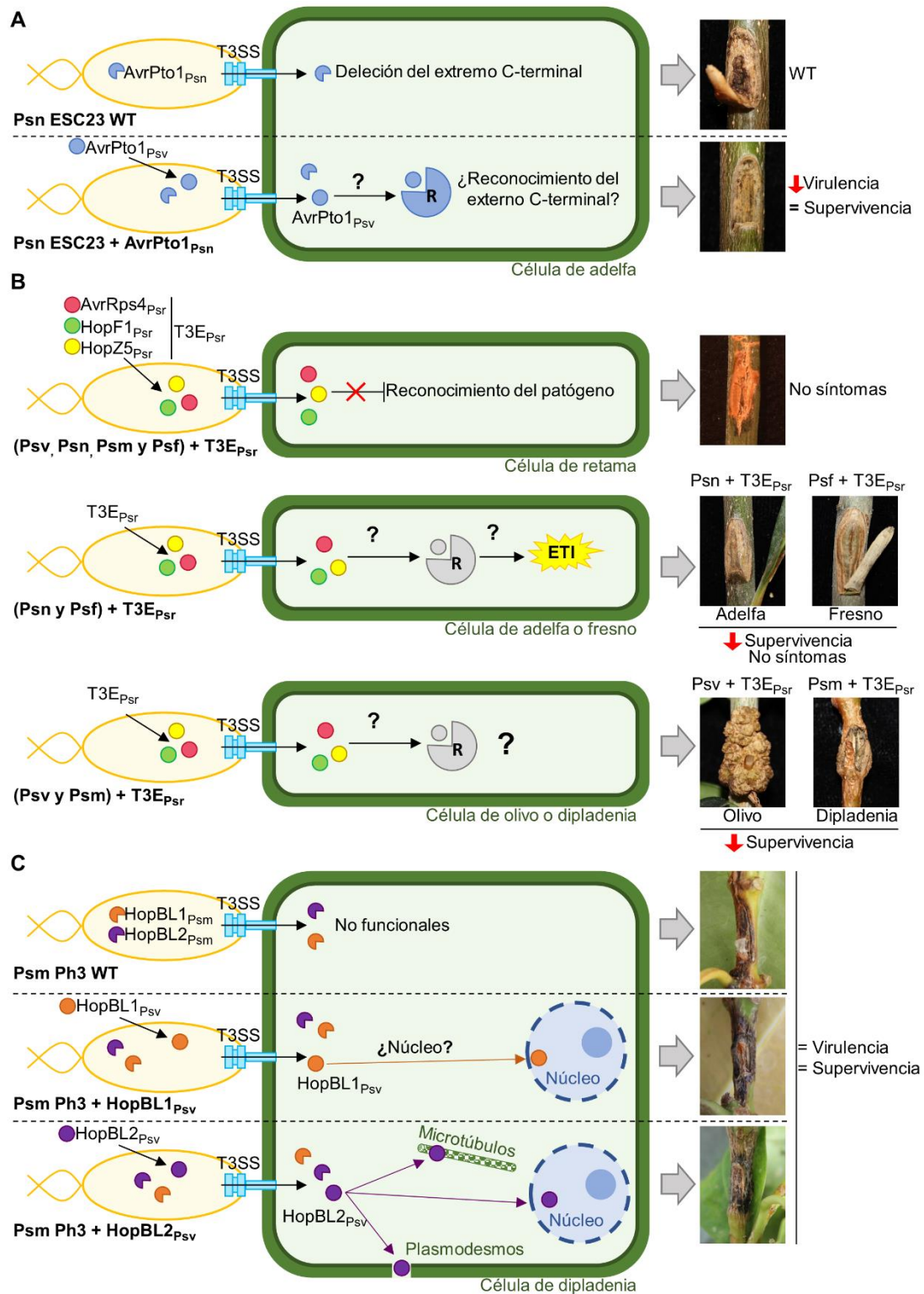


Figura 2. Expresión heteróloga de T3E en cepas de *P. savastanoi*. (A) Complementación de la cepa Psn ESC23 con la versión completa de AvrPto1 de Psv. (B) Complementación de una cepa modelo de Psv, Psn, Psm y Psf con los tres T3E exclusivos de Psr, AvrRps4, HopF1 y HopZ5 (T3E_{Psr}). La cruz roja indica que no se está produciendo el bloqueo del reconocimiento del patógeno. (C) Complementación de la cepa Psm Ph3 con las versiones completas de HopBL1 y HopBL2 de Psv. R, proteína de resistencia; ETI, respuesta mediada por el reconocimiento de T3E específicos. Las flechas rojas hacia abajo indican que se está

produciendo una disminución. Psv, Psn, Psm, Psf y Psr, *Pseudomonas savastanoi* patovares savastanoi, nerii, mandevillae, fraxini y retacarpa, respectivamente.

ha sugerido que el proceso de adaptación al huésped también puede jugar un papel importante en la evolución de los T3E a través de mutaciones que modifican la función de los mismos (Dillon *et al.*, 2019a). Esto último es lo que ocurre en el efector AvrRpt1 de Psn, en los que la inserción de una guanina en la secuencia produce que la proteína codificada pierda el extremo C-terminal que podría ser reconocido por la planta de adelfa y disminuir su virulencia (Figura 2A). Por otro lado, en Psr parece que la adquisición de AvrRps4, HopF1 y HopZ5 se ha producido por transferencia horizontal en el proceso de adaptación a la retama y que como consecuencia ha perdido la capacidad de producir síntomas en adelfa y fresno y ha disminuido su supervivencia en el resto de los huéspedes de *P. savastanoi* (Figura 2B). Con respecto a HopBL1 y HopBL2, no se ha podido demostrar que las versiones completas de HopBL1 y HopBL2 tengan un efecto negativo en la virulencia de las cepas de Psm en dipladenia, a pesar de estar truncados en todas las cepas de Psm analizadas (Figura 2C). Por el contrario, se ha demostrado que tienen un papel en la virulencia de las cepas de Psn en olivo y adelfa, y que el dominio C-terminal SUMO proteasa de HopBL2, podría estar implicado en la represión/activación de la transcripción de genes del huésped, tal y como se ha descrito para el homólogo XopD de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, ya que ambos se localizan en *locis* subnucleares (Hotson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013; Kim and Mudgett, 2019) (Figura 3).

