

Tesis Doctoral

Bases moleculares del desarrollo de biofilms en *Xanthomonas axonopodis pv citri* y su rol en el proceso infeccioso

Malamud, Florencia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Malamud, Florencia. (2011). Bases moleculares del desarrollo de biofilms en *Xanthomonas axonopodis pv citri* y su rol en el proceso infeccioso. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Malamud, Florencia. "Bases moleculares del desarrollo de biofilms en *Xanthomonas axonopodis pv citri* y su rol en el proceso infeccioso". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Departamento de Química Biológica

**Bases moleculares del desarrollo de “biofilms” en
Xanthomonas axonopodis pv *citri* y su rol en el
proceso infeccioso**

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Biológica

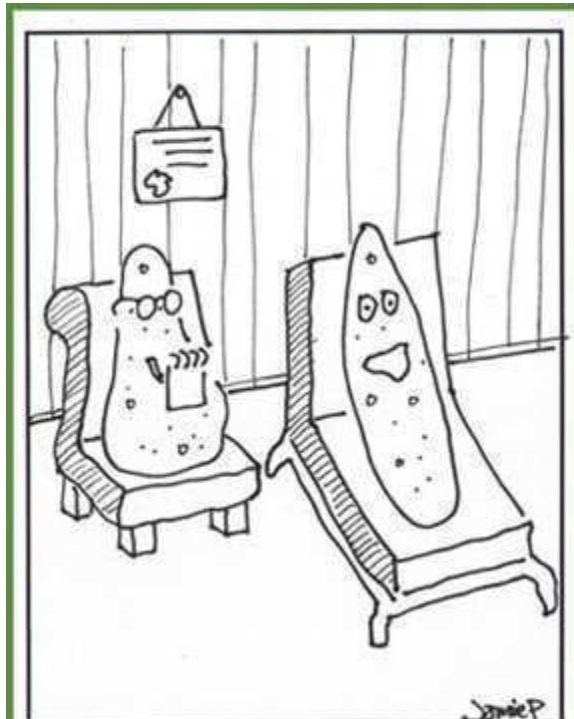
Florencia Malamud

Director: Adrián A. Vojnov

Consejero de estudios: Dra Angeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Instituto Dr Cesar Milstein

Febrero, 2011



I just can't go with the flow anymore.
I've been thinking about joining a biofilm.

This Slime Smile created by Jamie Pennington

Gracias...

A Adrián, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo. Por siempre estar abierto a escuchar –y considerar- nuevas teorías delirantes. Por ser tan buen tipo.

A la gente de la Fundación, por nunca dejar que este trabajo se tornara monótono y aburrido.

A mis compañeros del labo. A Vale, por estar (como yo) totalmente de la cabeza, y porque siempre me alegra el día. A Eleo, por nuestras largas charlas adentro y afuera del trabajo. A Pablo, por orientarme y enseñarme sobre todo al principio, cuando no tenía idea ni de dónde estaban las enzimas. A Luciano, porque también me ayudó con los experimentos y hasta el final, escribiendo la tesis a la par.

A la gente de Campomar. Quiero agradecer especialmente a Ángeles, Diana, Fer, Daniela y Nico, que siempre estuvieron dispuestos a prestarme atención y lugar. También a la gente del laboratorio del Dr. Goldbaum, que durante muchos años me acompañaron. En particular a Gastón, a Paula y muy especialmente a Hernán, que sin su ayuda esta tesis nunca habría existido.

A Brasil y su gente, especialmente al Dr. Alexandre Do Amaral, que me abrió su laboratorio para poder realizar una importante parte de los experimentos aquí descritos. A Rafael que me ayudó siempre y que hizo mi estadía en Brasil más llevadera.

A mis papas, por tanto, que cualquier especificación quedaría chica.

A Federico, por su empeño en entrar a mi vida tan oportunamente.

A Tata, por mimarme cuatro difíciles meses en su casa, sin chistar.

A Donata, que me acompañó largos días de encierro sin (o casi sin) quejarse.

A mis amigas de toda la vida, por 27 años más (por lo menos). A Guri y a Valen, mis vecinas lindas, por los ratos de ocio.

A esta facultad.

Trabajos publicados:

***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development.**

Malamud F, Torres PS, Roeschlin R, Rigano LA, Enrique R, Bonomi H, Castagnaro AP, Marano MR, Vojnov A. **Microbiology**. 2010 Nov 25. PMID: 21109564

Trabajos enviados:

Characterization of the Two Type II Secretion Systems in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and Their Effect on Pathogenicity, Enzyme Secretion, and Biofilm Formation.

Rafael A. Homem, Marcos A. Machado, **Florencia Malamud**, Juliana C. Baptista, Adrian A. Vojnov, Alexandre M. do Amaral

Bases moleculares del desarrollo de “biofilms” en *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* y su rol en el proceso infectivo.

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (*Xac*) es el agente causal de la cancrrosis de los cítricos, una enfermedad endémica en nuestro país. *Xac* es capaz de desarrollar biofilms *in vitro* y sobre hojas, propiedad importante para el desarrollo de esta enfermedad. En esta tesis se buscaron nuevos genes involucrados tanto en la adhesión como en el desarrollo del biofilm. Para esto, se realizaron mutantes en genes candidatos y se utilizó una biblioteca de mutantes generadas al azar.

Mediante mutagénesis dirigida se estudiaron los roles del flagelo, de la adhesina FhaB y de los dos sistemas de secreción de tipo II presentes en la bacteria. Todas las mutantes deficientes en estos sistemas tuvieron problemas en la adhesión *in vitro*. Se observó que las bacterias mutantes en el gen que codifica para las proteínas que conforman el gancho flagelar además presentaron dificultades en el desarrollo del biofilm *in vivo* y deficiencias en la patogenicidad.

A través de la realización de un *screening* donde se utilizó una colección de mutantes generadas al azar, mediante la inserción del transposón Tn5, se encontraron genes cuya participación en el desarrollo del biofilm de *Xac* ya se conocía: *gumB* (codifica para una proteína involucrada en la exportación del xantano), *xcsD* (codifica para la proteína D del sistema de secreción de tipo II *xcs*), *xpsD* (codifica para la proteína D del sistema de secreción de tipo II *xps*). También se encontraron nuevos genes implicados en la adhesión de esta bacteria, algunas de estas mutantes presentaron además una importante disminución en su patogenicidad.

Se siguió caracterizando en mayor profundidad a una de ellas. La mutante posee una inserción en el gen *hrpM*, que codifica una glucosiltransferasa implicada en la síntesis de glucanos lineales, de acuerdo a lo que se conoce en otras bacterias. Se observó que esta mutante tiene disminuida su patogenicidad y además es incapaz de sintetizar glucanos cíclicos.

Palabras claves: *Xanthomonas*, biofilm, flagelo, adhesión, *screening*.

Molecular basis for the development of "biofilms" in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* and its role in the infection process.

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (Xac) is the causative agent of citrus canker. This disease is endemic in our country and it attacks different types of cultivars. Xac is able to develop biofilms *in vitro* and on leaves, a very important property for the development of the disease.

In this thesis we look for new genes that were involved in adhesion and biofilm formation. For this, both a generation of mutants in candidate genes and a library of randomly generated mutants were used.

By directed mutagenesis of candidate genes the roles of flagellar proteins, FhaB adhesin, and two proteins of the two type II secretion systems present in Xac were studied. All these defective mutants had problems with adhesion *in vitro*. Bacteria lacking the gene coding for the flagellar hook also had problems in the development of biofilm *in vivo* and was also deficient in pathogenicity.

With the aim of finding new genes implicated in the biofilm formation a library of mutants was generated using a Tn5 transposon and tested. Some of the mutants found here were previously known as deficient in adhesion: *gumB* (polysaccharide export outer membrane protein), *xcsD* (type II secretion system protein D), *xpsD* (general secretion pathway protein D). New genes implicated in adhesion were also found, some of these mutants were also severely impaired in the development of canker disease.

We continue with the characterization of one mutants. The mutant has an insertion in the *hrpM* gene, implicated in the elaboration of lineal glucans. We observe that this mutant was impaired in canker development. The synthesis of cyclic glucan was also affected.

Key words: Xanthomonas, biofilm, flagellum, adhesion, screening.

ÍNDICE

Introducción	1
1. La cancrrosis: una enfermedad cuarentenaria	1
2. <i>Xanthomonas</i> spp.	4
3. Interacción planta-patógeno y factores de virulencia	7
Factores de virulencia: infección del hospedador	8
<i>Toxinas</i>	9
<i>Sistemas de secreción</i>	9
<i>Exopolisacáridos</i>	12
<i>Glucanos</i>	13
<i>Apéndices que favorecen la movilidad y la adhesión</i>	14
<i>Flagelo</i>	14
<i>Adhesinas</i>	16
Defensa de la planta	16
4) Biofilms bacterianos: Antecedentes, desarrollo y características	18
Regulación de la formación del biofilm	21
Biofilm en <i>Xanthomonas</i> spp.	22
Objetivos	25
Materiales y Métodos	26
<i>Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados</i>	26
<i>Medios, condiciones de cultivo y conservación de cepas</i>	29
<i>Preparación de bacterias electrocompetentes</i>	31
<i>Transformación de células electrocompetentes</i>	31
<i>Construcción de una biblioteca de mutantes en Xac</i>	32
<i>Técnicas de manejo de ADN</i>	32
Preparación de ADN genómico	32
Preparación de ADN plasmídico	33
Preparación de ARN y síntesis de ADNc	34
Amplificación de secuencias mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	34
Colony-PCR	35

Geles de agarosa	35
<i>Determinación del sitio de inserción del transposón en el genoma de las mutantes defectivas en la adhesión</i>	35
<i>Southern blot, marcación de la sonda, pre-hibridación e hibridación de ácidos nucleicos</i>	37
<i>Procedimientos generales</i>	38
<i>Secuenciación de ADN y análisis de secuencias</i>	438
<i>Obtención de mutantes dirigidas</i>	38
Mutante por delección: <i>fliC</i> , gen que codifica la flagelina	38
Mutantes por inserción:	39
<i>flgE</i> , gen que codifica para el gancho flagelar	39
Complementación de las mutantes	40
Mutagénesis de una adhesina: <i>fhaB</i>	40
<i>Ensayos de adhesión y tinción con cristal violeta</i>	41
<i>Ensayos de microscopia laser confocal in vitro</i>	42
<i>Ensayos de microscopia laser confocal in vivo</i>	42
<i>Ensayo de la población bacteriana en la hoja</i>	43
Cuantificación del número total de bacterias en la hoja	43
Cuantificación del número de canchales	43
<i>Ensayos de movilidad</i>	43
Swimming	43
Movimiento independiente de flagelo (sliding)	43
<i>Ensayos de producción de enzimas extracelulares</i>	43
<i>Ensayos de supervivencia al peróxido de hidrógeno (H₂O₂)</i>	44
<i>Extracción del exopolisacárido (EPS)</i>	45
<i>Extracción de los glucanos cíclicos y cromatografía en capa delgada</i>	45
<i>Tinción del flagelo con cristal violeta</i>	45
<i>Condiciones de crecimiento e infección de Cítricos</i>	46
<i>Material vegetal e inoculaciones</i>	46
Resultados	47
<i>Capítulo I: Estudio de las implicancias de estructuras celulares externas de Xac en el desarrollo del biofilm mediante genética directa.</i>	47

1) Estudio del biofilm formado por las bacterias del género <i>Xanthomonas</i> spp.	48
A) Factores ambientales que afectan la formación del biofilm <i>in vitro</i> en <i>Xanthomonas</i> spp.	48
B) Etapas caracterizadas del desarrollo del biofilm de <i>Xac</i> .	51
2) La importancia del flagelo en el desarrollo del biofilm de <i>Xac</i>	55
A) Construcción de mutantes en genes flagelares.	55
B) Rol del flagelo en la movilidad	56
C) Participación del flagelo en la adhesión <i>in vitro</i>	61
D) Rol del flagelo durante el desarrollo del biofilm	62
E) El flagelo está involucrado en la maduración del biofilm sobre la superficie de las hojas y es requerido parcialmente en el crecimiento bacteriano y en el desarrollo de canchales	66
3) La adhesina filamentosa FhaB	67
A) Adhesión a sustratos <i>in vitro</i>	68
B) Desarrollo del biofilm de la mutante <i>fhaB</i>	69
Capítulo II: Genes relacionados con la síntesis del sistema de secreción de tipo II y su rol en la formación del biofilm de <i>Xac</i>	71
1) Funciones de los sistemas de secreción de tipo II	72
2) Participación del T2S en la adhesión <i>in vitro</i>	75
3) Desarrollo del biofilm en las mutantes del T2S	76
Capítulo III: Búsqueda y análisis de nuevos genes implicados en el biofilm de <i>Xac</i>	77
1) Búsqueda de nuevos genes relacionados con el biofilm de <i>Xac</i>	78
A) Construcción de la biblioteca de mutantes	78
B) Método de screening	79
C) Determinación de las secuencias flanqueantes a la inserción del Tn5	83
2) Caracterización de las mutantes obtenidas: Patogenicidad de las cepas deficientes en la adhesión	87
3) Caracterización de las mutantes cuyo Tn5 se insertó en secuencias que codifican proteínas hipotéticas.	90
A) Patogenicidad de las mutantes en proteínas hipotéticas	90
B) Síntesis del exopolisacárido (EPS) y resistencia al H ₂ O ₂	92
C) Movilidad	95

4) Importancia de la proteína HrpM en el biofilm y la patogenicidad de <i>Xac</i>	97
A) Producción de glucanos cíclicos	97
B) Importancia de los glucanos en la patogenicidad	98
3) Producción de factores de virulencia en la mutante <i>hrpM</i>	100
Discusión	104
Bibliografía	115

INTRODUCCIÓN

1. La cancrrosis, una enfermedad cuarentenaria

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (*Xac*) es una bacteria gram negativa responsable de la enfermedad conocida como cancrrosis de los cítricos. Aunque no se tienen datos exactos sobre su origen, se cree que proviene del sudeste asiático y luego se distribuyó en el resto de los continentes. En América, esta enfermedad fue introducida por primera vez en viveros de Estados Unidos a través de plantas jóvenes provenientes de Japón (1).

Los primeros antecedentes de su presencia en nuestro país datan de la década del '20. Esta primera aparición se dio por un tipo de bacteria poco agresiva (*Xac* B) que se mantuvo presente solamente en plantas de limón y confinada a una pequeña región. Unos 50 años más tarde desapareció a causa de la introducción de otro tipo de *Xac* mucho más agresivo, el tipo A, que ya estaba presente en Brasil y en Paraguay. En los años '90 se la empezó a considerar como una enfermedad endémica en el litoral (2). Los países que la padecen suelen tomar medidas muy drásticas para combatirla. En Brasil, se destruyen todos los árboles que se encuentran dentro de un radio de 30 metros del infectado. Las medidas de erradicación fueron poco exitosas y no lograron impedir que la enfermedad se extienda hacia nuevos lugares (3).

Al tratarse de una enfermedad tan difícil de combatir, los países libres de cancrrosis establecieron duras restricciones en cuanto a la importación de productos citrícolas ya que esta enfermedad ocasiona pérdidas millonarias. En el estado de Florida se vienen invirtiendo cerca de 100 millones de dólares, desde el año 1998, con el objetivo de erradicarla (4).

En Argentina la actividad citrícola se encuentra muy desarrollada. En el año 2008, se produjo 2959 mil toneladas de frutas cítricas frescas posicionándola, de esta manera, en el séptimo lugar a nivel mundial detrás de China, Brasil, Estados Unidos, México, España e Italia (5). De esta cantidad total, la producción de limones representa el 20,56%. Por otro lado, Argentina exporta 396 mil toneladas de limones, esto constituye el 26,71% de la producción mundial. Tucumán es la provincia con mayor producción; posee 35.700 hectáreas de un total de 43.844 plantadas en nuestro país (5). Se estima que en su totalidad esta actividad proporciona anualmente trabajo a unas 100.000 personas (5).

Las dos zonas más importantes de la producción citrícola son 1) el noroeste (NOA), donde principalmente se cultivan limones, pomelos y naranjas, y 2) el noreste

(NEA) donde los cultivos mayoritarios son los de naranjas y mandarinas. También hay cultivares de naranjas en la provincia de Buenos Aires y de pomelo en el Chaco (Figura 1).



Figura 1: Principales zonas de producción cítrica en la Argentina. Imagen tomada del informe 2008 de federcitrus (5).

Al tratarse de una enfermedad cuarentenaria (esto significa que no se encuentra en el país de destino y presenta una amenaza a los cultivares sanos del mismo), la cancrrosis está sujeta a medidas fitosanitarias internacionales. Ello restringe el mercado del cítrico que proviene de las áreas afectadas (6), produciendo grandes pérdidas económicas para los países productores. A raíz de las fuertes trabas que limitan la exportación hacia países libres de cancrrosis, se desarrollan continuamente nuevos métodos para la detección de la bacteria que ocasiona tantos perjuicios (6).

