

Análisis comparativo de dos colecciones de *Pseudo monas syringae* pv. *syringae* asociadas a mango

Aprile, F.*, Gutiérrez-Barranquero, J.A., Cazorla, F.M., de Vicente, A.
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC),
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. *april@uma.es

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas syringae es una bacteria ubicua a nivel ambiental, siendo además la bacteria patógena de plantas más estudiada a nivel mundial. Presenta una taxonomía compleja en la que se han descrito más de 60 patovares que causan enfermedad en muchas especies de plantas diferentes, tanto ornamentales como importantes desde el punto de vista agronómico, generando graves pérdidas económicas a nivel mundial. Entre los patovares más importantes se encuentra el pv. *syringae* debido a su amplio rango de hospedador, y al arsenal de mecanismos de virulencia que posee. A principios de los años 90, se describió a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) como el agente causal de la necrosis apical del mango (NAM), enfermedad que afecta a este cultivo en las principales áreas de clima mediterráneo distribuidas a nivel mundial. Pss aisladas de mango muestran características importantes para su biología, tanto en sus mecanismos de virulencia como para el *fitness* epifítico. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito que Pss aisladas de mango producen una toxina antimetabolito denominada mangotoxina (Arrebola *et al.*, 2003), implicada en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Además, se describió el operón *mbo* (*mangotoxin biosynthetic operon*) como el encargado de su biosíntesis (Carrión *et al.*, 2012). También han sido descritos genes diferentes implicados en la supervivencia y persistencia epifítica de las poblaciones de Pss sobre los cultivos de mango, como son el operón *wss*, implicado en la biosíntesis de celulosa y, por tanto, en la adhesión y formación de biofilm (Arrebola *et al.*, 2015), y los genes *cap* (*copABCD* y *copABCD* modificados) relacionados con la resistencia a compuestos cúpricos (Cazarla *et al.*, 2002; Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2013; 2017). Estudios fenotípicos, genéticos y filo genéticos apoyan que Pss aisladas de mango forman un filotipo diferenciado asociado principalmente con la producción de mangotoxina y a la adaptación a su hospedador (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2013; Carrión *et al.*, 2013). Con todos estos antecedentes, como objetivo principal de este trabajo, se plantea conocer en profundidad cómo han evolucionado las poblaciones de Pss a lo largo del tiempo sobre el mango, analizando cómo se verían afectados los principales mecanismos de adaptación y virulencia descritos. Por lo tanto, se va a llevar a cabo el estudio fenotípico, genético y de genómica comparativa de dos poblaciones de Pss de diferentes localizaciones geográficas y separadas en el tiempo (Colección I: años 90'/Colección II: 2016-2018).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ambas colecciones se han caracterizado desde el punto de vista fenotípico y genético en cuanto a sus características más relevantes implicadas en su fase patogénica y epifítica.

Análisis fenotípicos

Se han realizado bioensayos para detectar la producción de mangotoxina, basado en la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, y para detectar la producción de celulosa, mediante un ensayo de unión de este polisacárido a rojo congo. Además, se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el sulfato de cobre *in vitro*.

Análisis genéticos

Se ha llevado a cabo la detección y secuenciación por PCR de genes específicos implicados en cada una de las características analizadas anteriormente: *mboB*, para mangotoxina, *wssE* de la celulosa y los genes *cop* responsables de la resistencia al cobre. Además se ha realizado un análisis de los perfiles plasmídicos para todas las cepas del estudio, junto con hibridación por southern blot para la detección de genes plasmídicos específicos como son *repA*, origen de replicación típico de plásmidos de la familia PT23A, *ruIA*, implicado en resistencia a luz UV y para los genes *copABCD*.

También se ha analizado la filogenia de las cepas incluidas en este estudio, empleando secuencias parciales de dos genes housekeeping (*gyrB* y *rpoD*) utilizando el programa MEGA ver. 7.

Por último, se ha llevado a cabo la secuenciación de genomas completos de 20 cepas de Pss representativas de entre todas las cepas de estudio, empleando la plataforma NextSeq550 de Illumina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados a nivel de caracterización fenotípica y genética tras las pruebas ensayadas muestran pocas diferencias entre las dos colecciones, encontrando más variabilidad en cuanto a los determinantes de la resistencia a cobre, las CMI y a los perfiles plasmídicos. En cuanto a los análisis filogenéticos se observó que la distribución de las cepas de Pss aisladas de mango no depende de la época de aislamiento ni del origen geográfico, resultados que corroboran lo obtenido en trabajos anteriores (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2013). No obstante, se han observado algunos subgrupos característicos asociados con determinantes de resistencia a cobre.

Actualmente se está llevando a cabo el análisis de los genomas completos secuenciados de las 20 cepas seleccionadas, junto a nuestra cepa de referencia PssUMAF0158.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por ayuda de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (PI2-AGR-1473), cofinanciados con fondos FEDER (UE), Universidad de Málaga, Campus de Excelencia Andalucía Tech.

BIBLIOGRAFÍA

- Arrebola, E., *et al.* (2003) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63:117-127.
Arrebola, E., *et al.* (2015) *FEMS Microbiol. Lett.* 345:1-10.
Carrión, V.J., *et al.* (2012) *PLoS ONE* 7(5):e36709.
Carrión, V.J., *et al.* (2013) *Appl. Environ. Microbiol.* 79:756-767.
Cazarla, F.M., *et al.* (2002) *Phytopathology* 92:909-916.
Gutiérrez-Barranquero, J.A., *et al.* (2013) *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1028-1033.

Gutiérrez-Barranquero, J.A., *et al.* (2017) BMC Genomics 18:365.