Además del análisis del repertorio de T3E, en esta Tesis doctoral, se ha caracterizado por primera vez el regulón HrpL de una cepa aislada de huéspedes leñosos, en concreto de Psv NCPPB 3335, cepa modelo del grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral. Este análisis se ha realizado mediante dos abordajes distintos, un análisis comparativo *RNAseq* y una predicción bioinformática en base a la presencia de una caja *hrp* presente en la región promotora de los genes regulados por el factor de transcripción HrpL. La caracterización del regulón HrpL ha permitido la identificación, entre otros genes, de tres nuevos posibles T3E, dos proteínas hipotéticas y un homólogo del

T3E XopAD de *Xanthomonas* (Moreira *et al.*, 2010), así como, un nuevo posible factor de virulencia de *P. savastanoi*, la toxina fevamina A. La fevamina A, contribuye a la virulencia de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en *Arabidopsis*, suprimiendo la respuesta inmune inducida por flagelina, y tiene un papel en la virulencia de *Erwinia amylovora* en los brotes de manzano (Oh *et al.*, 2005; O'Neill *et al.*, 2018), por lo que podría tener un papel importante en la virulencia de las cepas de *P. savastanoi*. Además, los resultados obtenidos del regulón HrpL se han comparado con los resultados previamente publicados en cepas aisladas de huéspedes herbáceos (Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014; Castillo-Lizardo *et al.*, 2015), lo que nos permitirá en un futuro realizar una selección de aquellos genes que forman parte del regulón HrpL de Psv NCPPB 3335 y que pudieran estar asociados con la interacción de huéspedes leñosos.

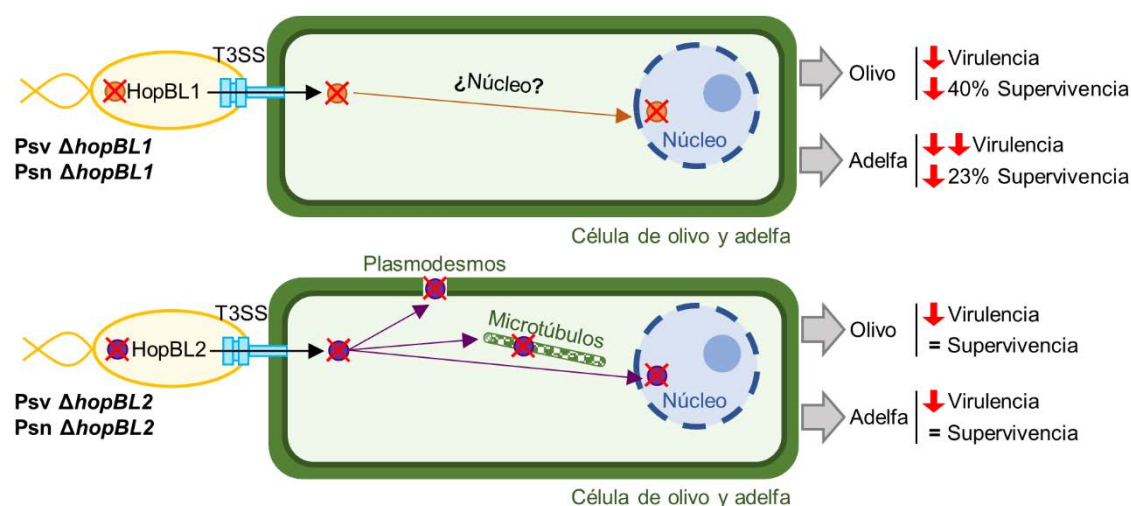


Figura 3. Papel de HopBL1 y HopBL2 en la virulencia de Psv y Psn en olivo y adelfa. Se han construido mutantes de pérdida de función de HopBL1 y HopBL2 en Psv NCPPB 3335, Psn CFBP 5067 y Psn ESC23. La cruz roja indica que el T3E está mutado y, por tanto, ausente. Las flechas rojas hacia abajo indican que se está produciendo una disminución de la virulencia o la supervivencia. Psv y Psn, *Pseudomonas savastanoi* patovares savastanoi y nerii, respectivamente.

En resumen, en esta Tesis Doctoral se ha realizado una combinación de análisis genómicos, transcriptómicos y experimentales que ha sido fundamental para la identificación de T3E implicados en la especificidad de huésped de *P. savastanoi*, así como la identificación de nuevos factores de virulencia. La suma de los resultados obtenidos ha permitido demostrar que el T3SS es esencial para la patogénesis de todos los patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes

leñosos y que el repertorio de T3E que presentan estas cepas se ha diversificado en el proceso de adaptación al huésped siendo elementos determinantes en la definición de su rango de huésped.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. La filogenia de *Pseudomonas savastanoi*, el contenido de efectores (T3E) del sistema de secreción tipo III (T3SS) y la capacidad de las cepas aisladas de adelfa 0485_9 e ICMP 13786 de causar tumores en olivo pero no en adelfa, apoyan su inclusión en el patovar *savastanoi* (Psv) de esta especie.
2. Los 21 genomas de cepas de *P. savastanoi* disponibles actualmente codifican un T3SS canónico (T-PAI), un T3SS rhizobial (R-PAI) y genes de los sistemas de secreción tipo IVA, tipo IVB, tipo IVC y tipo VI.
3. Los cinco patovares de *P. savastanoi* de plantas leñosas codifican conjuntos característicos de T3E, incluidos truncamientos específicos de los mismos, que agrupan jerárquicamente a las cepas de esta especie de forma similar que su filogenia basada en la secuencia de genes esenciales.
4. Las cepas de *P. savastanoi* codifican un total de 43 T3E diferentes, 21 de los cuales son compartidos por todas las cepas, al igual que un posible nuevo efector identificado en este trabajo; las cepas de *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (Psr) codifican tres T3E exclusivos (AvrRps4, HopZ5 y HopF1) y un posible nuevo efector.
5. El regulador HrpL es esencial para la patogenicidad y la inducción de la respuesta hipersensible en cepas de los patovares de *P. savastanoi* *nerii* (Psn), *mandevillae* (Psm), *fraxini* (Psf) y *Psr*.
6. El regulón HrpL de Psv NCPPB 3335 está compuesto por al menos 53 genes, entre los que se encuentran los codificadores de dos posibles nuevos T3E y el primer gen del operón de la síntesis de la fitotoxina fevamina A, además, se han identificado bioinformáticamente otros 26 genes que podrían formar parte de este regulón.
7. La distribución de los T3E HopAO1, HopBL1 y HopBL2 en cepas del complejo *P. syringae* apoya su asociación con huéspedes leñosos.
8. El papel de los T3E HopBL1 y HopBL2 en la virulencia de *P. savastanoi* es dependiente de cepa y huésped, destacándose el papel de HopBL1 en la virulencia y supervivencia de Psn ESC23 en olivo y adelfa, y el de HopBL2 en la virulencia de las cepas de Psn ESC23 y CFBP 5067 en olivo.