Para poder exportar a la Unión Europea las frutas deben provenir de cultivares con sanidad controlada, que apliquen las siguientes estrategias:

- Implantación de cortinas rompe viento alrededor de los lotes;
- Manejo biológico y químico del minador de las hojas;
- Poda del tejido afectado;
- Saneamiento y monitoreo durante la estación de crecimiento y antes de la cosecha;

- Pulverizaciones con productos cúpricos aplicadas a las brotaciones en estado susceptible (10-14 días de edad) y a los frutos en desarrollo cada 40 días (2).

Los síntomas de la enfermedad se caracterizan por presentar una región necrótica rodeada por una zona clorótica, amarilla y de aspecto oleosa (Figura 2) (7).



Figura 2: Hoja de pomelo y limones mostrando síntomas de cancrisis. Las lesiones poseen una zona clorótica alrededor.(8)

Otras enfermedades bacterianas muy importantes que afectan la producción de cítricos alrededor del mundo son: la clorosis de los cítricos y el huanglongbing causadas por *Xylella fastidiosa* y *Candidatus Liberibacter asiaticus*, respectivamente (9). En ambos casos, y a diferencia de *Xac*, las citadas bacterias necesitan de un vector para poder moverse de una planta a otra. La enfermedad de huanglongbing es una de las enfermedades más graves que afectan a la actividad citrícola a nivel mundial. En América del sur se la detectó por primera vez en Brasil, en el estado de San Pablo, en el año 2004 y se diseminó rápidamente por el resto del país (10). La Argentina, se encuentra hasta el momento, libre de esta peligrosa enfermedad. Las campañas de prevención son muy importantes ya que el insecto vector (*Diaphorina citri*) se encuentra presente en nuestro país.

2. *Xanthomonas spp*

Las bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas spp* son gram negativas, con forma de bastón, se las puede encontrar solas, de a pares o constituyendo cadenas. La mayoría de ellas poseen un pigmento amarillo insoluble en agua, la xanthomonadina, del cual proviene su nombre (Figura 3). Aquellas *Xanthomonas* que son móviles poseen una estructura flagelar que se encuentra en uno de los polos de las células. Estas bacterias son patógenas de plantas y se encuentran ampliamente distribuidas. Causan una variedad de síntomas que abarcan la necrosis, gomosis y enfermedades vasculares o parenquimáticas en hojas, tallos o frutos, produciendo bajas considerables en los rendimientos de los cultivares infectados (11).

El género *Xanthomonas* pertenece a la subdivisión gama de las proteobacterias, utilizando marcadores moleculares como rep-PCR y AFLP se eligieron regiones intergénicas de los genes ribosomales del 16s y del 23s para generar el árbol filogenético actual (12). Se distinguen 20 especies dentro de las cuales se encuentran 80 patovares. Estas bacterias atacan a más de 400 especies de plantas, tanto mono como dicotiledóneas mostrando especificidad por los distintos tejidos. El rango de hospedadores de cada patovariedad está limitado a una o pocas especies o géneros dentro de una familia vegetal (si bien puede ser más amplio debido al poco conocimiento de la interacción con plantas sin importancia comercial), y éstos dan el nombre al patógeno (11).



Figura 3: Aspecto característico de las cepas del género *Xanthomonas*. El color amarillo proviene del pigmento xanthomonadina, el aspecto mucoso de las colonias se debe a la producción del xantano.

Dentro de las especies conocidas de *Xanthomonas* se encuentra *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*). Esta bacteria es el agente causal de la enfermedad de la putrefacción negra de las crucíferas, que se transmite vía infección de novo o por semilla. Se encuentra ampliamente distribuida en los cultivares de América, Europa y Asia y dentro de la especie de *Xanthomonas* se trata del organismo más estudiado.

Esta bacteria es utilizada como productora de xantano, un exopolisacárido de alto peso molecular que sirve en diversas industrias como espesante (Tabla 1). Mediante la fermentación de azúcares simples como glucosa o fructosa, *Xcc* produce el xantano. En la industria de la alimentación se lo utiliza sobretodo en salsas y aderezos, ayuda a prevenir la separación de la fase oleosa mediante la estabilización de la emulsión. También es usado en las industrias del petróleo y de los cosméticos.

Aplicaciones industriales	Aplicación en alimentos y farmacia
En abrasivos (Controla la viscosidad)	Cerveza (estabilizados de la espuma)
Explosivos (agente gelificante)	Queso (inhibidor de la sinéresis)
Fluidos de control de fuego (estabilizador de espumas)	Helado (estabilizador, control de la cristalización)
Clarificación del agua (floculante)	Jugos de frutas (suspensión)
Aceite de lodo de perforación (control de la viscosidad)	Farmacéutica (retarda la liberación de la droga)
Tintura textil (pseudo-plasticidad)	Salsa para ensaladas (agente de emulsión)

Tabla 1: Ejemplos de la aplicación del xantano en la industria farmacéutica, industrial y de alimentación.

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (*Xac*) es otra de las especies que forman parte de este género y que ocasiona pérdidas comerciales muy importantes. Como se mencionó antes, esta bacteria produce la enfermedad cancrrosis de los cítricos. Existen diferentes cepas de *Xac* capaces de generar síntomas muy parecidos. La cancrrosis de tipo A, que se encuentra más difundida, es así mismo la más dañina y se la conoce como la cepa asiática, la B y la C, son también conocidas como *Xanthomonas aurantifolia* pv. *aurantifolia* (12). Estas últimas infectan solamente limones y limas respectivamente.

En el año 2002 un consorcio brasilero secuenció el genoma de *Xac* (la cepa 306), de tipo A, que es la más difundida en Brasil (13), este hecho facilitó la búsqueda de nuevos factores de virulencia. La bacteria posee un cromosoma circular de 5,17 Kb y dos plásmidos pXac64 (0,64 kb) y pXac33 (0,33 Kb).

Xac puede propagarse a través de lesiones de hojas, tallos y frutas. Cuando hay humedad, las lesiones supuran y las bacterias salen al exterior dispersándose a otros tejidos no infectados (Figura 4). El agua de lluvia proveniente de regiones cercanas a las lesiones contiene aproximadamente entre 10^5 y 10^8 CFU/ml (14). La lluvia, movida por el viento, es la manera natural que esta bacteria utiliza para dispersarse. El viento ayuda a que las gotas de agua que contienen las bacterias penetren a través de los estomas o lastimaduras ocasionadas por espinas e insectos tales como el minador asiático. Por otra parte en nuestro país se detectaron bacterias a 32 metros de distancia de árboles infectados (15). Haciendo que esta enfermedad sea muy difícil de controlar y erradicar.

Las bacterias se multiplican a medida que las lesiones se siguen expandiendo esto se encuentra relacionado con la susceptibilidad de la planta huésped (16).

Todos los tejidos de la planta que se encuentran en la superficie son susceptibles a *Xac* cuando son jóvenes (16). Los primeros síntomas en las hojas son unas lesiones pequeñas, ligeramente en relieve, similares a unas burbujas, éstas aparecen generalmente alrededor de la primera semana post infección. La temperatura óptima para que ocurra la infección ronda entre los 25 y 30 grados (17). A medida que la lesión va madurando empieza a cambiar de color, se va oscureciendo, al mismo tiempo aparece alrededor un borde con aspecto acuoso y una región clorótica que rodea todo. Ya al final del proceso este borde desaparece, el centro de la lesión se eleva y toma un aspecto de corcho (7). Las hojas comienzan a caerse, y la defoliación de las plantas infectadas comienza a ser un problema grave (18).

Esta bacteria se encuentra principalmente en regiones tropicales y subtropicales, aunque también puede estar presente en zonas más secas (18).

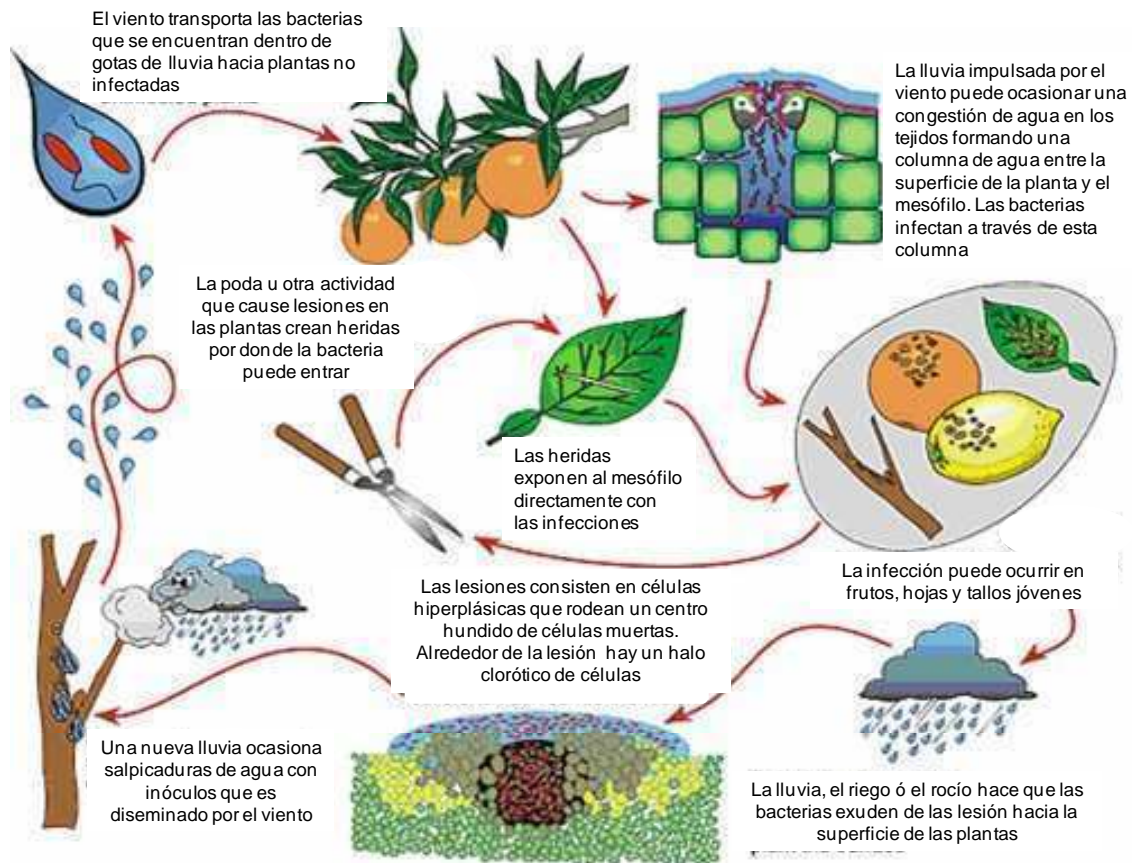


Figura 4: Ciclo de la cancrrosis. Esquema obtenido de Tim R. Gottwald Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact (8).

3. Interacción planta-patógeno y factores de virulencia

Las **interacciones** entre plantas y bacterias pueden subdividirse en 3 clases: **simbióticas**, **asociativas** y **patogénicas** (19). En los dos primeros tipos, ambos organismos se ven beneficiados por la presencia del otro, en cambio, cuando se trata de una asociación patogénica sólo se ve favorecida la bacteria.

Las **bacterias fitopatógenas** se pueden clasificar en tres grandes grupos según el nicho ocupado: 1) hojas/filósfera, es el espacio inmediatamente adyacente a la hoja que se encuentra influenciado por ésta; 2) rizósfera, región inmediata a las raíces en la tierra; 3) sistema vascular interno (xilema y floema) (20).

Las bacterias fitopatógenas, en su mayoría son gram negativas, siendo los géneros más importantes los siguientes:

Erwinia spp

Pseudomonas spp

Xanthomonas spp

Las únicas Gram positivas son las bacterias que pertenecen al género:

Clavibacter spp

La comunidad microbiana de las hojas es muy diversa, incluye no solo diferentes géneros de bacterias, sino también hongos filamentosos, algas, etc. De todos estos organismos, las bacterias (patógenas y no patógenas) son las más abundantes (21). Las bacterias capaces de sobrevivir en las hojas son también conocidas como **epifíticas**, estos organismos sobreviven y se multiplican en su superficie, al menos en un primer lugar (20). La población bacteriana varía mucho en tamaño durante las diferentes épocas del año, influenciada por la existencia de fluctuaciones en las condiciones físicas y nutricionales de la filósfera (22).

La superficie de las hojas es un ambiente hostil, expuesto a cambios de temperatura, de humedad relativa y a grandes cantidades de radiación UV, además de ser un ambiente pobre en nutrientes. Se cree que la presencia de ciertos sustratos estaría limitando la existencia de algunas bacterias (23). Estudios donde se utilizó microscopía electrónica de barrido mostraron que las bacterias tienen preferencias al momento de colonizar una región, por ejemplo la base de los tricomas, (24, 25), los estomas (30), los hidatodos y las uniones de las células que conforman la pared de la epidermis (26). Por otro lado la superficie de la hoja donde hay mayor cantidad de bacterias es la inferior; (20) posiblemente esto se deba a la mayor concentración de estomas y tricomas y a que la capa de cutícula es más fina de este lado.

Para poder sobrevivir, las bacterias fitopatógenas desarrollaron dos tipos de estrategias. Luego de ser transportadas hacia una nueva superficie de la hoja 1) Algunas entran por aperturas naturales hacia su interior. 2) Otras, tratan de modificar el ambiente local para aumentar la disponibilidad de nutrientes. En ambos casos tienen que ser capaces de adherirse a la superficie de las plantas, invadir el espacio intercelular, adquirir los nutrientes necesarios y protegerse del sistema de defensa vegetal. Para lograr todo esto poseen diferentes tipos de factores de virulencia.

Factores de virulencia: Infección del hospedador

Existen distintos y muy variados factores de virulencia que permiten a las bacterias colonizar a sus hospedadores. Dentro de lo que es un factor de virulencia se encuentran:

- Toxinas (endo y exo)

- Enzimas hidrolíticas que contribuyen a su patogenicidad liberadas por distintos sistemas de secreción,
- Proteínas y carbohidratos que protegen a las bacterias de la defensa de sus hospedadores,
- Apéndices que favorecen la movilidad,
- Proteínas de superficie que median la adhesión, etc.

Toxinas

Son sustancias tóxicas para el hospedador que pueden ser secretadas por las bacterias. Un ejemplo de una toxina secretada es la siringomicina. Esta sustancia es producida por las bacterias *Pseudomonas syringiae* pv. *syringiae* y afecta el transporte de los iones a través de la membrana de las células vegetales, alterando la liberación de metabolitos (27). Esta molécula también actúa como un poderoso surfactante, facilitando la movilidad de la bacteria sobre la cutícula de la hoja (27).

Otro tipo de toxinas no necesitan ser liberadas, a estas se las conoce como endotoxina, el LPS es un ejemplo (28). En este caso la concentración necesaria para causar daño a la célula hospedadora es mayor que para una exotoxina (28).

Sistemas de secreción

Durante la interacción entre bacterias y organismos eucariotas los sistemas de secreción bacterianos cumplen una importante función liberando compuestos al medio extracelular. De esta manera el patógeno logra modificar el entorno a su favor liberando por ejemplo, en el caso de las bacterias fitopatógenas, enzimas que degradan la pared de la célula vegetal.

Hasta el momento se describieron 8 sistemas de secreción en bacterias gram negativas (29). *Xanthomonas* spp posee al menos 6 de ellos, ver figura 5 (30).

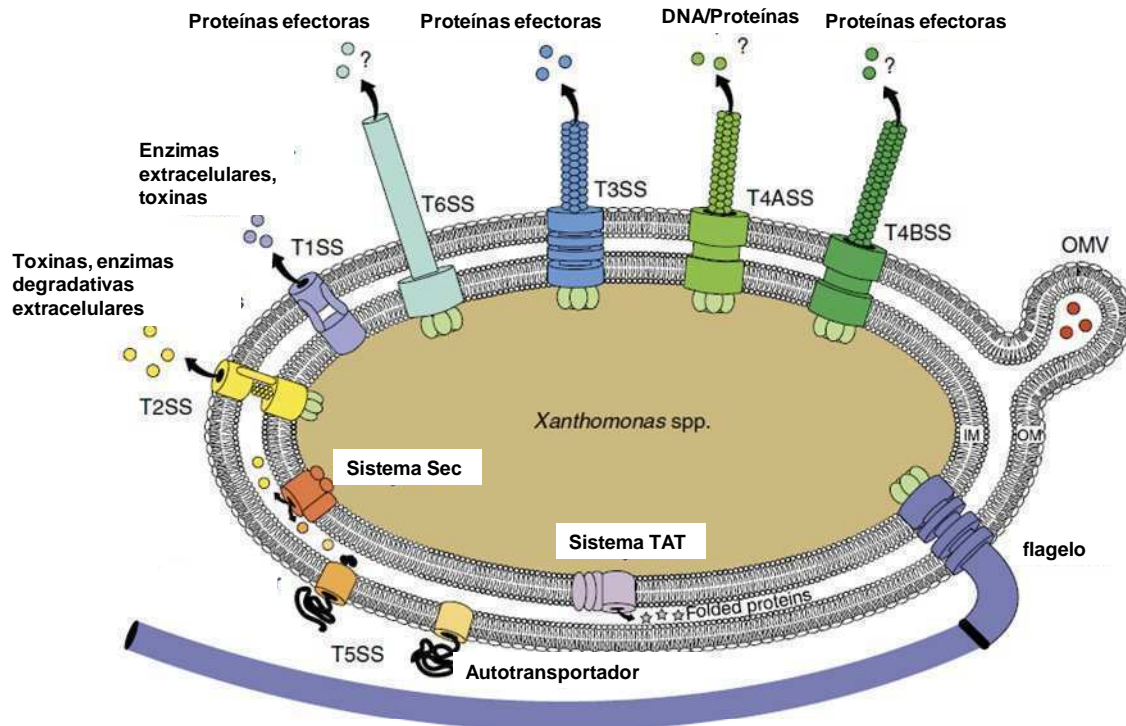


Figura 5: Esquema de los sistemas de secreción en bacterias del género *Xanthomonas*.

T2SS y T5SS dependen del sistema Sec o TAT para transportar las proteínas a través de la membrana interna. Los sistemas T3SS, T4SS y T6SS se encuentran asociados a estructuras extracelulares de tipo pili y posiblemente translocan proteínas al interior de las células del hospedador (30).

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) se encuentra muy conservado en patógenos de plantas y animales. Se encuentra exclusivamente en bacterias Gram negativas. (18, 22, 28, 49). Este sistema inyecta proteínas efectoras directamente al interior de las células eucariotas (Fig. 6) (31). La mayoría de las funciones de estos efectores todavía no se conoce, pero se vio que existe un alto grado de conservación entre los T3SS de diferentes bacterias (32).

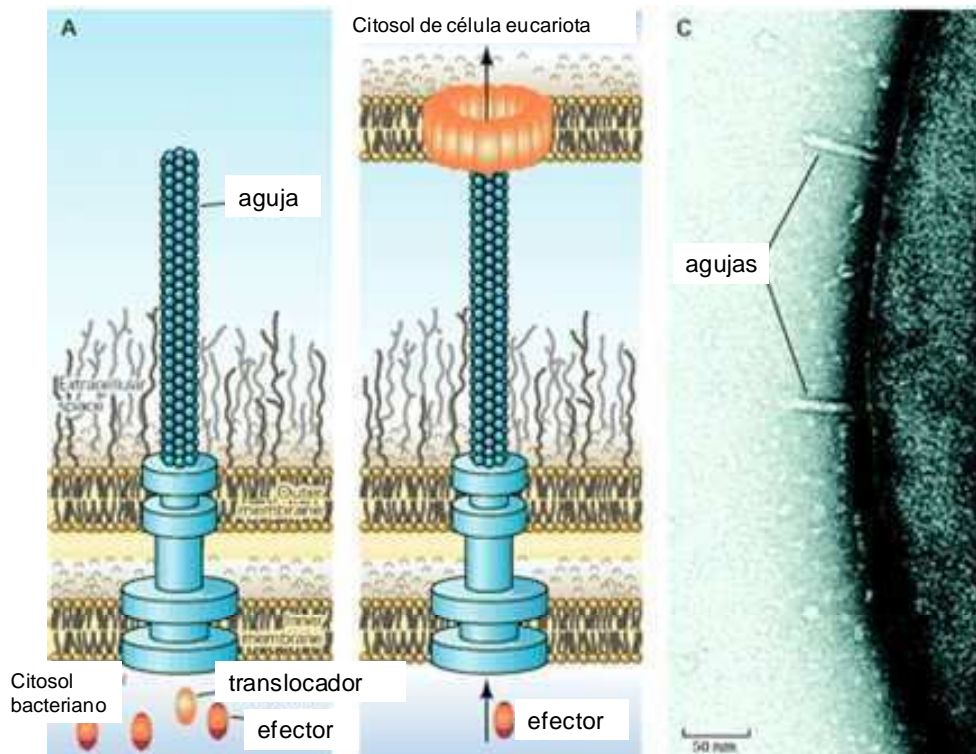


Figura 6: Sistema de secreción de tipo III, T3SS. Las bacterias inyectan a las proteínas efectoras en el interior de las células eucariotas. Todavía se desconoce cómo es que la bacteria sabe cuál es el momento exacto para realizar esto (33).

Se sabe que en *Xanthomonas* el T3SS inyecta alrededor de 25 proteínas con secuencias características en el N-terminal (33). Algunos de los efectores se los denominan proteínas avirulentas, *avr*, reconocidas en plantas resistentes por los receptores R. Este reconocimiento dispara las reacciones de defensa de la planta que a menudo culminan en la respuesta de hipersensibilidad, HR (32). Este sistema está compuesto por alrededor de 30 proteínas. Algunas de las proteínas que forman parte del T3SS también están involucradas en el flagelo. Se postula que debe existir cierta coordinación en cuanto al ensamblado y a la función de ambos sistemas (34).

Otro sistema de gran interés en *Xanthomonas* es el sistema de secreción tipo II, (T2SS), ver figura 7. El mismo, tiene la particularidad de secretar al medio proteínas completamente plegadas, dentro de las cuales se incluyen: proteasas, celulasas, peptidasas, fosfolipasas, lipasas y toxinas (35). En general estas proteínas están asociadas a la destrucción de diversos tejidos contribuyendo al deterioro y muerte celular (36). Las proteínas son secretadas en dos pasos, en un primer lugar, son translocadas hacia el periplasma de manera dependiente del sistema Sec o Tat y una vez allí los péptidos se pliegan, adquiriendo su estructura tridimensional correspondiente, y se secretan a través de la membrana externa hacia el medio

extracelular (37); (38). Este sistema es extremadamente importante para causar enfermedad tanto en humanos (39) como en plantas, (40).

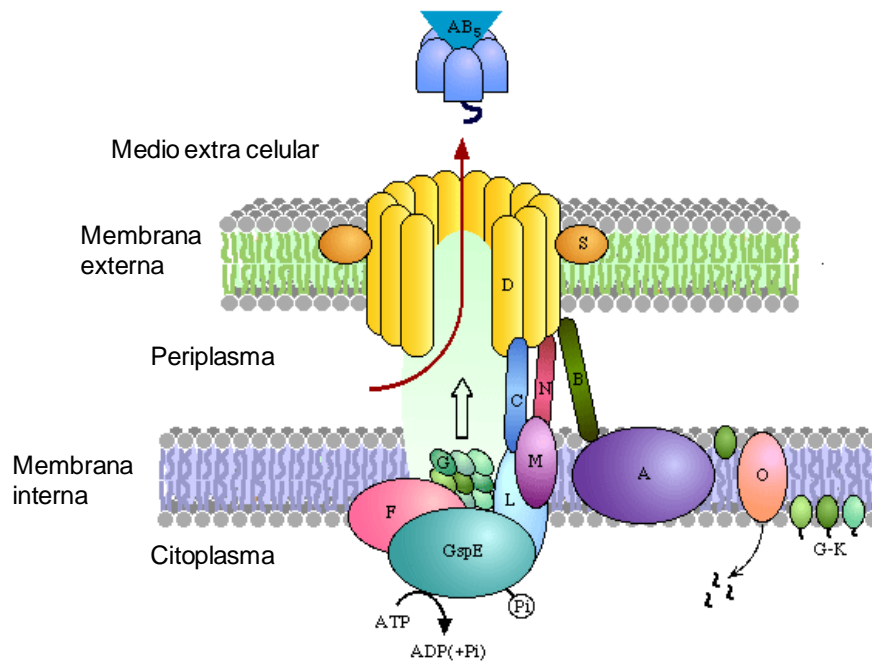


Figura 7: Sistema de secreción de tipo II, T2SS. La liberación de las proteínas al medio es un proceso de dos pasos. Primero el sistema Sec reconoce las señales en el N-terminal luego las transloca hacia el espacio periplásmico, se remueve el péptido señal, la proteína adquiere su estructura y luego es liberada al medio exterior. Tomado de la página www.genome.jp/kegg/

El T2SS se encuentra evolutivamente relacionado con el pilus de tipo IV (41) que a su vez se lo relaciona en otros microorganismos con el movimiento twitching (42, 43). Muchas de las proteínas que forman parte de este sistema también se encuentran en el sistema de secreción de tipo II (41). En la bacteria *Xac* se encontraron dos *clusters* de genes que codifican para éste (13).

Resultados obtenidos de estudios en la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* mostraron que existe una interacción funcional entre el T2SS y el T3SS. El primero secreta factores de virulencia muy importantes que despiertan la respuesta de defensa de la planta que luego es suprimida por los efectores liberados por el segundo sistema, el conjunto de ambas acciones es lo que permite que la infección sea exitosa (44).

Exopolisacáridos

Los polisacáridos son constituyentes importantes de la superficie bacteriana y tienen una función destacada en la interacción con los hospedadores. Muchas

bacterias producen exopolisacáridos que pueden ser secretados al medio o pueden quedarse unidos a la superficie de la célula (45).

Xanthomonas spp. produce un exopolisacárido llamado xantano que consiste en secuencias repetidas de un pentasacárido formado por :

Manosa-(β -1,4)-ácido glucurónico-(β -1,2)-manosa- (β -1,3)-celobiosa (46).

La síntesis de estas unidades, su polimerización y finalmente la exportación del xantano requieren de la presencia de un *cluster* de genes denominado *gum*, conformado por 12 genes (*gumB* a *gumM*) (47). Esta agrupación se encuentra altamente conservada en las diferentes especies del género *Xanthomonas*, tanto en su composición, tamaño, orden génico y en la dirección de la transcripción (12). Este compuesto le otorga a las colonias bacterianas del género el aspecto mucoso característico.

Dependiendo del tipo de patógeno, este polímero puede tener diferentes funciones. En bacterias vasculares (como *Xcc* ó *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) su presencia podría estar bloqueando el transporte de agua y sales en el xilema (48). En el caso de las bacterias epifíticas estaría impidiendo la desecación y contribuyendo a la aparición de síntomas (49-51). También se observó que la presencia de xantano suprime la defensa basal de las plantas, como la deposición de calosa en las paredes celulares (52). Además, está altamente relacionado con la capacidad de desarrollar biofilms en *Xac* y *Xcc*, como se describe más adelante (50, 53, 54).

Glucanos

Los glucanos son moléculas osmorreguladoras que se encuentran en el periplasma de todas las bacterias pertenecientes al grupo de las proteobacterias (55). Son sintetizados cuando el ambiente externo es hipo-osmótico (56, 57), evitando así, el ingreso de moléculas de agua hacia el interior de las células. Esto mantiene los niveles intracelulares de K^+ en un umbral mínimo, necesario para el buen funcionamiento de las enzimas (58). Existen muchos trabajos que vinculan a los glucanos con las interacciones entre plantas y bacterias. Se vio que son importantes en bacterias simbiotes: *Bradyrhizobium japonicum* (59) y *Sinorhizobium meliloti* (60) y también en bacterias patógenas: *Agrobacterium tumefaciens* (61), *Pseudomonas syringiae* (62-64), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (65) y *Xcc* (66).

Existen dos tipos de moléculas de glucanos, los lineales y los cíclicos, dentro de los cuales hay 3 variedades diferentes. Se conocen dos familias de genes involucradas en su síntesis: los genes pertenecientes al operon *mdoGH* y los genes *ndvA* y *ndvB* (49). Dentro de los genes que forman parte del operon se encuentra el

gen *mdoH* (también conocido como *hrpM* ó *pogH*) que posee 8 dominios transmembrana en *E.coli* (67). Una hipótesis del funcionamiento de estos dominios propone que estarían formando un canal a través de la membrana para que los glucanos sean translocados desde el citoplasma hacia el periplasma. Se vio que la proteína MdoG es necesaria en la polimerización de estos. La otra familia de genes que sintetizan glucanos es la *ndv*, estos genes fueron encontrados en la bacteria simbiote *Sinorhizobium meliloti*. NdvB es una proteína que se ubica en la membrana citoplasmática y que solamente el 60% de su N-terminal es el que se requiere para la síntesis de glucanos. NdvA es una proteína citoplasmática con secuencia similar a proteínas de la superfamilia de transportadores que unen ATP. Esto la hace una buena candidata para ser la responsable de la translocación de los glucanos hacia el periplasma y, eventualmente hacia el exterior de la bacteria, ya que muchos de estos compuestos también se los encuentran extracelularmente (49).

En *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* una mutante en un gen homólogo a *hrpM* de *Pseudomonas syringae* y a *opgH* de *E.coli* mostró atenuada su virulencia (65). Por otro lado, también se observó que mutantes en el gen *ndvB* en *Xcc* no producen más glucanos cíclicos lo cual conlleva a una pérdida en la capacidad de esta bacteria para provocar enfermedad en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* (60).

Apéndices que favorecen la movilidad y la adhesión

Flagelo

El flagelo es una estructura de superficie que se encuentra en la gran mayoría de las bacterias; su síntesis depende del producto de aproximadamente 50 genes (Figura 8) (68, 69). No es sorprendente entonces que la formación de esta compleja estructura esté regulada por diferentes mecanismos. A nivel de la transcripción existe una jerarquía; de esta manera las proteínas flagelares son sintetizadas únicamente en el momento necesario (68, 70). En las bacterias donde se conoce mejor este proceso, la biogénesis flagelar comienza con la inserción de una proteína de membrana interna llamada FlIF y sobre ella se acomodan las proteínas que forman parte del sistema de secreción de tipo III, este dispositivo exporta todas las subunidades requeridas para formar el cuerpo basal del flagelo. De esta manera se crea un canal por el cual más adelante pasarán las proteínas que conforman el “hook” o gancho (una estructura flexible compuesta por unas 100 subunidades idénticas) y las que conforman el filamento (una estructura con forma de hélice semi-rígida construida a partir de cientos de subunidades repetitivas de flagelina).

Siempre se relacionó al flagelo con la movilidad de las bacterias. Uno de los movimientos que éstas son capaces de realizar utilizando esta estructura es el de **swimming** (del inglés: natación), que les permite trasladarse a través de un ambiente acuoso (124, (71)).

Otro movimiento donde la presencia, dependiendo de la especie bacteriana, del flagelo es fundamental es el de **swarming** (del inglés swarm: enjambre). Aquí las bacterias se encuentran dentro de una colonia creciendo y esparciéndose, para que esto ocurra es necesario algún tipo de comunicación entre ellas.

Existen muchos estudios que relacionan al flagelo con las etapas tempranas del proceso de formación de biofilm. En muchos casos esta estructura posee una función clave; por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* (72), *Escherichia coli* (73) y *Vibrio cholerae* (74, 75). Para diferentes especies estudiadas, distintas estructuras de superficie juegan roles esenciales en esta primera etapa. En la enterobacteria *Escherichia coli* los autores Pratt y Kolter sugieren que el flagelo es una estructura de vital importancia al momento de iniciar el acercamiento con el sustrato; mutantes no móviles fueron incapaces de adherirse (76). Pero no todas las bacterias requieren de los mismos apéndices. Los pili también son importantes para esta primera etapa. Se trata de estructuras retráctiles capaces de adherirse a superficies. En *Pseudomonas aeruginosa* mutantes del pili de tipo IV forman una capa de bacterias como la cepa silvestre, pero son incapaces de formar microcolonias (77).