9. El efector HopBL2 se localiza en *loci* subnucleares y colocaliza con la membrana, con plasmodesmos y con microtúbulos en células de *Nicotiana bethamiana*.
10. Psn ESC23 codifica una versión truncada de AvrPto1; la expresión heteróloga en esta cepa de la versión completa de este T3E codificada por Psv NCPBB 3335 disminuye su virulencia en plantas de adelfa.
11. La expresión heteróloga de los tres T3E exclusivos de cepas de Psr (AvrRps4, HopZ5 y HopF1) en cepas de Psv, Psn, Psm y Psf reduce su virulencia y/o supervivencia en el huésped del que se aislaron, pero no les confiere la capacidad de infectar retama.

Conclusions



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. The phylogeny of *Pseudomonas savastanoi*, the effector content (T3E) of the type III secretion system (T3SS) and the ability of the isolated strains of oleander 0485_9 and ICMP 13786 to cause knots in olive trees but not in oleander, support their inclusion in the pathovar *savastanoi* (Psv) of this species.
2. The 21 genomes of *P. savastanoi* strains currently available encode a canonical T3SS (T-PAI), a rhizobial T3SS (R-PAI) and genes from the type IVA, type IVB, type IVC and type VI secretion systems.
3. The five pathovars of *P. savastanoi* of woody plants encode characteristic sets of T3Es, including specific truncations of these, which hierarchically cluster the strains of this species in a similar way as their phylogeny based on the essential gene sequences.
4. The *P. savastanoi* strains encode a total of 43 different T3Es, 21 of which are shared by all strains, as well as a possible new effector identified in this work; the strains of *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (Psr) encode three exclusive T3Es (AvrRps4, HopZ5 and HopF1) and one exclusive possible new effector.
5. The HrpL regulator is essential for the pathogenicity and induction of the hypersensitive response in strains of the *P. savastanoi* pathovars *nerii* (Psn), *mandevillae* (Psm), *fraxini* (Psf) and Psr.
6. The HrpL regulon of Psv NCPPB 3335 is composed of at least 53 genes, among which are the encoders of two possible new T3Es and the first gene of the operon of the synthesis of phytotoxin phevamine A, in addition, 26 other genes that could be part of this regulation have been bioinformatically identified.
7. The distribution of HopAO1, HopBL1 and HopBL2 in *P. syringae* complex strains supports their association with woody hosts.
8. The role of T3Es HopBL1 and HopBL2 in the virulence of *P. savastanoi* is dependent on strain and host, highlighting the role of HopBL1 in the virulence and survival of Psn ESC23 in olive and oleander, and the role of HopBL2 in the virulence of Psn ESC23 and CFBP 5067 strains in olive trees.

9. The HopBL2 effector is located in subnuclear *loci* and co-localizes with the membrane, with plasmodesmata and with microtubules in *Nicotiana bethamiana* cells.
10. Psn ESC23 encodes a truncated version of AvrPto1; the heterologous expression in this strain of the full version of this T3E encoded by Psv NCPBB 3335 decreases its virulence in oleander plants.
11. The heterologous expression of the three exclusive T3Es strains of Psr (AvrRps4, HopZ5 and HopF1) in Psv, Psn, Psm and Psf strains reduces their virulence and/or survival in the host from which they were isolated, but does not confer on them the ability to infect broom.

Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. San Diego, USA: Elsevier Academic Press.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4856-4861. doi: 10.1073/pnas.97.9.4856.
- Almeida, N.F., Yan, S., Lindeberg, M., Studholme, D.J., Schneider, D.J., Condon, B., *et al.* (2009). A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(1), 52-62. doi: 10.1094/MPMI-22-1-0052.
- Álvarez, F., García de los Ríos, J.E., Jiménez, 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(6), 603-609. doi: 10.1023/A:1008604011154.
- 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*. *FEMS Microbiology Letters*, 356(2), 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(6), 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. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4332-4351. doi: 10.1111/1462-2920.12856.
- Aung, K., Kim, P., Li, Z., Joe, A., Kvitko, B.H., Alfano, J.R., *et al.* (2019). Pathogenic bacteria target plant plasmodesmata to colonize and invade surrounding tissues. *The Plant Cell*, 32(3), 595-611. doi: 10.1105/tpc.19.00707.
- Azad, H.R., and Cooksey, D.A. (1995). A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic population of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology*, 85, 740-745. doi: 10.1094/Phyto-85-740.
- Balestra, G.M., Lamichhane, J.R., Kshetri, M.B., Mazzaglia, A., and Varvaro, L. (2009). First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Nepal. *Plant Pathology*, 58(2), 393. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.02007.x.
- Baltrus, D.A., McCann, H.C., and Guttman, D.S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 152-168. doi: 10.1111/mpp.12506.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., and Cherkis, K. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathogen*, 7(7), e1002132. doi: 10.1371/journal.ppat.1002132.
- Baltrus, D.A., and Orth, K.N. (2018). Understanding genomic diversity in *Pseudomonas syringae* throughout the forest and on the trees. *New Phytologist*, 219(2), 482-484. doi: 10.1111/nph.15269.
- Bardaji, L., Añorga, M., Jackson, R.W., Martínez-Bilbao, A., Yanguas-Casás, N., and Murillo, J. (2011a). Miniature transposable sequences are frequently mobilized in the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS ONE*, 6(10), e25773. doi: 10.1371/journal.pone.0025773.

- Bardaji, L., Perez-Martinez, I., Rodriguez-Moreno, L., Rodriguez-Palenzuela, P., Sundin, G.W., Ramos, C., *et al.* (2011b). Sequence and role in virulence of the three plasmid complement of the model tumor-inducing bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. *PLoS ONE*, 6(10), e25705. doi: 10.1371/journal.pone.0025705.
- 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 Announcements*, 3(2), e00379-00315. doi: 10.1128/genomeA.00379-15.
- Bastedo, D.P., Lo, T., Laflamme, B., Desveaux, D., and Guttman, D.S. (2019). "Diversity and evolution of type III secreted effectors: a case study of three families", in *Bacterial Type III Protein Secretion Systems. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 427. Springer, Cham. doi: 10.1007/82_2019_165.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., and Sands, D.C. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE*, 9(9), e105547. doi: 10.1371/journal.pone.0105547.
- Bernal, P., Llamas, M.A., and Filloux, A. (2018). Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 20(1), 1-15. doi: 10.1111/1462-2920.13956.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293-300. doi: 10.1128/JB.62.3.293-300.1951.
- Bi, D., Liu, L., Tai, C., Deng, Z., Rajakumar, K., and Ou, H.-Y. (2013). SecReT4: a web-based bacterial type IV secretion system resource. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D660-D665. doi: 10.1093/nar/gks1248.
- Bian, H., Zhang, L., Chen, L., Wang, W., Ji, H., and Dong, H. (2019). Real-time monitoring of translocation of selected type-III effectors from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* into rice cells. *Journal of Biosciences*, 44(4), 82. doi: 10.1007/s12038-019-9916-0.
- 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(9), e0163357. doi: 10.1371/journal.pone.0163357.
- Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., *et al.* (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, 20(3), 681-683. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.5731077.x.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10, 104. doi: 10.1186/1471-2164-10-104.
- Bull, C.T., and Koike, S.T. (2015). Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 157-180. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120122.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987). Xl1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.

- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 262-310. doi: 10.1128/MMBR.05017-11.
- Büttner, D. (2016). Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 894-937. doi: 10.1093/femsre/fuw026.
- Büttner, D., and He, S.Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 150(4), 1656-1664. doi: 10.1104/pp.109.139089.
- Caballo-Ponce, E. (2017). *Host specificity and virulence of the phytopathogenic bacteria Pseudomonas savastanoi*. Universidad de Málaga.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), e00950-00918. 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. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1089. doi: 10.3389/fpls.2017.01089.
- 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(11), 2319-2319. doi: 10.1094/pdis-03-16-0334-pdn.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(2), 113-126. doi: 10.1094/mpmi-11-16-0233-r.
- Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J., and McQuillan, J.A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464-469. doi: 10.1093/bioinformatics/btr703.
- 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(5), 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. *Frontiers in Plant Science*, 8, 680. doi: 10.3389/fpls.2017.00680.
- Castiblanco, L.F., Triplett, L.R., and Sundin, G.W. (2018). Regulation of effector delivery by type III secretion chaperone proteins in *Erwinia amylovora*. *Frontiers in Microbiology*, 9(146). doi: 10.3389/fmicb.2018.00146.
- 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. *BMC Microbiology*, 15(1), 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(9-10), 774-787. doi: 10.1016/j.resmic.2016.09.002.



- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., *et al.* (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2549-2554. doi: 10.1073/pnas.0409660102.
- Charity, J.C., Pak, K., Delwiche, C.F., and Hutcheson, S.W. (2003). Novel exchangeable effector loci associated with the *Pseudomonas syringae* hrp pathogenicity island: evidence for integron-like assembly from transposed gene cassettes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), 495-507. doi: 10.1094/mpmi.2003.16.6.495.
- Cheval, C., and Faulkner, C. (2018). Plasmodesmal regulation during plant-pathogen interactions. *New Phytologist*, 217(1), 62-67. doi: 10.1111/nph.14857.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.008.
- Choi, K.H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 391-397. doi: 10.1016/j.mimet.2005.06.001.
- Choi, S., Jayaraman, J., Segonzac, C., Park, H.-J., Park, H., Han, S.-W., *et al.* (2017). *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae type III effectors localized at multiple cellular compartments activate or suppress innate immune responses in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science*, 8(2157). doi: 10.3389/fpls.2017.02157.
- Choi, S., Jayaraman, J., and Sohn, K.H. (2018). *Arabidopsis thaliana* SOBER1 (SUPPRESSOR OF AVRBST-ELICITED RESISTANCE 1) suppresses plant immunity triggered by multiple bacterial acetyltransferase effectors. *New Phytologist*, 219(1), 324-335. doi: 10.1111/nph.15125.
- 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(16), 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(2), 950-957. doi: 10.1128/JB.143.2.950-957.1980.
- Comai, L., and Kosuge, T. (1982). Cloning characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 40-46. doi: 10.1128/JB.149.1.40-46.1982.
- Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537-552. doi: 10.1038/nri.2016.77.
- 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(1), 53-60. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.003.
- Cuppels, D.A. (1986). Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 323-327. doi: 10.1128/AEM.51.2.323-327.1986.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 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 Biology*, 20(1), 3-3. doi: 10.1186/s13059-018-1606-y.