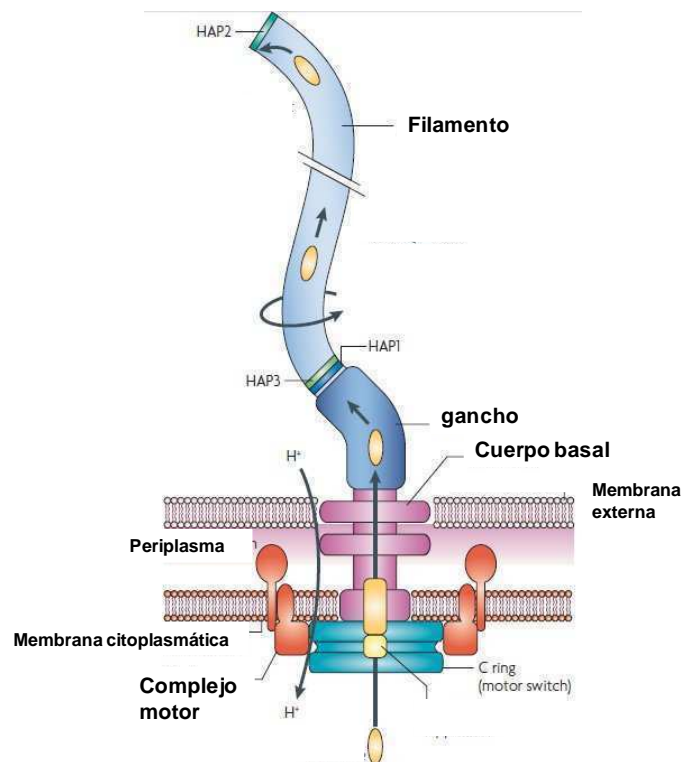


Figura 8: Esquema de un flagelo bacteriano modificado de *The surprisingly diverse ways that prokaryotes move* (71).

Adhesinas

Un paso fundamental para lograr colonizar un ambiente nuevo es lograr adherirse. Las adhesinas bacterianas pueden dividirse en dos tipos: fimbriales y no fimbriales ó afimbriales. Estas últimas están compuestas por un solo tipo de proteínas, mientras que las fimbriales son estructuras multiproteicas (78).

Trabajos realizados en bacterias fitopatógenas relacionan a estas adhesinas con la capacidad de producir enfermedad. En *Xylella fastidiosa*, una bacteria intravascular, mutantes tanto en adhesinas fimbriales como no fimbriales (ó afimbriales) poseen menos capacidad para infectar plantas de uva. Los autores proponen un modelo en donde las adhesinas fimbriales estarían involucradas en la adhesión entre las células, mientras que la afimbriales se ocuparían de la adhesión inicial en las hojas (79). En *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, el agente causal de la enfermedad de la mancha negra en arroz, se estudió el rol de dos adhesinas fimbriales (*xadA*, *xadB*) y dos afimbriales (*yapH* y *pilQ*). Los autores de este trabajo observaron que *xadA* y *xadB* siguen conservando la virulencia si se las inocula sobre heridas, en cambio si esto es realizado en hojas sanas no logran entrar. Estos resultados indican que estas proteínas estarían actuando en la colonización de las hojas del arroz a través de los hidátodos. En cambio, las mutantes afimbriales son menos patógenas que la cepa silvestre cuando se las inocula directamente sobre heridas. Esto indica distintos roles para las diferentes adhesinas (80).

Ya vimos de qué elementos dispone la bacteria para atacar y lograr sobrevivir dentro de sus hospedadores. ¿Cómo se defienden las plantas?

Defensa de la planta

La primera barrera que los patógenos deben sortear es inespecífica y se trata de una barrera física (cutícula, pared celular, etc). Aunque, en muchos casos es efectiva, un gran número de microorganismos logra pasarla. Cuando esto ocurre, la planta pone en marcha un segundo sistema de defensa que se induce una vez que el atacante es reconocido. Los patógenos poseen algunos elementos que les son comunes a todos ellos: los PAMPs (del inglés: pathogen-associated molecular patterns). Dentro de estos se encuentran: la flagelina, las glucoproteínas, los lipopolisacáridos, etc. Las plantas tienen unos receptores que al unirse a estos PAMPs

desencadenan una **respuesta inespecífica**. Las paredes de las células vegetales se engrosan, mediante la deposición de calosa y lignina y se enciende rápidamente la expresión de algunos genes de la planta (81).

Algunos patógenos son capaces de sintetizar e introducir en el interior de las células moléculas efectoras, *avr* (del inglés: avirulence proteins). Éstas tienen como objetivo final el de suprimir la **respuesta inespecífica** desencadenada por los PAMPs. Las moléculas *avr* son reconocidas por unos receptores, las proteínas R, que se encuentran dentro del interior de las células vegetales. Cuando esto ocurre se desencadena una **respuesta específica**, IIE (del inglés effector trigger immunity), que induce una muerte celular programada en el lugar donde intentó entrar el patógeno dejándolo confinado a ese sector de la planta (82). Esta respuesta es conocida como HR ó reacción de hipersensibilidad. Por otro lado, si la célula vegetal no tiene la proteína R adecuada, que reconoce el efector específico o factor de avirulencia (*Avr*), esta reacción no ocurre y la bacteria se disemina por toda la planta, causando enfermedad (83). En la figura 9 se observan las reacciones que se desencadenan una vez que se reconoce a la proteína efectora. La más tempranas, luego del reconocimiento, es el cambio en la permeabilidad de los iones calcio, potasio, cloro y protones. Se acumula el calcio dentro de la célula y además, se forman especies reactivas de oxígeno (como el H_2O_2), etc (84).

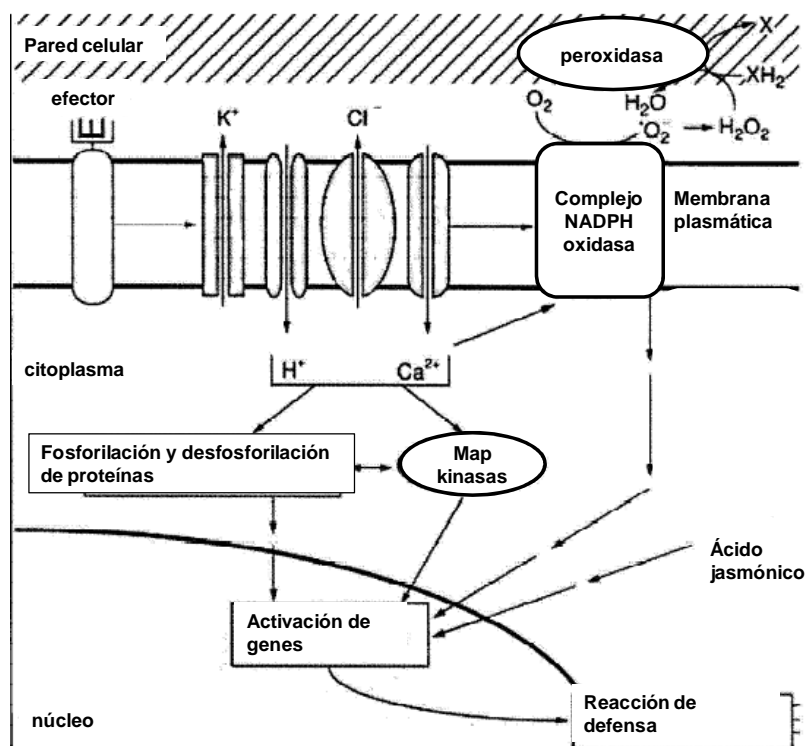


Figura 9: Cascada de reacciones que intervienen ante la presencia de un patógeno (84).

4. Biofilms bacterianos: Antecedentes, desarrollo y características

La microbiología comienza a ser tomada como una disciplina de las ciencias biológicas a mediados del siglo XIX, cuando Luis Pasteur refuta la teoría de la generación espontánea. Desde ese momento los investigadores observan una enorme variedad de microorganismos provenientes de diferentes hábitats. Estos estudios se basan en cultivos puros, donde una especie es cultivada para luego ser estudiada. La mayoría de los conocimientos que se tienen de los microorganismos provienen de este tipo de experimentos, donde las bacterias fueron crecidas en cultivos líquidos (células planctónicas). Recién a partir de la década de los 80 se comienza a observar que en realidad, la mayoría de los microorganismos estudiados se encuentran formando parte de comunidades metabólicamente integradas (85). A estas comunidades se les dio el nombre de biopelículas o *biofilms*. Existen muchas definiciones de lo que es un biofilm. Una de la más completa es la enunciada por Costerton, donde lo define: como una comunidad de microorganismos embebida en una matriz de exopolisacáridos en la cual también se encuentran proteínas y ADN, esto a su vez está adherido a una superficie inerte o a un tejido vivo (86). Al ir estudiándose en mayor profundidad este estilo de vida bacteriano se vio, que se encuentran prácticamente en todos los medios donde existen bacterias, las superficies deben poseer un poco de humedad y un mínimo de nutrientes. Estas pueden ser naturales (rocas, dientes, plantas) o artificiales (catéteres, cañerías) (Fig. 10) (85). Tal es así que actualmente se considera que las bacterias viven casi toda su vida dentro de estas comunidades y, que de vez en cuando, alguna sale para conquistar un nuevo nicho (87).

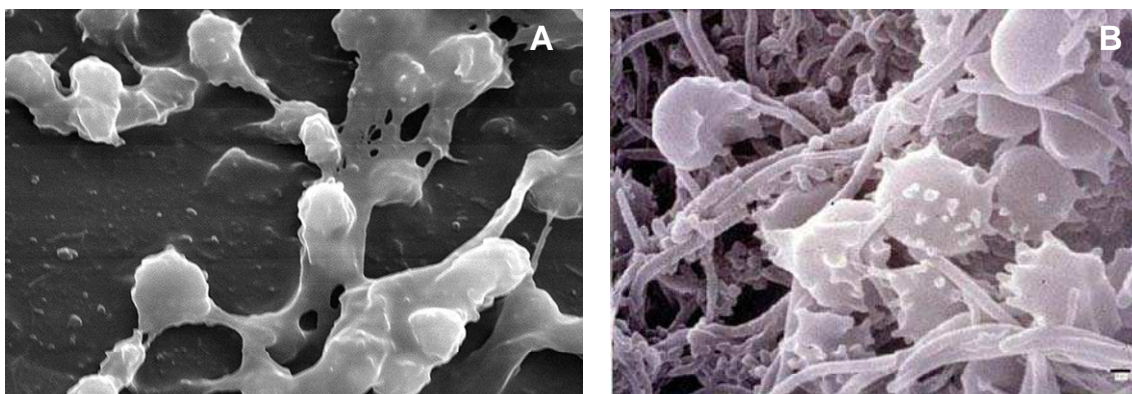


Figura 10: Biofilms encontrados en la naturaleza: A) Micografía electrónica de un Biofilm de *staphylococcus aureus* encontrado en un catéter. **B)** Biofilm en la placa dental.

Los biofilms generalmente contienen una multitud de especies microbianas (88), esta característica proporciona una mayor estabilidad al ecosistema en el

momento de enfrentarse con cambios bruscos del ambiente. Hasta cuando se trata de un biofilm artificial, formado solamente por una especie, se puede observar que existe diversificación funcional. En cambio, cuando las bacterias se encuentran en medios de cultivo líquidos se generan poblaciones homogéneas con células genéticamente idénticas. Es por eso que la fisiología de un microorganismo es muy diferente en ambas situaciones. El mayor problema con el que se enfrenta un investigador al querer estudiar un biofilm es que éste sea reproducible *in vitro* cuando se trabaja con más de una especie de bacterias. Por esta razón hasta el momento casi todos los avances realizados en el estudio de los biofilms abarcan a una sola especie (89).

La mayor cantidad de conocimientos obtenidos en lo que respecta a la genética y fisiología de los biofilms provienen de las bacterias gram negativas: *Pseudomonas spp* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*), *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (90).

Se puede considerar al biofilm como un proceso biológico que abarca distintas etapas: iniciación (donde las células se adhieren a un sustrato), maduración, manutención y disolución. En general estos puntos se mantienen entre las distintas especies estudiadas. Lo que puede variar entre especies de bacteria es: el sustrato donde se adhieren, los requerimientos nutricionales, el tiempo que tarda en madurar la estructura, la composición de la matriz extracelular, etc (91).

Más de tres décadas de estudios permitieron establecer una sucesión de pasos posibles del desarrollo de los biofilms. En la figura 11 se muestra un esquema con las distintas etapas de este proceso.

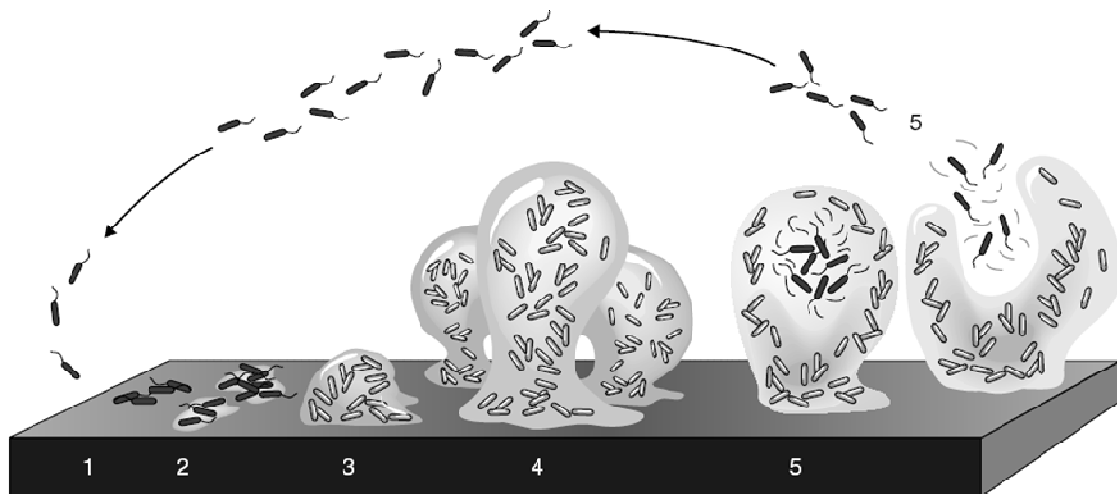


Figura 11: Etapas en la formación de un biofilm bacteriano de la clase de las proteobacterias. Inicio (1) unión débil, unión irreversible (2), formación de microcolonias (3), desarrollo de las macrocolonias (4), biofilm maduro (5). Imagen tomada de Sauer 2003, genome biology (92).

Se cree que el biofilm comienza cuando las bacterias sienten las condiciones ambientales necesarias para que se gatille la transición de una vida libre hacia una vida sésil (93-98). Estas señales no son las mismas en todos los casos, ni un mismo organismo activa una misma vía de señalización cuando se encuentra ante distintos tipos de sustratos. Por ejemplo, el patógeno *Vibrio cholerae*, que vive parte de su ciclo en un ambiente acuoso, puede adherirse a dos tipos de sustratos. Por un lado se puede unir al caparazón de crustáceos y por otro lado también es capaz de adherirse a sustancias inertes. En ambos casos los genes que se expresan son diferentes (99, 100).

Al comienzo, las bacterias se encuentran débilmente adheridas a la superficie pudiendo moverse sobre ella utilizando, dependiendo de la especie de bacteria, estructuras tales como flagelo y pili de tipo IV, esto se pudo observar en la bacteria *P. aeruginosa* (96). Luego esta unión se intensifica y las bacterias comienzan a experimentar cambios en su expresión genética (101, 102). Hay un aumento en la producción de exopolisacáridos (77, 103) y en general se pierden los apéndices utilizados para la movilidad. Comienzan a desarrollarse microcolonias, esto ocurre a partir de por lo menos tres mecanismos diferentes: las células unidas a la superficie se redistribuyen mediante el movimiento de **twitching** (del inglés: contracciones); un segundo mecanismo es el de la división binaria, a medida que las células se van duplicando las hijas se van ubicando de manera tal de formar grupos de células similares a las colonias formadas en placas con agar. Una tercera forma del aumento en tamaño de las microcolonias es a través del reclutamiento de células que se encuentran libres en el medio (104).

Un biofilm maduro se caracteriza por poseer canales de agua por donde pasan los nutrientes y los desechos que utilizan las bacterias que habitan su interior. Las bacterias se organizan en empalizadas alterando sus procesos fisiológicos en respuesta a las condiciones particulares del nicho. Las microcolonias se transforman en macrocolonias y algunas células (de forma individual o en grupo) pueden ser liberadas nuevamente al medio. El desprendimiento activo es un evento fisiológico que se encuentra regulado (105).

En distintos trabajos (90) se postula que la inanición estaría actuando como disparador para que las células se liberen y vayan en busca de nuevos hábitats ricos en nutrientes. Las bacterias liberadas al medio vuelven a poseer las características que tenían antes de formar parte del biofilm, habiéndose encontrado, en estudios congeles de dos dimensiones, que ambos tipos de células compartían patrones proteicos y que diferían del de las bacterias dentro del biofilm (106).

El tiempo que tarda un biofilm en desarrollarse y volverse maduro depende del microorganismo en estudio, del medio y de la superficie utilizada. Una característica en común que poseen todos es la capacidad de secretar una “matriz” que une a las bacterias en un mismo lugar y que sirve como protección contra el ambiente hostil. La manera de fabricar esta matriz varía y depende de las condiciones ambientales ya que puede estar formada por azúcares, proteínas y ácidos nucleicos (89).