- Dunn, O.J. (1961). Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, 56(293), 52-64. doi: 10.1080/01621459.1961.10482090.
- Eichinger, V., Nussbaumer, T., Platzner, A., Jehl, M.-A., Arnold, R., and Rattei, T. (2015). EffectiveDB—updates and novel features for a better annotation of bacterial secreted proteins and type III, IV, VI secretion systems. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D669-D674. doi: 10.1093/nar/gkv1269.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., *et al.* (2018). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D427-D432. doi: 10.1093/nar/gky995.
- Eltlbany, N., Prokscha, Z.-Z., Castañeda-Ojeda, M.P., Krögerrecklenfort, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8492-8497. doi: 10.1128/AEM.02049-12.
- Fauvert, M., and Michiels, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium–legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01254.x.
- Feng, F., and Zhou, J.-M. (2012). Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 469-476. doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.004.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., *et al.* (2006). Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, allows de novo reconstruction of the Hrp cis element, and identifies novel coregulated genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(11), 1167-1179. doi: 10.1094/mpmi-19-1167.
- 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(5), e00538-00517. doi: 10.1128/jb.00538-17.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., *et al.* (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2275-2280. doi: 10.1073/pnas.032514099.
- Fouts, D.E., Badel, J.L., Ramos, A.R., Rapp, R.A., and Collmer, A. (2003). A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Hrp (type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(1), 43-52. doi: 10.1094/mpmi.2003.16.1.43.
- Galan, J.E., and Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284(5418), 1322-1328. doi: 10.1126/science.284.5418.1322.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., and Grimont, P.A.D. (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, 469-478. doi: 10.1099/00207713-49-2-469.
- Ghosh, S., and Chan, C.-K.K. (2016). "Analysis of RNA-seq data using TopHat and Cufflinks", in *Plant Bioinformatics. Methods in Molecular Biology*, ed. D. Edwards. New York, YK: Humana Press, 339-361. doi: 10.1007/978-1-4939-3167-5_18.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3266-3279. doi: 10.1128/aem.06655-11.
- Göhre, V., and Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 189-215. doi: 10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050.
- 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(2422). doi: 10.3389/fmicb.2017.02422.
- Guillorrit, C., and Samson, R. (1993). A Note: Serological study of four pathovars of *Pseudomonas syringae*: Ps. syr. aptata, Ps. syr. tabaci, Ps. syr. mors-prunorum and Ps. syr. phaseolicola. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(6), 683-687. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb05203.x.
- Guo, M., Kim, P., Li, G., Elowsky, Christian G., and Alfano, James R. (2016). A bacterial effector co-opts calmodulin to target the plant microtubule network. *Cell Host & Microbe*, 19(1), 67-78. doi: 10.1016/j.chom.2015.12.007.
- Haapalainen, M., Mosorin, H., Dorati, F., Wu, R.-F., Roine, E., Taira, S., et al. (2012). Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 4810-4822. doi: 10.1128/jb.00611-12.
- Halane, M.K., Kim, S.H., Spears, B.J., Garner, C.M., Rogan, C.J., Okafor, E.C., et al. (2018). The bacterial type III-secreted protein AvrRps4 is a bipartite effector. *PLOS Pathogens*, 14(3), e1006984. doi: 10.1371/journal.ppat.1006984.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. (1995). "Techniques for transformation of *E. coli*", in *In DNA cloning 3: a practical approach*. 1-36.
- Hardham, A.R. (2013). Microtubules and biotic interactions. *The Plant Journal*, 75(2), 278-289. doi: 10.1111/tpj.12171.
- He, P., Shan, L., Lin, N.-C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., et al. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, 125(3), 563-575. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.047.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., and Ausubel, F.M. (2000). The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3508-3516.
- Henry, E., Toruño, T.Y., Jauneau, A., Deslandes, L., and Coaker, G. (2017). Direct and indirect visualization of bacterial effector delivery into diverse plant cell types during infection. *The Plant Cell*, 29(7), 1555-1570. doi: 10.1105/tpc.17.00027.
- Hirsch, M., and Staskawicz, B.J. (1996). Identification of a new *Arabidopsis* disease resistance locus, *RPS4*, and cloning of the corresponding avirulence gene, *avrRps4*, from *Pseudomonas syringae* pv. *psidi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(1), 55-61. doi: 10.1094/mpmi-9-0055.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 624-653. doi: 10.1128/mmbr.64.3.624-653.2000.
- Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host & Microbe*, 15(1), 9-21. doi: 10.1016/j.chom.2013.11.008.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of

- chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212(1), 77-86. doi: 10.1016/S0378-1119(98)00130-9.
- 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. *The ISME Journal*, 5(12), 1857-1870. doi: 10.1038/ismej.2011.65.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., and Mudgett, M.B. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol*, 50(2), 377-389. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x.
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 379-433. doi: 10.1128/MMBR.62.2.379-433.1998.
- 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 Phytologist*, 219(2), 672-696. doi: 10.1111/nph.15182.
- 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(19), 5589-5598. doi: 10.1128/JB.183.19.5589-5598.2001.
- Huynh, T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B. (1989). Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science*, 245(4924), 1374-1377. doi: 10.1126/science.2781284.
- Iacobellis, N.S., Caponero, A., and Evidente, A. (1998). Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathology*, 47(1), 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(3), 238-248. doi: 10.1111/j.1439-0434.1994.tb04813.x.
- Ivanov, S., and Harrison, M.J. (2014). A set of fluorescent protein-based markers expressed from constitutive and arbuscular mycorrhiza-inducible promoters to label organelles, membranes and cytoskeletal elements in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 80(6), 1151-1163. doi: 10.1111/tpj.12706.
- Jackson, R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., Arnold, D.L., *et al.* (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10875-10880. doi: 10.1073/pnas.96.19.10875.
- Jackson, R.W., Mansfield, J.W., Ammoun, H., Dutton, L.C., Wharton, B., Ortiz-Barredo, A., *et al.* (2002). Location and activity of members of a family of *virPphA* homologues in pathovars of *Pseudomonas syringae* and *P. savastanoi*. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 205-216. doi: 10.1046/j.1364-3703.2002.00121.x.
- Jalan, N., Kumar, D., Andrade, M.O., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., *et al.* (2013). Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. *BMC Genomics*, 14(1), 551. doi: 10.1186/1471-2164-14-551.
- 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(7), 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(2), 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(1), 79-84. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80365-6.
- Jayaraman, J., Choi, S., Prokchorchik, M., Choi, D.S., Spiandore, A., Rikkerink, E.H., et al. (2017). A bacterial acetyltransferase triggers immunity in *Arabidopsis thaliana* independent of hypersensitive response. *Scientific Reports*, 7(1), 3557. doi: 10.1038/s41598-017-03704-x.
- Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J., Walters, K., Betteridge, P., Teverson, D., et al. (1991). Gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Phaseolus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(6), 553-562. doi: 10.1094/MPMI-4-553.
- 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(18), 6488-6498. doi: 10.1128/JB.187.18.6488-6498.2005.
- Jones, A.M., and Wildermuth, M.C. (2011). The phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 193(11), 2767-2775. doi: 10.1128/jb.00069-10.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3), 275-282. doi: 10.1093/bioinformatics/8.3.275.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. doi: 10.1038/nature05286.
- Juhas, M. (2015). Type IV secretion systems and genomic islands-mediated horizontal gene transfer in *Pseudomonas* and *Haemophilus*. *Microbiological Research*, 170, 10-17. doi: 10.1016/j.micres.2014.06.007.
- Juhas, M., Crook, D.W., Dimopoulou, I.D., Lunter, G., Harding, R.M., Ferguson, D.J.P., et al. (2007). Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 761-771. doi: 10.1128/jb.01327-06.
- Kamiunten, H. (1999). Isolation and characterization of virulence gene *psvA* on a plasmid of *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 65(5), 501-509. doi: 10.3186/jjphytopath.65.501.
- 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(12), 1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2018). Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal*, 93(4), 651-663. doi: 10.1111/tjp.13780.
- Khan, M., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 49-55. doi: 10.1016/j.mib.2015.10.006.

- Kim, J.-G., and Mudgett, M.B. (2019). Tomato bHLH132 transcription factor controls growth and defense and is activated by *Xanthomonas euvesicatoria* effector XopD during pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(12), 1614-1622. doi: 10.1094/mpmi-05-19-0122-r.
- Kim, J.-G., Stork, W., and Mudgett, M.B. (2013). *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SlERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host & Microbe*, 13(2), 143-154. doi: 10.1016/j.chom.2013.01.006.
- Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A., and Mudgett, M.B. (2008). XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *The Plant Cell*, 20(7), 1915-1929. doi: 10.1105/tpc.108.058529.
- Kim, J.G., Taylor, K.W., and Mudgett, M.B. (2011). Comparative analysis of the XopD type III secretion (T3S) effector family in plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, 12(8), 715-730. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00706.x.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307. doi: 10.5555/uri:pii:002221435490222X.
- Koncz, C., and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, 204(3), 383-396. doi: 10.1007/BF00331014.
- Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A., and Waigmann, E. (2003). MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiology*, 132(4), 1870-1883. doi: 10.1104/pp.103.022269.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Labaj, P.P., Leparc, G.G., Linggi, B.E., Markillie, L.M., Wiley, H.S., and Kreil, D.P. (2011). Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics*, 27(13), i383-i391. doi: 10.1093/bioinformatics/btr247.
- Laflamme, B., Dillon, M.M., Martel, A., Almeida, R.N.D., Desveaux, D., and Guttman, D.S. (2020). The pan-genome effector-triggered immunity landscape of a host-pathogen interaction. *Science*, 367(6479), 763-768. doi: 10.1126/science.aax4079.
- Lam, H.N., Chakravarthy, S., Wei, H.L., BuiNguyen, H., Stodghill, P.V., and Collmer, A. (2014). Global analysis of the HrpL regulon in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals new regulon members with diverse functions. *PLoS ONE*, 9(8), e106115. doi: 10.1371/journal.pone.0106115.
- Lamichane, 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*, ed. D.L. Sparks. San Diego, CA: Academic Press, 235-295. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800132-5.00004-3>.
- Lan, L., Deng, X., Zhou, J., and Tang, X. (2006). Genome-wide gene expression analysis of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals overlapping and distinct pathways regulated by *hrpL* and *hrpRS*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(9), 976-987. doi: 10.1094/mpmi-19-0976.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359. doi: 10.1038/nmeth.1923.

- Lee, A.H.-Y., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., *et al.* (2012). A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002523. doi: 10.1371/journal.ppat.1002523.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., *et al.* (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li, K., Zhu, Y., Yan, W., Deng, X., Xiao, Y., Song, L., *et al.* (2019). Two components of the *rhpPC* operon coordinately regulate the type III secretion system and bacterial fitness in *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *PLoS Pathogens*, 15(4), e1007673. doi: 10.1371/journal.ppat.1007673.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2009). The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 767-775. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00587.x.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*, 20(4), 199-208. doi: 10.1016/j.tim.2012.01.003.
- Lindeberg, M., Stavrinides, J., Chang, J.H., Alfano, J.R., Collmer, A., Dangl, J.L., *et al.* (2005). Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4), 275-282. doi: 10.1094/mpmi-18-0275.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and Panopoulos, N.J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 168(2), 512-522. doi: 10.1128/jb.168.2.512-522.1986.
- 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(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lo, T., Koulana, N., Seto, D., Guttman, D.S., and Desveaux, D. (2017). The HopF family of *Pseudomonas syringae* type III secreted effectors. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 457-468. doi: 10.1111/mpp.12412.
- López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montaña, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogín, R.A., Espuny, M.d.R., *et al.* (2008). Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology*, 154(6), 1825-1836. doi: 10.1099/mic.0.2007/016337-0.
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P.A., Schneider, A.R., and Collmer, A. (2004). HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Molecular Microbiology*, 54(2), 353-365. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04285.x.
- Macho, A.P. (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist*, 210(1), 51-57. doi: 10.1111/nph.13605.
- 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(1), 69-80. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00511.x.
- Macho, Alberto P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, 54(2), 263-272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028.

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., *et al.* (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614-629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- Mansfield, J., Tsiamis, G., Puri, N., Bennett, M., Jenner, C., Stevens, C., *et al.* (1997). "Analysis of gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola and *Phaseolus*", in *Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens*, eds. K. Rudolph, T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian & J. von Kietzell. Dordrecht: Springer Netherlands, 385-391. doi: 10.1007/978-94-011-5472-7_70.
- Mansfield, J.W. (2009). From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrp delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 721-734. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00576.x.
- Martín-Sanz, A., de la Vega, M.P., Murillo, J., and Caminero, C. (2013). Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse. *Phytopathology*, 103(7), 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. *pisi* strains. *Plant Pathology*, 61(6), 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. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4847-4861. doi: 10.1111/1462-2920.13389.
- Martínez-García, P.M., Ramos, C., and Rodríguez-Palenzuela, P. (2015a). T346Hunter: a novel web-based tool for the prediction of type III, type IV and type VI secretion systems in bacterial genomes. *PLoS ONE*, 10(4), e0119317. doi: 10.1371/journal.pone.0119317.
- Martínez-García, P.M., Rodríguez-Palenzuela, P., Arrebola, E., Carrión, V.J., Gutiérrez-Barranquero, J.A., Pérez-García, A., *et al.* (2015b). 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(8), e0136101. doi: 10.1371/journal.pone.0136101.
- Mata-Pérez, C., and Spoel, S.H. (2019). Thioredoxin-mediated redox signalling in plant immunity. *Plant Science*, 279, 27-33. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.05.001.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(5), 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 Phytologist*, 196(4), 1182-1196. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04357.x.
- McAtee, P.A., Brian, L., Curran, B., van der Linden, O., Nieuwenhuizen, N.J., Chen, X., *et al.* (2018). Re-programming of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* gene expression during early stages of infection of kiwifruit. *BMC Genomics*, 19(1), 822. doi: 10.1186/s12864-018-5197-5.