Regulación de la formación del biofilm

Muchos estudios demostraron que todo este proceso se encuentra regulado y dirigido por el sistema de sentido propio de las bacterias conocido como quórum sensing. El mismo fue descrito por primera vez en la bacteria *Vibrio fischeri* donde se percibió que al ir aumentando la cantidad de bacterias también aumentaban unas moléculas que se las denominó homoserin lactonas (HSL), induciendo la expresión de un complejo que produce luz. Se encontró que existen dos de estas moléculas autoinductoras, HAI-1, que funciona como señal de comunicación dentro de una misma especie y AI-2 que estaría funcionando en la comunicación entre especies (107).

En *Pseudomonas aeruginosa* también se encontró este complejo y se lo relacionó por primera vez con la formación del biofilm. Mutantes en los genes del quórum produjeron biofilms con un 80 % menos de espesor (108) estas mutantes crecieron paralelamente al sustrato sin mostrar ningún tipo de diferenciación ni de producción de matriz extracelular. También se observó que los genes de quórum tienen un máximo en su expresión en las células que se encuentran localizadas al lado del sustrato (109).

Aunque, en la mayoría de las bacterias estudiadas, se vio que al aumentar la densidad bacteriana aumentan los moléculas de quórum y esto gatilla el desarrollo del biofilm, existen casos, como el de la bacteria *Vibrio cholerae*, en donde el biofilm se empieza a formar con una baja densidad de células (110).

Las bacterias viven en distintos y muy diversos ambientes, esto hace que sus necesidades sean diferentes según el ambiente en donde se encuentren. *Vibrio cholerae* necesita sobrevivir en el medio acuático y dentro del hospedador, así que para cada caso tiene diferentes estrategias.

La primera función que se adjudicó a la molécula señal c-di-GMP (del inglés cyclic-di-GMP) fue en la regulación de la síntesis de celulosa en la bacteria *Acetobacter xylinum* (111) . Luego se encontró que una gran variedad de los comportamientos bacterianos eran regulados por ella, por ejemplo la movilidad y la

formación del biofilm. En el caso de muchas bacterias la acumulación intracelular de esta molécula está relacionada con una vida sésil, en cambio, cuando sus niveles son bajos la vida planctónica es la que predomina (112-116).

El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP, esta reacción es llevada a cabo por enzimas di-guanilato ciclasas que poseen dominios GGDEF (30). Su degradación esta catalizada por fosfodiesterasas con dominios EAL ó HD-GYP (117).

Las bacterias que están asociadas a las plantas también son capaces de formar biofilms. Los ecosistemas que habitan son muy particulares y muy diferentes entre sí. Por un lado se encuentran aquellas bacterias que habitan la rizósfera y por otro lado están las que habitan la filósfera, como es el caso del género *Xanthomonas*.

Biofilm de *Xanthomonas* spp

Los primeros estudios del biofilm en bacterias del género *Xanthomonas* los realizó el grupo de Maxwell Dow. En un trabajo publicado en el año 2003 muestran que las bacterias *Xcc* con mutaciones en los genes *rpfF* y *rpfG* son capaces de formar agregados cuando se los cultiva en un medio rico (L) que contiene NaCl al 0,5% y posee como fuente de carbón, glucosa al 0,1%. Estos genes están involucrados en la síntesis del compuesto DSF (del inglés *diffusible signal factor*), considerado como la molécula señal del sistema de quórum de las bacterias de este género. Al examinar los agregados en un microscopio electrónico de barrido se observó que las bacterias se encontraban dentro de una estructura reticulada formada por matriz extracelular (Fig. 12B). La cepa silvestre por el contrario creció de manera dispersa sin matriz extracelular (Fig. 12C). Estos resultados no se repiten si en vez de utilizar el medio L se utiliza un medio (NYGB) sin NaCl y glicerol (al 2%) en vez de glucosa como fuente de carbón. Al agregar DSF en el medio las mutantes se dispersan, demostrando así que éstas son las moléculas involucradas (Fig. 12A) (54).

Por otro lado, en un trabajo publicado en el año 2007 por nuestro laboratorio, se propone otro rol para los DSF. El medio que nosotros utilizamos para estudiar la formación del biofilm es un medio mínimo, con sales, glutamato de sodio y glucosa como única fuente de carbón. El soporte abiótico utilizado fueron unas cámaras, con fondo de poliestireno y bordes de borosilicato, donde las bacterias son capaces de unirse. A diferencia de los resultados encontrados por M. Dow nosotros observamos que las mutantes en los genes de quórum fueron incapaces de desarrollar estructuras ordenadas (53) al cabo de 4 días, al contrario de la cepa silvestre (Fig. 13). También

se observó que para que estas estructuras se formen es necesaria la presencia del xantano, mutantes en el gen *gumB* (involucrado en la síntesis del xantano) solamente pudieron adherirse al fondo de las cámaras (Fig. 13).

Xac también fue capaz de formar estructuras ordenadas en este mismo medio y para esto también fue necesaria la presencia del xantano (50).

Se eligió este medio pobre ya que pensamos que esta situación podría parecerse más a lo que ocurre en las hojas, donde no hay tanta cantidad de nutrientes disponibles para su uso inmediato.

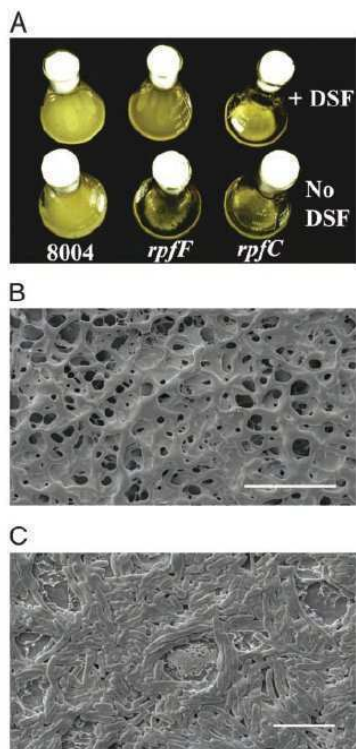


Figura 12: Biofilm de *Xcc* en medio L. A) Las cepas mutantes en los genes de *rpf* forman agregados a diferencia de la cepa silvestre. Al administrar DSF al medio este agregado desaparece en el caso de la cepa *rpfF*. B) Microscopía electrónica de barrido de los agregados muestran una estructura reticulada donde las células de la cepa *rpfF* se encuentran sostenidas en una matriz. C) Por el contrario, la cepa silvestre no se encuentra confinada a ninguna estructura (54).

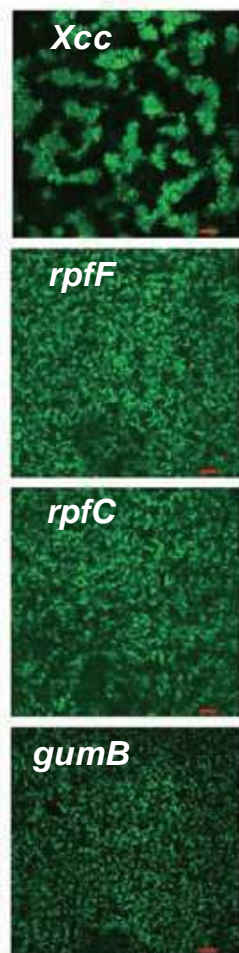


Figura 13: Biofilm de *Xcc* en medio mínimo. La cepa silvestre forma estructuras ordenadas en cambio las cepas mutantes en los genes de *rpf* y en el gen *gumb* no. Las bacterias tienen un plásmido que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) que se expresa constitutivamente (53).

Objetivos

Esta tesis tuvo como objetivo el de dilucidar algunos de los factores y estructuras que participan en el biofilm de *Xanthomonas*, en particular de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). Se hizo principal hincapié en la adhesión que es la primera etapa de este proceso.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Estudiar, mediante mutación dirigida, genes que codifican para proteínas que forman parte de estructuras inmersas en la membrana de las bacterias. Como ser, el flagelo, la adhesina filamentosa FhaB y los dos sistemas de tipo II presentes en *Xac*.
- Construir una biblioteca de mutantes con inserciones al azar del transposón Tn5 y, a través de un screening buscar nuevos genes relacionados con la formación del biofilm.
- Caracterizar las mutantes encontradas en cuanto a su patogenicidad, algunas de ellas con mayor detalle.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Las cepas utilizadas en esta tesis se detallan en la **tabla 1**:

Cepa	Características	Referencia
<i>Xac</i>	Cepa silvestre, Ap ^r	Aislado cedido por la EEAOC*
<i>Xac GFP</i>	<i>Xac</i> , Km ^r , Ap ^r	Esta tesis
<i>Xac fliC</i>	<i>Xac ΔfliC</i> , Ap ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
<i>Xac flgE</i>	<i>Xac flgE::Ω</i> , Ap ^r , Sp ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
<i>Xac fhaB</i>	<i>Xac fhaB::Ω</i> , Ap ^r , Sp ^r	Esta tesis
<i>Xac fliC-GFP</i>	<i>Xac ΔfliC</i> , Ap ^r , Km ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
<i>Xac flgE-GFP</i>	<i>Xac flgE::Ω</i> , Ap ^r , Sp ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
<i>Xac fhaB-GFP</i>	<i>Xac fhaB::Ω</i> , Ap ^r , Sp ^r , Kn ^r	Esta tesis
<i>c-fliC</i>	<i>Xac ΔfliC</i> , Ap ^r , Tc ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
<i>c-flgE</i>	<i>Xac flgE::Ω</i> , Ap ^r , Sp ^r , Tc ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
<i>Xac xcsD</i>	<i>Xac ΔxcsD</i> , Ap ^r , Km ^r	Hommem <i>et al</i> (119)
<i>Xac xpsD</i>	<i>Xac ΔxpsD</i> , Ap ^r , Km ^r	Hommem <i>et al</i> (119)
<i>Xac xcsD GFP</i>	<i>Xac ΔxcsD</i> , Ap ^r , Km ^r , Gm ^r	Hommem <i>et al</i> (119)
<i>Xac xpsD-GFP</i>	<i>Xac ΔxpsD</i> , Ap ^r , Km ^r , Gm ^r	Hommem <i>et al</i> (119)
<i>Xac 306</i>	Cepa silvestre, Ap ^r	Hommem <i>et al</i> (119)
<i>Xac 306-GFP</i>	Cepa silvestre, Ap ^r , Km ^r	Hommem <i>et al</i> (119)
<i>Xac 306 Tn5</i>	Cepa silvestre, Ap ^r , Km ^r	Esta tesis
<i>Xac rpfF</i>	<i>Xac ΔrpfF</i> , Km ^r , Ap ^r	Siciliano <i>et al</i> (120)
<i>Xac rpfC</i>	<i>Xac ΔrpfC</i> , Km ^r , Ap ^r	Siciliano <i>et al</i> (120)

<i>Xac gumB</i>	<i>Xac ΔgumB</i> , Km ^r	Rigano <i>et al</i> (50)
<i>Xcc 8004</i>	Cepa silvestre Rif ^r	Cepa referencia
<i>Xcc 8004-GFP</i>	Cepa silvestre Rif ^r , Km ^r	Esta tesis
<i>E.coli DH5α</i>	<i>hsdR</i> , <i>recA</i> , <i>lacZYA</i> , φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	GIBCO BRL

*Estación Experimental Obispo Colombres, Las Talitas, Tucumán.

Los plásmidos utilizados se detallan en la **tabla 2**:

Plásmido	Características	referencia
pGEM-Teasy	Ap ^r , lacZ	Promega
pBBR2-GFP	Km ^r	Rigano <i>et al</i> (50)
pmp2444	pBBR1-MCS-5 Gm ^r , GFP	Stuurman <i>et al</i> (121)
Pk18mobsacb	Km ^r , sacb, mob, lacZ	Katzen <i>et al</i> (122)
pHP45 Ω	Sp ^r	Prentki <i>et al</i> (123)
pGEM::fliC	Ap ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
pLAFR3	Tc ^r	Staskawicz <i>et al</i> (124)
Pk:: fliC	Km ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
pLAFR-<i>fliC</i>	Tc ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
pGEM::flgE::Ω	Ap ^r , Sp ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
Pk::flgE::Ω	Km ^r , Sp ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
pLAFR-<i>flgE</i>	Tc ^r	Malamud <i>et al</i> (118)
pGEM::fhaB::Ω	Ap ^r , Sp ^r	Esta tesis
Pk::fhaB::Ω	Km ^r , Sp ^r	Esta tesis

La lista de oligonucleótidos utilizados se detalla en la **tabla 3**:

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
Flic1	GCGAATTCGCCTTGTTGATGCGTGCCTG*	FliC Knockout
Flic2	GCTCTAGATTCCGCAGAACGTGCTGAGC**	FliC Knockout
Flic3	GCTCTAGAGAGATACCGTCGTTGGCGTT**	FliC Knockout
Flic4	GCGGATCCCAGGCGGACGGAGTTTATTT***	FliC Knockout
Flge1	GGAATCGCAAAGCGGGAT	FlgE Knockout
Flge2	AAGCTTGCAGCTCAACGTCACTGGCT****	FlgE Knockout
Flge3	AAGCTTCGTAGACATTGATGCCGCCG****	FlgE Knockout
Flge4	CGCAGCCAATGCCGATCTGA	FlgE Knockout
Fhab1	CCAGTTTTGACACGGATCGC	Fhab Knockout
Fhab2	GCGGATCCTGAAACCGTTCAACGCACCA***	Fhab Knockout
Fhab3	GCGGATCCCAGCACAGTTGAGCAACGCC***	Fhab Knockout
Fhab4	CATTGGCAGTGAGGTCTTGC	Fhab Knockout
Kan2 FP-1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	invPCR/sec ^ϕ
Kan2 RP-1	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGGAG	invPCR/sec ^ϕ
R6Kan2 RP-1	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT	invPCR/sec ^ϕ
Tn5 sense	ACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCA	Sonda
Tn5 antisense	ACCAAACCGTTATTCATTTCGTGATTG	Sonda
c-Flic-sense	GCGAATTCATTGCTGCGGCAGGTAAC*	Complementación
c-Flge-sense	GCGAATTCGATGATCGTTTGAGTGACCTGGTCC*	Complementación
c-Flge-antis	GCGGATCCCCTCACCAACGGAACACTCCACAT***	Complementación
Xac RT-flic s	CAGCTTGGTGCCGTTGAAGTT	RT-PCR

Xac RT-flic a	TGAACGCTCAGCGGAACCTCA	RT-PCR
Xac RT-gumb s	AAACACGATGACATTGCCGC	RT-PCR
Xac RT-gumb a	GCCATATTTTCGTTGCCGCTC	RT-PCR
Xac RT-16s s	TGGTAGTCCACGCCCTAAACG	RT-PCR
Xac RT-16s a	CTGGAAAGTTCCGTGGATGTC	RT-PCR

La secuencia de corte de las siguientes enzimas de restricción esta subrayada: * *Eco* RI, ** *Xba* I, *** *Bam* HI, **** *Hind* III. [‡]sec: significa secuenciación.

Medios, condiciones de cultivo y conservación de cepas

Las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en el medio Luria-Bertani (LB) a 37°C y las de *Xanthomonas* a 28°C en los medios PYM, NYGB 10% glicerol, medio mínimo (YMM), XVM2 y RDM, dependiendo del ensayo realizado en cada ocasión. En ambos casos se empleo una concentración de agar de 1,8% y cuando se utilizó medio líquido se las creció a 200 rpm/min. En la **tabla 4** se especifica las concentraciones utilizadas para cada antibiótico adicionado.

Medios de cultivo

LB	gramos por litro
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	5
Agar	1,8%

PYM	gramos por litro
Glucosa	10
Peptona	5
Extracto de Levadura	3
Maltosa	3
Agar	1,8% ó 0,5% (<i>sliding</i>)

YMM

1 ml de casa solución stock en 1 litro de agua destilada

Stocks	gramos por litro
MgSO ₄ 7H ₂ O	10
CaCl ₂ 5H ₂ O	22
K ₂ HPO ₄	22
FeCl ₃	2g en 0,1M de HCl

+ Glucosa 1 % final

Suplemento (autoclavar por separado): glutamato de sodio 11%
Concentración final 0,11% (Agregar cada vez)

NYGB 0,25% agar 2% glicerol (ensayos de *swimming*)

Peptona	0.5%
Extracto de Levadura	0.3%
Glicerol	20ml/L
Agar	0.25%

XVM2

En gramos/litro (pH 6,7)

NaCl	1,16
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,32
MgSO ₄	1,23
CaCl ₂	0,147
KH ₂ PO ₄	0,028
K ₂ HPO ₄	0,043
FeSO ₄	0,0027
Fructosa	1,8
Sacarosa	3,42
Casaminoacidos	0,03%

NBY glicerol 2%

En gramos/litro

Peptona	5
Extracto de carne	3
Extracto de levadura	2
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	0,5
Glicerol	20ml/L

El medio **RDM, Rhizobium defined médium**, fue preparado según Vincent, 1970 (125)

Tala 4: Concentraciones de los antibióticos empleados.

Antibiótico	Solución madre (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)	
		<i>E.coli</i>	<i>Xanthomonas</i>
Ampicilina	100 (H ₂ O)	200	100 (<i>Xac</i>)
Kanamicina	50 (H ₂ O)	50	50
Rifampicina	50 (DMSO)	-	50 (<i>Xcc</i>)
Gentamicina	20 (H ₂ O)	20	40
Tetraciclina	10 (70% etanol)	15	10
Espectinomicina	100 (H ₂ O)	100	100

La conservación de cepas fue realizada por congelamiento rápido de cultivos en fase logarítmica, suplidos con glicerol estéril a una concentración final de 20% (v/v) en criotubos conservados a -80°C.

Preparación de bacterias electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *E.coli* se prepararon siguiendo el protocolo descrito en el libro "Molecular cloning" (126).

Las cepas de *Xanthomonas* electrocompetentes fueron preparadas y utilizadas en el momento basándose en el protocolo descrito por Machado *et al* (127).

En los experimentos donde se utilizó el plásmido conteniendo el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), las células fueron preparadas directamente de placas frescas de *Xanthomonas*. Se tomaron las células con la punta de un tip resuspendiéndolas en agua miliQ estéril y fría. Manteniéndolas siempre en frío se efectuaron al menos 4 lavados sucesivos. Finalmente se resuspendieron en 200 µl de agua.

Transformación de células electrocompetentes

Para obtener bacterias transformadas se agregaron a 40 µl de células electrocompetentes entre 1 y 4 µl de los plásmidos en un rango de 50 a 200 ng/µl. Se

incubó por unos minutos la mezcla en hielo y se electroporaron las bacterias utilizando, en todos los casos los siguientes parámetros: 25µF, 2,5 kV y 200 Ω. Se dejaron recuperando en SOC* 1 hora a 37°C en el caso de *E.coli* y entre 4 y 16 horas para las cepas de *Xanthomonas*.

*SOC	En gramos/litro
Triptona	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0,5
KCl	2,5

A un litro de la solución estéril del medio SOC se le agrega 20 ml de una solución estéril de glucosa 1M.

Construcción de una biblioteca de mutantes en Xac

Se generó una colección de mutantes al azar en *Xac* utilizando el kit EZ-Tn5™ <R6Kgori/KAN-2>Tnp Transposome™, las mutantes fueron generadas siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se prepararon células competentes de la cepa silvestre *Xac* 306 para electroporación, se eligió este método por tener una eficiencia de transformación mayor que los métodos de conjugación bi o triparental. En la realización de las mismas se tuvo especial cuidado de que en todo momento las bacterias se encontraran a 0°C manteniéndolas constantemente en un baño hielo-agua. De esto depende que se obtenga una buena eficiencia al momento de transformar (127).

Las células electroporadas con el plásmido fueron recuperadas durante 4 horas en agitación a una temperatura constante de 28 °C, pasado este tiempo se plaquearon en un medio selectivo, con kanamicina y se dejaron en la estufa hasta la aparición de las colonias correspondientes a la cepa silvestre mutagenizada.

Para conservar las cepas, cada una de ellas fue repicada y crecida en placas QIAwell 96 Ultra Plasmid estériles, con un contenido de 96 pocillos, en el medio PYM adicionado con un 10% de glicerol. Luego de un día en agitación a 28°C, 150 µl del cultivo crecido fue colocado en placas de elisa estériles de 96 pocillos para su conservación a una temperatura de - 80 °C.

Técnicas de manejo de ADN

Preparación de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico *de Xac*, se utilizó el método de extracción de CTAB/NaCl (126).

1. Se partió de 5 ml de medio de cultivo crecido a 28°C ON
2. Las células fueron centrifugadas 2 minutos a máxima velocidad
3. Se resuspendió El pellet en 567 µl en buffer TE en presencia de SDS y proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y 0.5%, respectivamente
4. Se incubó la mezcla por una hora a 37°C
5. Se agregó 100 µl de una solución NaCl 5M que permite la remoción de desechos de la pared celular, de proteínas desnaturalizadas y polisacáridos
6. Luego de vortexear se añadió 80 µl de una mezcla CTAB/NaCl (10%/0,7M)
7. Se incubó a 65°C por 10 minutos
8. Se efectuaron dos extracciones: la primera con una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), la segunda se utilizó fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1), en ambos casos se mantuvo la muestra en hielo.
9. Para precipitar el ADN genómico se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol del sobrenadante que se obtuvo luego de la centrifugación de las muestras.
10. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos y se lavó el pellet con etanol 70%
11. Se secó el pellet y se resuspendió en 50 µl de agua miliQ
12. La integridad y la concentración de las muestras fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%

TE: 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.

Preparación de ADN plasmídico

1. Se crecieron las bacterias 37°C durante 16 hs en 3 ml de LB con antibióticos
2. Se tomaron 1,5 ml del cultivo y se lo centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto
3. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en buffer TE
4. Luego se realizó una hidrólisis alcalina agregando una solución de NaOH 0,2M y SDS 1% (m/v). Se mezcló por inversión
5. Se agregó una tercera solución de AcNa 3M y AcK 5M
6. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente
7. Se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos para separar el precipitado de ADN cromosomal y proteínas
8. El sobrenadante se incubó con ARNasa por una hora a 37°C

9. Al finalizar esta incubación se separó el ADN de la enzima mediante una extracción con cloroformo
10. Para precipitar el ADN se agregó 0,7 volúmenes de isopropanol y la incubación del mismo a -20°C durante 40 minutos
11. Se centrifugó la mezcla y al pellet obtenido se lo lavó con etanol 70% y resuspendió en 20 µl de agua miliQ.

Preparación de ARN y síntesis de ADNc

Se realizó la extracción de ARN con el kit de RBC[®] en bacterias crecidas por 24 horas en YMM siguiendo las especificaciones del productor.

Para cuantificar la cantidad de ARN en cada muestra se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Antes de realizar el gel se limpió todo el material con una solución de NaOH 0,5M por 30 minutos y luego se enjuagó con agua MiliQ.

Tratamiento con RQ1 DNAasa (Promega), para eliminar el ADN de las muestras:

1. 10 µl de ARN, 1 µl de enzima y 1 µl de buffer
2. 30 min a 37 °C
3. agrego 1 µl de solución stop
4. 10 min a 65 °C

Síntesis de ADNc

ARN tratado con DNAasa	5 µl
Random primers (dN6, Biodynamics SRL)	0,25 µl (1µg/ml)
H ₂ O miliQ	7 µl

La mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C y 5 minutos en hielo.

Luego se agregó la siguiente mezcla:

Buffer 5X	5µl
dNTPs 10 µM	5µl
M-MLVRT	1µl
RNA sin	1µl

Se incubó todo por 1 hora a 43 °C.

Las PCRs para determinar la expresión de los genes a partir del ADNc fueron realizadas con los oligonucleótidos especificados en la **tabla 3**.

Amplificación de secuencias mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Para realizar ampliaciones a partir de ADN genómico bacteriano se agregó 0,1 a 1 ng de ADN por reacción.

Las reacciones de PCR tuvieron, en su mayoría, las siguientes condiciones:

Solución de amplificación (10X):	2,5 µl
dNTPs (100µM)	1 µl
10µM oligonucleótido sentido*	1 µl
10µM oligonucleótido antisentido*	1 µl
Templado	0,1-1 ng de ADN ó célula bacteriana
<i>Taq/pfu</i> polimerasa	0,1 µl
H ₂ O (milliQ)	Hasta Volumen final de 25 µl

*Variaron de acuerdo a la reacción.

Colony-PCR

Se empleó el ADN total proveniente directamente de colonias aisladas tanto de *E.coli* como de *Xac*, que fue preparado de la siguiente forma:

Se tomaron colonias con palillos estériles y se las resuspendió en 100 µl de agua estéril. Se las incubó por 5 minutos a 100°C, luego se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad y se tomaron en todos los casos 5 µl del sobrenadante para la reacción de PCR.

Geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa fue utilizada para la visualización y separación de los fragmentos obtenidos por: extracción de ADN, de ARN, de plásmidos, ensayos de restricción ó amplificación de fragmentos. Generalmente se utilizó la agarosa entre 0,8 a 1,5% dependiendo en cada caso del tamaño esperado, conteniendo Gel red (Biotum) al 1%.

Determinación del sitio de inserción del transposón en el genoma de las mutantes defectivas en la adhesión

Para la identificación de los genes interrumpidos por el transposón se utilizó la técnica de PCR invertida (invPCR). Para ello se obtuvo el ADN genómico de cada una de las mutantes utilizando un kit comercial de Promega (Wizard® Genomic) siguiendo las especificaciones del productor. Los ADN genómicos fueron digeridos con alguna de las siguientes enzimas de restricción: *EcoR* I, *BamH* I o *Nar* I. Las reacciones se incubaron a 37°C por 24hs y luego las enzimas fueron inactivadas calentando la mezcla a 65°C por 20 minutos. Se realizó un ensayo de autoligación utilizando

diluciones del ADN digerido en un volumen final de 100 μ l para favorecer de esta manera las ligaciones intracatenarias. Luego de una incubación de 16 horas a 16°C se realizó una PCR utilizando como templado el producto de ligación y como oligonucleótidos Kan2 FP-1/Kan2 RP-1 ó Kan2 FP-1/ R6Kan2 RP-1 dependiendo de la mutante (Fig. 1 y Fig. 2). Mediante una corrida en geles de agarosa se resolvieron las bandas de diferentes pesos moleculares, se las purificó utilizando el sistema comercial de la marca Promega según especificaciones del proveedor y se las secuenció utilizando los mismos oligonucleótidos de antes que corresponden a la secuencia del Tn5. En los esquemas de abajo está marcado el sitio de hibridación de los oligonucleótidos.

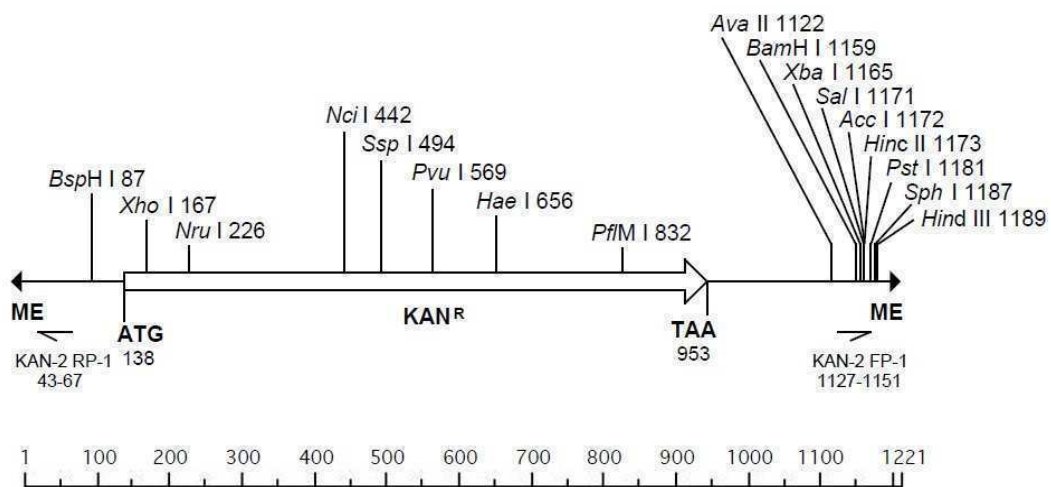


Figura 1: Esquema del transposón Tn5 utilizado de la primera biblioteca de mutantes utilizada en el screening de mutantes defectivas en la adhesión.

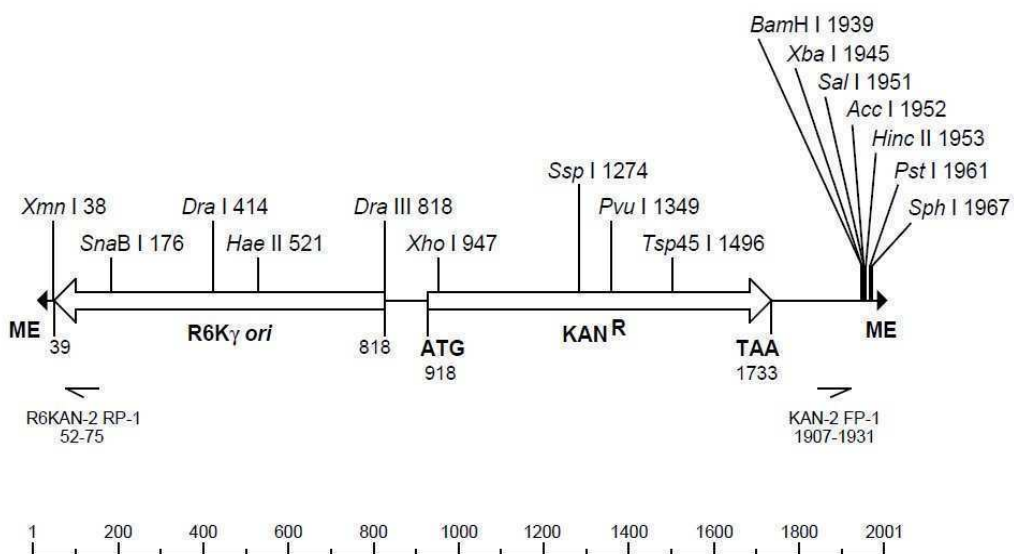


Figura 2: Esquema del transposón Tn5 utilizado en la realización de la segunda biblioteca de mutantes utilizada en el screening de mutantes defectivas en la adhesión.

Southern Blot, marcación de la sonda, pre-hibridación e hibridación de ácidos nucleicos.

Se utilizó la técnica de southern blot basándose en el protocolo descrito en el manual Molecular Cloning: A Laboratory Manual (126). Para esto se cuantificó y digirió el ADN con la enzima *BamH* I durante aproximadamente 16 horas a 37°C. Luego, con el objetivo de separar los fragmentos digeridos se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se hicieron distintos lavados del gel que permitieron en un primer lugar depurinar al ADN, obteniendo fragmentos de menor tamaño y más fácil de transferir. Posteriormente se utilizó una solución de desnaturalización que permite que el ADN se cargue negativamente y de esta manera se mejora la eficiencia de transferencia del mismo a una membrana de nitrocelulosa que se encuentra cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham International). Antes de realizar la transferencia se lavó el gel dos veces con la solución de neutralización. Todos estos pasos se realizaron en agitación y a temperatura ambiente.

Soluciones:

1-buffer de depuración: HCL 0,125M

2-buffer de desnaturalización: NaCl 1,5M/ NaOH 0,5M

3-buffer de neutralización: NaCl 1,5M/tris-HCl 0,5M

La transferencia de los fragmentos de ADN del gel a las membranas se realizó por capilaridad a temperatura ambiente durante toda la noche en una solución de 10x SSC (15mM de citrato de sodio y 1,5M NaCl). Finalizada la transferencia se fijó el ADN a la membrana exponiendo la misma a radiación UV durante 15 minutos. La membrana se conservó húmeda y en la heladera hasta su utilización.

Para la marcación de la sonda se utilizó el kit Prime-a-Gene[®] Labeling System (Promega) según especificaciones del proveedor. Previamente la sonda sin marcar fue incubada a 100°C por 2 minutos para su desnaturalización. La misma se mezcló con los dNTP sin marcar, con [α^{32} P] dCTP y con la enzima DNA Polymerase I large (Klenow) Fragment (Promega) la reacción se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se purificó la sonda marcada, separando esta del [α^{32} P] dCTP no incorporado a través de la utilización de columnas (Ambion, Inc.).

Durante todo el proceso de pre-hibridación y de hibridación se mantuvieron las membranas a 55°C en tubos de vidrios.

Se efectuaron los lavados de acuerdo a los protocolos provistos por el fabricante de las membranas (GE Healthcare). Posteriormente las membranas fueron expuestas en una placa autorradiográfica Storage Phospho Screen y revelados con el scanner óptico Storm 820 (Amersham Pharmacia).

Procedimientos generales

Los protocolos utilizados en las digestiones con las enzimas de restricción, Las ligaciones, las electroforesis en geles de agarosa y las reacciones de PCR fueron realizadas según lo descrito en el libro “Molecular Cloning: A laboratory manual” (126). Para la recuperación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema wizard[®]SV (Promega Inc.). Las reacciones de digestión fueron realizadas en un volumen final de 15 µl incubándolas por 2 horas a 37°C.