- McCann, H.C., and Guttman, D.S. (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist*, 177(1), 33-47. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02293.x.
- McCann, H.C., Rikkerink, E.H.A., Bertels, F., Fiers, M., Lu, A., Rees-George, J., *et al.* (2013). Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003503. doi: 10.1371/journal.ppat.1003503.
- 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(10), e000089-e000089. doi: 10.1099/mgen.0.000089.
- Morea, M., Sisto, A., Iacobellis, N.S., Surico, G., and Morea, A. (1989). Introduction of cosmid pVK102 into *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi. *Phytopathologia Mediterranea*, 28(2), 140-146.
- Moreira, L.M., Almeida, N.F., Potnis, N., Digiampietri, L.A., Adi, S.S., Bortolossi, J.C., *et al.* (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics*, 11(1), 238. doi: 10.1186/1471-2164-11-238.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 11, 973. doi: 10.3389/fpls.2020.00973.
- 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 Announcements*, 2(5), e00864-00814. doi: 10.1128/genomeA.00864-14.
- Moretti, C., Trabalza, S., Granieri, L., Caballo-Ponce, E., Devescovi, G., Del Pino, A.M., *et al.* (2019). A Na(+) /Ca(2+) exchanger of the olive pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* is critical for its virulence. *Molecular Plant Pathology*, 20(5), 716-730. doi: 10.1111/mpp.12787.
- Moretti, C., Vinatzer, B.A., Onofri, A., Valentini, F., and Buonauro, R. (2017). Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology*, 66(4), 595-605. doi: 10.1111/ppa.12614.
- 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. *Phytopathology Research*, 1(1), 4. 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. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 85-104. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102402.
- Morris, R.O. (1986). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 509-538. doi: 10.1146/annurev.pp.37.060186.002453.
- 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 Pathogens*, 10(1), e1003807. doi: 10.1371/journal.ppat.1003807.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U. (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, 184(5), 1340-1348. doi: 10.1128/jb.184.5.1340-1348.2002.

- 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(9), 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. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 269-289. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095242.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), E9514-E9522. doi: 10.1073/pnas.1803779115.
- 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 double dagger. *Molecular Plant Pathology*, 6(2), 125-138. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00269.x.
- Oh, H.S., and Collmer, A. (2005). Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *Plant J*, 44(2), 348-359. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02529.x.
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., et al. (2010). Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(2), 223-234. doi: 10.1094/mpmi-23-2-0223.
- Ortíz-Martín, I., Thwaites, R., Macho, A.P., Mansfield, J.W., and Beuzón, C.R. (2010). Positive regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(5), 665-681. doi: 10.1094/mpmi-23-5-0665.
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Mansfield, J.W., and Beuzón, C.R. (2010). Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(5), 682-701. doi: 10.1094/mpmi-23-5-0682.
- Ouko, M.O., Sambade, A., Brandner, K., Niehl, A., Peña, E., Ahad, A., et al. (2010). Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. *The Plant Journal*, 62(5), 829-839. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04195.x.
- Owen, D.B. (1965). The Power of Student's t-test. *Journal of the American Statistical Association*, 60(309), 320-333. doi: 10.1080/01621459.1965.10480794.
- Park, E., Lee, H.-Y., Woo, J., Choi, D., and Dinesh-Kumar, S.P. (2017). Spatiotemporal monitoring of *Pseudomonas syringae* effectors via type III secretion using split fluorescent protein fragments. *The Plant Cell*, 29(7), 1571-1584. doi: 10.1105/tpc.17.00047.
- 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*, 160(3), 556-566. doi: 10.1099/mic.0.074468-0.
- Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A.-C., and Genin, S. (2013). Repertoire, unified nomenclature and evolution of the type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics*, 14(1), 859. doi: 10.1186/1471-2164-14-859.
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J.M., Salcedo, C.I., et al. (2006). Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, 96(3), 313-319. doi: 10.1094/PHYTO-96-0313.

- Pérez-Martínez, I. (2007). *Análisis genómico global de plásmidos de Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*. Doctoral Thesis, Doctoral Thesis, Universidad de Málaga.
- Pérez-Martínez, I., Rodríguez-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.). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3611-3619. doi: 10.1128/AEM.00133-10.
- 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(1), 60-69. doi: 10.1016/j.resmic.2006.09.008.
- Pérez-Martínez, 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(2), 625-635. doi: 10.1128/JB.01067-07.
- 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(3), e91645. doi: 10.1371/journal.pone.0091645.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., et al. (2002). Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7652-7657. doi: 10.1073/pnas.112183899.
- Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., and Alfano, J.R. (2005). The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 649. doi: 10.1128/JB.187.2.649-663.2005.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pinaud, L., Sansonetti, P.J., and Phalipon, A. (2018). Host cell targeting by enteropathogenic bacteria T3SS effectors. *Trends in Microbiology*, 26(4), 266-283. doi: 10.1016/j.tim.2018.01.010.
- 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(3), 415-415. doi: 10.1094/pdis-07-14-0672-pdn.
- Putnam, M.L., Curtis, M., Serdani, M., and Palmateer, A.J. (2010). *Pseudomonas savastanoi* found in association with stem galls on *Mandevilla*. *Phytopathology*, 100, S104.
- Quesada, J.M., García, A., Bertolini, E., López, M.M., and Penyalver, R. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *International Microbiology*, 10(2), 77-84. doi: 10.2436/20.1501.01.11.
- Quesada, J.M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedopa, C.I., Carbonell, E.A., and López, M.M. (2009). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, 59(2), 262-269. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02200.x.
- 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(9), 998-1009. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x.
- Rodríguez-Moreno, L., Barceló-Munoz, A., and Ramos, C. (2008). *In vitro* analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with

- micropropagated olive plants. *Phytopathology*, 98(7), 815-822. doi: 10.1094/PHYTO-98-7-0815.
- Rodríguez-Moreno, L., Jiménez, A.J., and Ramos, C. (2009). Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 2(4), 476-488. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00101.x.
- 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. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1604-1620. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02207.x.
- Rubio, M., Rodríguez-Moreno, L., Ballester, A.R., de Moura, M.C., Bonghi, C., Candresse, T., et al. (2015). Analysis of gene expression changes in peach leaves in response to *Plum pox virus* infection using RNA-Seq. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 164-176. doi: 10.1111/mpp.12169.
- Rufián, J.S., Rueda-Blanco, J., López-Márquez, D., Macho, A.P., Beuzón, C.R., and Ruiz-Albert, J. (2020). The bacterial effector HopZ1a acetylates MKK7 to suppress plant immunity. *BioRxiv*, 2020.2006.2014.150508. doi: 10.1101/2020.06.14.150508.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, C., Iannino, F., Deakin, W.J., Ugalde, R.A., and Lepek, V.C. (2009). Characterization of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 type-three protein secretion system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 519-528. doi: 10.1094/mpmi-22-5-0519.
- Sarris, P.F., Skandalis, N., Kokkinidis, M., and Panopoulos, N.J. (2010). *In silico* analysis reveals multiple putative type VI secretion systems and effector proteins in *Pseudomonas syringae* pathovars. *Molecular Plant Pathology*, 11(6), 795-804. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00644.x.
- Savastano, L. (1886). Le maladies de l'olivier et la tuberculose en particulier. *Comptes Rendu des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*, CIII, 103-114.
- Schulmeyer, K.H., and Yahr, T.L. (2017). Post-transcriptional regulation of type III secretion in plant and animal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 30-36. doi: 10.1016/j.mib.2017.01.009.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., et al. (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host & Microbe*, 4(1), 17-27. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.017.
- Shan, L., Thara, V.K., Martin, G.B., Zhou, J.-M., and Tang, X. (2000). The pseudomonas AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *The Plant Cell*, 12(12), 2323-2337. doi: 10.1105/tpc.12.12.2323.
- Shrivastava, S., and Mande, S.S. (2008). Identification and functional characterization of gene components of type VI Secretion system in bacterial genomes. *PLoS ONE*, 3(8), e2955. doi: 10.1371/journal.pone.0002955.
- 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(5), 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(3), 366-372. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01567.x.