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis fueron suministrados por *Integrated DNA technologies* (Coralville, IA, USA).

Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias

Las muestras se secuenciaron utilizando el sistema AutoRead o Autocycle (GE Life Sciences). Los datos fueron procesados y analizados utilizando el secuenciador automático A.L.F. (GE Life Sciences). Este ensayo fue realizado en el servicio de secuenciación de la Fundación Instituto Leloir.

Obtención de mutantes dirigidas

Mutante por delección

***fliC*, gen que codifica la flagelina**

A partir del ADN genómico de *Xac*, se amplificaron dos fragmentos de 408 pb (oligonucleótidos *flic1* y *flic2*) y de 484 pb (oligonucleótidos *flic3* y *flic4*), respectivamente. Luego de purificar las bandas de ADN correspondientes a los pb mencionados, se las digirió con la enzima de restricción *Xba* I (los sitios de corte fueron introducidos durante la amplificación), y ligó entre sí generando una secuencia de aproximadamente 890pb a partir de la cual se realizó una tercera reacción de PCR que fue clonada en el plásmido pGEMT-easy (pGEM::*fliC*).

La construcción fue digerida con la enzima de restricción *Eco* RI y subclonada en el vector pK18*mobsacB*, generando así el plásmido pK::*fliC* utilizado posteriormente para transformar las células de *Xac* electrocompetentes. Las bacterias con la inserción

en el gen fueron seleccionadas en PYM kanamicina, las resistentes al antibiótico fueron repicadas en placas PYM suplementadas con 3% de sacarosa. Nos quedamos con las bacterias resistentes a kanamicina y sensibles a sacarosa. Se largaron cultivos sin el antibiótico de estas células y luego una noche creciendo a 28 °C y a una velocidad de 200 rpm/min se plaquearon las bacterias en PYM suplementado solamente con 3% de sacarosa. Luego se confirmó la mutante realizando una PCR y secuenciando el fragmento amplificado. En la figura 3 se especifican las zonas de apareamiento de los oligonucleótidos, el contexto génico del gen y el tamaño esperado del transcripto de la cepa silvestre y de la mutante en el gen *fliC*.

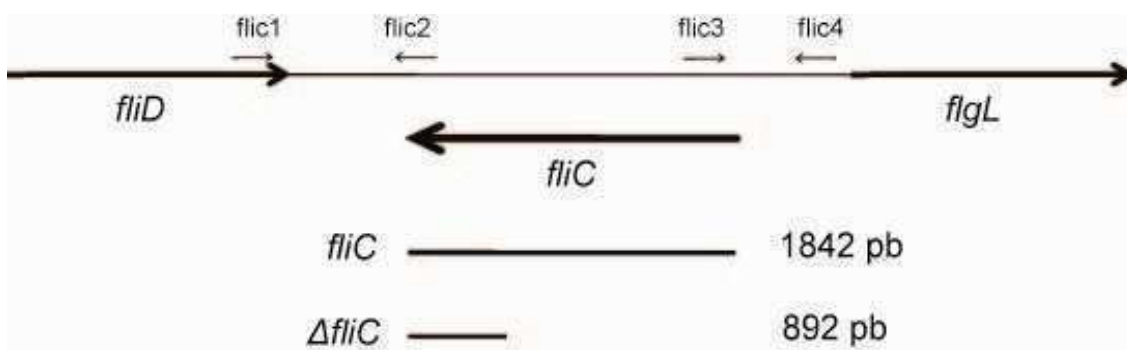


Figura 3: Esquema general y zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados (*flic1*, *flic2*, *flic3*, *flic4*) para la construcción de la mutante $\Delta fliC$.

Mutantes por inserción:

flgE, gen que codifica para el gancho flagelar

La mutante en el gen *flgE* fue realizada mediante la electroporación del plásmido $pK::flgE::\Omega$. Para su construcción se realizaron dos PCRs. La primera abarcó una zona río abajo del gen y parte de la región 3' del mismo. En la segunda se amplificaron 484 pb pertenecientes al 5'. Luego de la purificación de los fragmentos visualizados en un gel de agarosa se efectuó una digestión con la enzima de restricción *Hind* III. La ligación entre ambos fragmentos se inició una vez inactivada la enzima. Al finalizar las 18 horas de reacción se realizó una PCR utilizando como templado el producto de ligación y se clonó en el plásmido comercial pGEM-Teasy ($pGEM::flgE$). Paralelamente se purificó y digirió el plásmido pHP45 Ω con la misma enzima de restricción para obtener el cassette Ω que confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina. A continuación se realizó una reacción de ligación entre el cassette Ω y el plásmido $pGEM::flgE$ linealizado. La construcción fue subclonada en un plásmido $pKmobsacB$ utilizando *Eco* RI como enzima de restricción. De esta manera se obtuvo el vector deseado, $pK::flgE::\Omega$.

En la figura 4 se especifican las zonas de apareamiento de los oligonucleótidos, el contexto génico del gen y el tamaño esperado del transcripto de la cepa silvestre y de la mutante en el gen *flgE*.

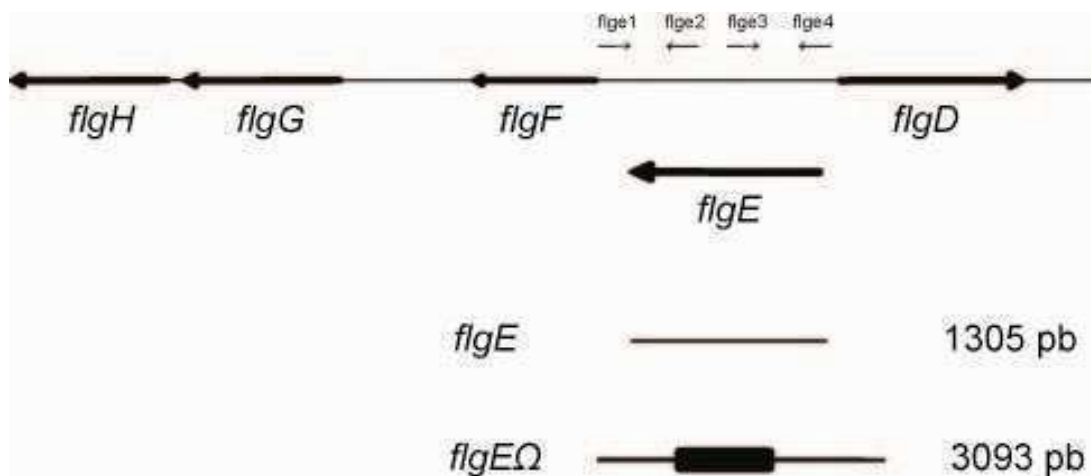


Figura 4: Esquema general y zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados (*flge1*, *flge2*, *flge3*, *flge4*) para la construcción de la mutante *flgEΩ*.

Complementación de las mutantes:

Para la complementación de la mutante *fliC* se amplificó todo el gen, junto con una región de 245 pb río arriba. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la tabla 3 (*c-Flic-sense* y *Flic4*). El fragmento sintetizado fue clonado en el vector de expresión pLARF3 para obtener el constructo pLAFR-*fliC* (118).

En el caso de la construcción del plásmido para complementar la cepa *flgE* se utilizaron los oligonucleótidos *c-Flge-sense* and *c-Flge-antis* (tabla 3) que amplifica todo el gen *flgE* y el mismo plásmido de expresión.

Ambos fueron confirmados por secuenciación del plásmido y luego electroporados en sus respectivas cepas mutantes, obteniendo: *c-fliC* y *c-flgE*.

Mutagénesis de una adhesina: *thaB*

Para la construcción de la mutante en el gen de la adhesina no filamentosa *thaB* se efectuaron dos PCR utilizando una metodología similar a la de la mutante *flgE*.

Los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta de amplificar la primera parte del gen (región 3') (Figura 5). Se introdujo el sitio de corte de *Bam* HI para poder insertar el cassette de resistencia Ω.

Luego de la purificación de los fragmentos visualizados en un gel de agarosa se efectuó una digestión con la enzima de restricción *Bam* HI. Los fragmentos se ligaron una vez inactivada la enzima. Se realizó una PCR de esta ligación utilizando los

oligonucleótidos *fhab1* y *fhab4* que luego fue clonada en el plásmido pGEM-Teasy generando el plásmido pGEM::*fhaB*. A continuación se realizó una reacción de ligación entre el cassette Ω y el plásmido pGEM::*fhaB* linealizado generando pGEM::*fhaB*:: Ω . La construcción fue subclonada en un plásmido p*KmobsacB* utilizando *Eco* RI como enzima de restricción.

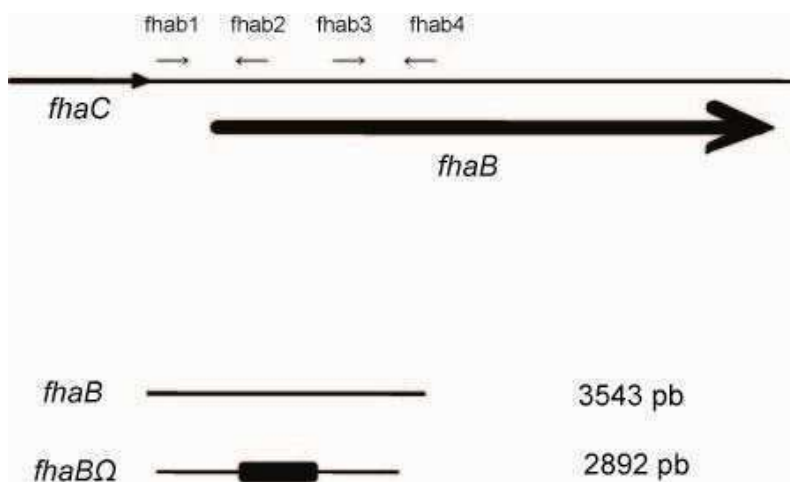


Figura 5: Esquema general y zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados (*fhab1*, *fhab2*, *fhab3*, *fhab4*) para la construcción de la mutante *fhaBΩ*.

Ensayos de adhesión y tinción con cristal violeta

En los ensayos de adhesión a superficies abióticas las bacterias fueron crecidas en agitación en PYM a una temperatura constante de 28°C. Se tomaron alícuotas que fueron colocadas en medio mínimo y se dejaron nuevamente creciendo toda la noche, 150 μ l de los cultivos fueron colocados en pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos. Se midió la adhesión luego de 1, 3, 6 y 24 horas de incubación estática en una estufa a 28°C.

Se llevaron a cabo otros ensayos de adhesión, donde lo que se midió fue como iba modificándose la unión al sustrato inerte al mismo tiempo que las bacterias iban multiplicándose. Brevemente, luego de crecer toda la noche a 28°C, las cepas mutantes junto con la silvestre fueron diluidas en un medio mínimo llevándolas a una misma DO (densidad óptica) inicial y colocando 150 μ l de estas en los pocillos. Se fue midiendo la formación del biofilm en el transcurso de 3 días.

En ambos experimentos el número de repeticiones (N) fue de 8 y el ensayo se realizó por triplicado. En ambos tipos de ensayos la adhesión de las bacterias fue cuantificada utilizando una modificación de la técnica de tinción con cristal violeta descrita por O'Toole (128). Brevemente, al finalizar el tiempo de incubación se aspiraron de los pocillos las bacterias no adheridas (las que no desarrollaron biofilm) y

se lavaron una vez con una solución estéril de NaCl 0,9%. Luego se los incubó por 30 min con 150 µl de una solución 0,1% de cristal violeta (CV) y se los lavó dos veces con agua destilada. La cuantificación de bacterias unidas fue realizada agregando 150 µl de etanol 95% a cada pocillo teñido con CV para lograr solubilizar el pigmento y luego se midió la absorbancia utilizando un lector de microELISA en 560 nm (7520microplate lector Cambridge Technology, Inc.) según lo descripto previamente. Para graficar los resultados se relativizaron con las DO de las bacterias.

$$\text{Adhesión relativa} = (\text{CV}_{560} / \text{DO}_{600}) \text{ cepa}$$

Ensayos de microscopia laser confocal in vitro

Todas las cepas que expresan la proteína GFP (green fluorescent protein) fueron crecidas en agitación en el medio de cultivo PYM suplementado con kanamicina. La DO de las mismas fue ajustada a 0,004 en todos los casos en el medio de cultivo mínimo YMM, 500 µl fueron colocados en los pocillos de una cámara de cultivo (no. 155411; Lab-Tek, Nunc, Naperville, IL, U.S.A.), cuyo piso es de poliestireno. La formación del biofilm fue monitoreada diariamente durante 5 días mediante la utilización de un confocal invertido ZEISS *LSM 510/Axiovert 100M* (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). El ensayo fue realizado por triplicado y las imágenes tridimensionales fueron generadas con el programa Zeiss LSM Image Browser, versión 3.2.0.

Ensayos de microscopia laser confocal in vivo

Para el estudio del biofilm *in vivo* se infectaron hojas de plantas *Citrus limon* con una suspensión de 1×10^6 ufc/ml bacterias que expresan la proteína GFP. Se utilizaron las cepas *Xac*, *fliC* y *flgE*. Se recubrieron las plantas infectadas con bolsas de nylon humedecidas y se colocaron en un invernadero con un rango de temperatura de 25-30 °C. Luego de 6 días de incubación se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm² de área y se colocaron sobre un porta objeto con la cara adaxial hacia abajo. Las muestras se observaron en un microscopio laser confocal invertido Nikon C1 (CSLM, Japan). Las imágenes obtenidas con el CSLM se analizaron utilizando el programa Nikon EZ-C1. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

Ensayo de la población bacteriana en la hoja

Cuantificación del número total de bacterias en la hoja

Se inocularon hojas de limonero por aspersión con las cepas *Xac*, *fliC* y *flgE*, utilizando una concentración de 1×10^6 ufc/ml. Se cortaron discos de aproximadamente 1 cm^2 de las hojas infectadas a diferentes tiempos post-inoculación. Se sumergieron los discos en 500 μl de una solución de 10 mM MgCl_2 y con la ayuda de un palito estéril se liberaron las bacterias. La suspensión de bacterias fue plaqueada en medio PYM para poder contabilizar las ufc.

Cuantificación del número de canchales

Hojas de limonero fueron inoculadas por aspersión con las cepas *Xac*, *fliC* y *flgE*, utilizando dos concentraciones diferentes: de 1×10^4 y 1×10^5 ufc/ml. Se contaron el número de canchales desarrollados para cada cepa y con la utilización del programa ImageJ 1.41 (National Institute of Health, Bethesda, MD, EEUU) se calculó el área correspondiente. Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

Ensayos de movilidad

Swimming

Las placas utilizadas para probar la movilidad de *swimming* fueron realizadas con el medio de cultivo NYGB suplementado con 10% de glicerol y 0,25% de agar. Las cepas ensayadas fueron crecidas toda la noche a 28 °C y llevadas a una misma DO antes de sembrar 3 μl . Luego de 3 días se tomaron las fotos. En todos los casos el experimento se repitió por lo menos 3 veces, las imágenes mostradas son las más representativas.

Movimiento independiente de flagelo (*sliding*)

Para ensayar este tipo de movimiento el medio de cultivo usado fue PYM con 0,5 % de agar. Los cultivos bacterianos crecidos ON en agitación constante a 28°C se llevaron a una misma DO y se sembraron 3 μl en la placa. Luego de 3 días en una estufa a 28°C se sacaron las fotos. El experimento se repitió por lo menos 3 veces, las imágenes mostradas son las más representativas.

Ensayos de producción de enzimas extracelulares

Para evaluar la producción de enzimas extracelulares se realizó en todos los casos el siguiente protocolo. Se tomaron bacterias de las placas y se las crecieron en agitación en el medio PYM durante 16 horas, se midió la DO de cada cultivo y se tomaron 1,5 ml del mismo, se lo centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos.

Para los dos ensayos se utilizaron los sobrenadantes, se sembraron 20 μ l en los pocillos realizados con un sacabocado en las diferentes placas.

Para la producción de proteasas se midió el halo de degradación de un medio compuesto por agua y leche descremada al 1%.

En el caso de la producción de amilasas se utilizó un medio conteniendo almidón y se tiñó la placa con iodo.

Los datos fueron procesados con el programa ImageJ 1.41. Se tomó el área total de la placa y el área de degradación (parte que no se tiñó con el iodo). Se relativizó el área de degradación con el área total, se hizo un promedio con los 3 datos y se graficó siempre relativizándolo con la cepa silvestre.

Ensayos de supervivencia al peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Las diferentes cepas fueron crecidas en medio líquido durante 12 horas o hasta que llegaron a la fase estacionaria. Se tomaron 100 μ l y con un hisopo se sembraron en placas PYM sin antibióticos. Se colocó un disco de papel whatman en el centro al cual se lo embebió con una solución de H_2O_2 a una concentración final de 100 mM. Luego de 48 hrs a 28°C se midió el halo de inhibición de crecimiento (Fig.6).