- Sisto, A., Morea, M., Zaccaro, F., Palumbo, G., and Iacobellis, N.S. (1999). Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in hypersensitive response elicitation and pathogenicity. *Journal of Phytopathology*, 147(6), 321-330. doi: 10.1046/j.1439-0434.1999.00398.x.
- Smidt, M., and Kosuge, T. (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alphamethyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation in oleander. *Physiological Plant Pathology*, 13(2), 203-214. doi: 10.1016/0048-4059(78)90035-8.
- Söding, J., Biegert, A., and Lupas, A.N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_2), W244-W248. doi: 10.1093/nar/gki408.
- Sohn, K.H., Saucet, S.B., Clarke, C.R., Vinatzer, B.A., O'Brien, H.E., Guttman, D.S., et al. (2012). HopAS1 recognition significantly contributes to *Arabidopsis* nonhost resistance to *Pseudomonas syringae* pathogens. *New Phytologist*, 193(1), 58-66. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03950.x.
- Solovyev, V., and Salamov, A. (2011). *Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences*. New York: Nova Science Publishers.
- Staehelin, C., and Krishnan, H.B. (2015). Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *The Biochemical Journal*, 470(3), 263-274. doi: 10.1042/bj20150518.
- Surico, G., Evidente, A., Iacobellis, N.S., and Randazzo, G. (1985a). A cytokinin from the culture filtrate of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytochemistry* 24(7), 1499-1502. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81053-5.
- Surico, G., Iacobellis, N.S., and Sisto, A. (1985b). 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(3), 309-320. doi: 10.1016/0048-4059(85)90006-2.
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., and Merino, E. (2018). Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics*, 34(23), 4118-4120. doi: 10.1093/bioinformatics/bty496.
- 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(3), 469-478. doi: 10.1046/j.1365-3059.1996.d01-147.x.
- 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(4), 957. doi: 10.3390/genes2040957.
- Thakur, S., Weir, B.S., and Guttman, D.S. (2016). Phytopathogen genome announcement: draft genome sequences of 62 *Pseudomonas syringae* type and pathotype strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4), 243-246. doi: 10.1094/MPMI-01-16-0013-TA.
- Thomas, C.L., Bayer, E.M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., and Maule, A.J. (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biology*, 6(1), e7. doi: 10.1371/journal.pbio.0060007.
- Toruño, T.Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 419-441. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100204.
- Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenhull, R., Jackson, R.W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., et al. (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to

- avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *The EMBO Journal*, 19(13), 3204-3214. doi: 10.1093/emboj/19.13.3204.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(10), 1207-1219. doi: 10.1094/MPMI-03-11-0077.
- Varvaro, L., and Surico, G. (1978). Comportamento di diverse cultivars di olivo (*Olea europaea* L.) alla inoculazione artificiale con *Pseudomonas savastanoi* (E. F. Smith) Stevens. *Phytopathologia Mediterranea*, 17, 174-178.
- Vinatzter, 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. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 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(1), e02273-02216. doi: 10.1128/mBio.02273-16.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., and Waksman, G. (2010). Microreview: type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology*, 12(9), 1203-1212. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x.
- Wang, J., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, Y., Yang, P., Yuan, J., et al. (2018). HrpS is a global regulator on type III secretion system (T3SS) and non-T3SS genes in *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(12), 1232-1243. doi: 10.1094/mpmi-02-18-0035-r.
- Wang, T., Cai, Z., Shao, X., Zhang, W., Xie, Y., Zhang, Y., et al. (2019). Pleiotropic effects of c-di-GMP content in *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(10), e00152-00119. doi: 10.1128/aem.00152-19.
- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., and Lin, N.C. (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, 51. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03126.x.
- 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(10), 3089-3091. doi: 10.1128/jb.176.10.3089-3091.1994.
- Xie, Y., Shao, X., and Deng, X. (2019a). Regulation of type III secretion system in *Pseudomonas syringae*. *Environmental Microbiology*, 21(12), 4465-4477. doi: 10.1111/1462-2920.14779.
- Xie, Y., Shao, X., Zhang, Y., Liu, J., Wang, T., Zhang, W., et al. (2019b). *Pseudomonas savastanoi* two-component system RhpRS switches between virulence and metabolism by tuning phosphorylation state and sensing nutritional conditions. *mBio*, 10(2), e02838-02818. doi: 10.1128/mBio.02838-18.
- Xin, X.-F., Kvitko, B., and He, S.Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328. doi: 10.1038/nrmicro.2018.17.
- Yamada, T., Lee, P.D., and Kosuge, T. (1986). Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*: nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8263-8267.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A., and Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146 (Pt 10), 2385-2394. doi: 10.1099/00221287-146-10-2385.

- Young, J.M., Takikawa, Y., Gardan, L., and Stead, D.E. (1992). Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 67-105. doi: 10.1146/annurev.py.30.090192.000435.
- Zhang, L., Trncik, C., Andrade, S.L.A., and Einsle, O. (2017). The flavinyl transferase ApbE of *Pseudomonas stutzeri* matures the NosR protein required for nitrous oxide reduction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1858(2), 95-102. doi: 10.1016/j.bbabo.2016.11.008.
- Zhao, Y., Ma, Z., and Sundin, G.W. (2005). Comparative genomic analysis of the pPT23A plasmid family of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 2113-2126. doi: 10.1128/JB.187.6.2113-2126.2005.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345-351. doi: 10.1016/j.it.2014.05.004.
- Zumaquero, A., Macho, A.P., Rufian, J.S., and Beuzon, C.R. (2010). Analysis of the role of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a in interaction with the plant. *Journal of Bacteriology*, 192. doi: 10.1128/jb.00260-10.