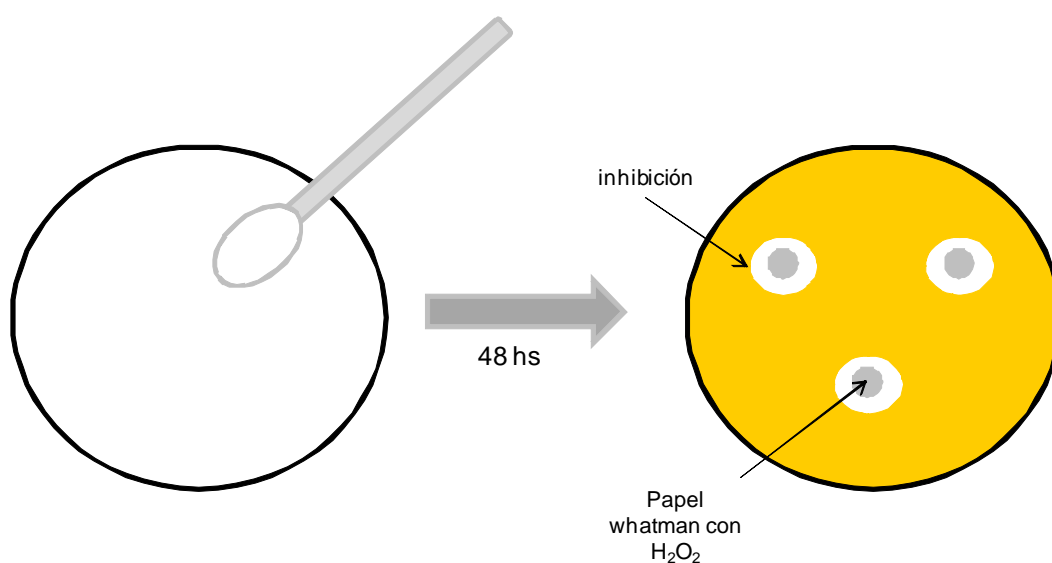


Figura 6: Ensayo de inhibición del crecimiento

Se utilizó el programa ImageJ 1.41 para cuantificar estos datos. Se tomó el área total de crecimiento (toda la placa) y el área de inhibición (parte donde las bacterias no crecieron). Se relativizó el área de inhibición con el área total, se hizo un promedio con los 3 datos y se graficó siempre relativizándolo con la cepa silvestre.

Extracción del exopolisacárido (EPS)

Las diferentes cepas en fase estacionaria fueron utilizadas para evaluar la producción del xanthano en medio mínimo y en medio rico PYM:

- 1-Centrifugación de cultivos bacterianos líquidos, 20 min a 10000 rpm
- 2-Obtención de un sobrenadante libre de células y agregado al mismo de 1% KCl
- 3-Precipitación del polisacárido con 2 volúmenes de etanol 96%
- 4-Centrifugación 20 min a 10000 rpm
- 5-Liofilización del pellet conteniendo el EPS y de las células
- 6-Estimación del peso del xanthano liofilizado refiriéndolo a la masa celular seca

Extracción de los glucanos cíclicos (GC) y cromatografía en capa delgada

Se utilizaron 3 ml de cultivos bacterianos crecidos hasta su fase estacionaria para la extracción de los GC. Las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en 300 μ l de etanol 70 % y luego incubadas por una hora a 37 °C, de esta manera se extraen los polisacáridos. La mezcla se volvió a centrifugar, luego los sobrenadantes fueron concentrados hasta sequedad en vacío. Se resuspendieron las muestras en 10 μ l de etanol 70%, para sembrarlos en las placas.

Se sembró toda la muestra en la placa (TLC), que luego fue colocada en una cuba que contiene el buffer de corrida butanol:etanol:agua (5:5:4). Se realizó dos veces este procedimiento y luego la placa fue revelada rociando con una solución ácido sulfúrico al 5% en etanol y dejándola por 5 minutos en una estufa cuya temperatura es de 200 °C.

Tinción del flagelo con cristal violeta

La tinción del flagelo se realizó utilizando con algunos cambios el método descrito por Mayfield and Innis (129). La solución utilizada se preparó mezclando 10 volúmenes de la solución A (2g ácido tánico, 10 ml fenol 5%, 10 ml $\text{AlK}_2\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) con 1 volumen de cristal violeta 12% P/V en etanol. 3 μ l de los cultivos bacterianos crecidos ON en PYM ($\text{OD}_{600}=2$) fueron colocados sobre portaobjetos cubiertos con vidrio. Se utilizó 10 μ l de la solución preparada en el momento. Se observaron los preparados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar, Germany).

Condiciones de crecimiento e infección de Cítricos

Las plantas de cítricos se crecieron en un invernadero con temperatura controlada (22-26 °C) y un fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad. La intensidad lumínica fue de 150 a 200 $\mu\text{E}/\text{sm}^2$. En todos los casos se utilizó la especie de limonero *citrus limón* cuyo nombre comercial es *Eureka*. También se realizaron ensayos de patogenicidad en plantas de pomelo *Citrus paradisi* Macfadyen, que es más susceptible a la enfermedad.

Material vegetal e inoculaciones

Con el objetivo de evaluar la patogénesis de las mutantes del transposón se inocularon 5 μl de una suspensión de bacterias de una DO 0,1. Se utilizaron hojas jóvenes para estas infecciones, se realizaron heridas en algunas regiones de las hojas y luego se colocó la suspensión de bacterias. En cada hoja se inoculó como control la cepa silvestre. Las plantas infectadas fueron monitoreadas semanalmente y luego de un mes se cortaron las hojas y se tomaron fotos.

También se realizó este mismo procedimiento en plantas de pomelo, con aquellas bacterias que no formaban canchales en las plantas de limón.

Se utilizó también otro método de infección, donde las bacterias fueron inoculadas mediante aspersión. Las concentraciones utilizadas, dependiendo el experimento, fueron 1×10^4 ; 1×10^5 y 1×10^6 (ufc/mL). Utilizando un atomizador se roció el inóculo sobre la superficie foliar, principalmente sobre la cara abaxial por su mayor número de estomas. Este método de inoculación se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza, donde las bacterias ingresan al mesófilo por los estomas.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: *Estudio de las implicancias de estructuras celulares externas de Xac en el desarrollo del biofilm mediante genética directa.*

En este capítulo estudiamos el biofilm de *Xac*. Se ensayaron diferentes medios de cultivo y distintos soportes abióticos con el objetivo de encontrar el más adecuado. La bacteria fue capaz de adherirse y desarrollar esta estructura ordenada cuando se utilizó un medio mínimo con glucosa y un soporte de poliestireno. Los sustratos abióticos que elegimos, fueron entonces placas de 96 pocillos y unas cámaras de cultivo ambas hechas con este material.

Se quiso ahondar más en el conocimiento, que hasta entonces se tenía, sobre los requerimientos de esta bacteria para la formación del biofilm. Mediante mutaciones dirigidas a genes blanco se estudiaron diferentes componentes de la bacteria en cuanto a su participación en el desarrollo del biofilm y patogenicidad. Los genes elegidos fueron:

- Genes relacionados con el flagelo, ya que se observó que en las bacterias gram negativas, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (93, 130, 131) esta estructura es muy importante.
- La adhesina FhaB.

1. Estudio del biofilm formado por las bacterias del género *Xanthomonas*

A) Factores ambientales que afectan la formación del biofilm *in vitro* en *Xanthomonas spp.*

Se estudió la habilidad de las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*) y *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*) en el inicio y desarrollo de la formación de un biofilm.

Se sabe que las bacterias no forman siempre biofilms, esto depende en parte del estado nutricional en que se encuentre. Con el objetivo de determinar que medio, disponibles en el laboratorio, era propicio para que *Xanthomonas* formara un biofilm se ensayó la adhesión de las cepas silvestres en diferentes condiciones nutricionales.

Por un lado se cree que si las bacterias se encuentran en un medio rico en nutrientes no tienen la necesidad de agruparse. Por otro lado también se sabe que la habilidad de sintetizar exopolisacárido es una necesidad casi indispensable para que se pueda formar el biofilm (ver introducción, parte 3). Además *Xanthomonas* necesita glucosa en el medio para poder producir el xantano.

Los medios utilizados fueron medios definidos:

Medio mínimo (YMM).

RDM (medio definido de rhizobium).

También se probaron diferentes concentraciones de glucosa en el medio YMM.

Se realizaron ensayos de adhesión a placas de elisa de poliestireno de 96 pocillos utilizando, en todos los casos, como concentración final de las bacterias $DO=0,1$. Los ensayos realizados se basaron en la técnica de tinción con cristal violeta desarrollada por O'Toole (128). Brevemente, las bacterias se crecieron en agitación toda la noche a 28°C y luego fueron transferidas a los diferentes medios donde se las cultivó sin agitación durante 24 horas a 28°C. En la figura 1.1A se observa que la presencia de glucosa es necesaria en el medio mínimo ya que al utilizar el mismo medio con y sin glucosa la bacteria solo fue capaz de unirse al soporte en presencia de esta. Este medio de cultivo sería parecido al exterior de las hojas, donde los nutrientes son escasos. Por otro lado en un medio que posee una alta concentración de nutrientes las bacterias no se adhieren al sustrato esto lo vimos al probar con el medio rico PYM (datos no mostrados). De la figura 1.1B se puede concluir que en el medio RDM, *Xcc* es capaz de adherirse a los pocillos de las placas utilizadas, al igual que con el medio YMM, pero en éste último caso el resultado obtenido fue más satisfactorio. Por eso se decidió continuar trabajando con YMM.

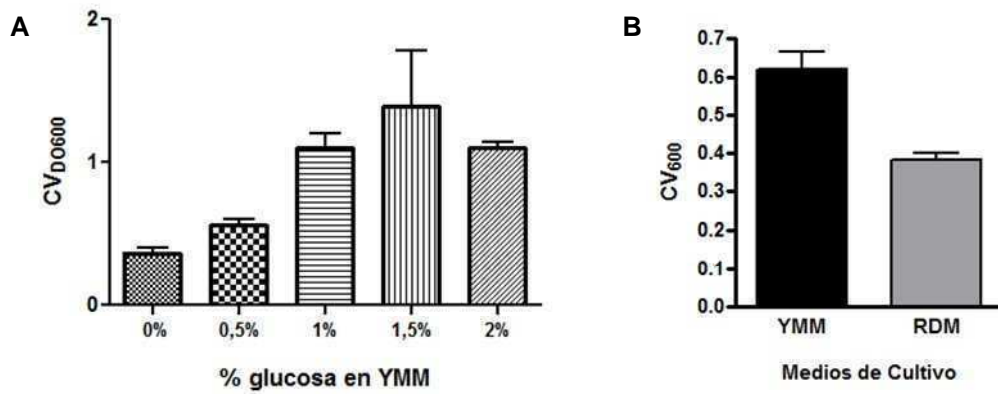


Figura 1.1: Ensayos de adhesión de la cepa *Xcc* probando A) diferentes concentraciones de glucosa en el medio YMM. B) diferentes medios de cultivo. En ambos casos la DO inicial utilizada fue de 0,1 y las placas fueron colocadas a 28°C, sin agitación por 24 horas.

Se ensayó además, la capacidad de adherirse a las placas de elisa utilizando el medio XVM2 (132) tanto en *Xac* como en *Xcc*. Este medio estaría mimetizando el ambiente que existe en el espacio intercelular dentro de las hojas (132).

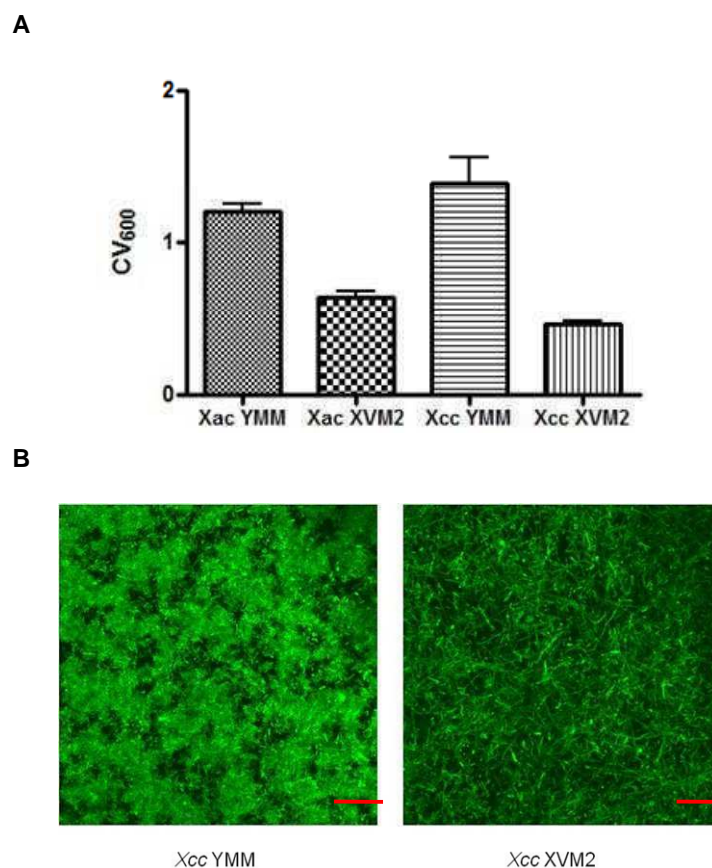


Figura 1.2: Desarrollo del biofilm en el medio XVM2: A) Adhesión de las bacterias *Xac* y *Xcc* en placas de poliestireno, las placas fueron reveladas con la técnica de CV. B) Formación del biofilm maduro de *Xcc*, imágenes tomadas con un microscopio confocal invertido luego de 4 días a 28°C sin agitación. Zoom utilizado 1000x.

Ambas cepas se adhirieron menos al soporte abiótico cuando se utilizó el medio XVM2 que al utilizar el YMM (Fig. 1.2A). Por otro lado las bacterias *Xcc* no forman las estructuras tridimensionales características de un biofilm maduro (Fig. 1.2B.).

Otro factor más que hay que tener en cuenta cuando se estudian los biofilms es el soporte que se va a utilizar como superficie abiótica. Se ensayaron tres tipos de materiales: vidrio (tubos de ensayo, borosilicato), polipropileno (tubos eppendorfs) y poliestireno (en forma de placas *multiwells* de 96 pocillos). En todos los casos las células fueron crecidas en medio rico (PYM) y diluidas en YMM. Se colocaron alícuotas en los distintos materiales y luego de 24 hs a 28°C sin agitación se revelaron con la técnica de cristal violeta (ver materiales y métodos). Tanto en el polipropileno como en vidrio la cepa silvestre se adhirió en mucho menor grado que cuando utilizamos placas de poliestireno (Fig. 1.3). Se decidió entonces continuar con este tipo de soporte para realizar todos los ensayos de adhesión tiñendo a las células con la solución del pigmento cristal violeta (CV).

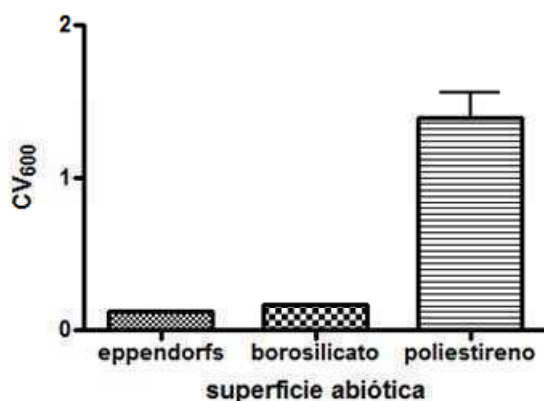


Figura 1.3: Ensayo con distintos tipos de superficies abióticas en la adhesión de *Xcc*. Se Dejaron las bacterias en los distintos medios por 24 horas a 28°C sin agitación. Luego se realizó la tinción con CV. El ensayo se repitió 3 veces de forma independiente. N=3.

La tinción con cristal violeta es una metodología que no nos permite diferenciar las diferentes etapas en el desarrollo del biofilm, nos permite solamente determinar de manera indirecta cuantas células se encuentran adheridas al sustrato. El uso del microscopio confocal invertido fue necesario para poder observar directamente este proceso. Para poder realizar los ensayos en este microscopio hizo falta obtener bacterias expresando constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Se utilizaron unas cámaras especiales y se fue siguiendo el proceso día a día.

B) Etapas caracterizadas del desarrollo del biofilm de *Xac*.

En trabajos publicados por nuestro grupo se pudo observar a través de microscopía confocal (CSLM) que *in vitro* *Xac* es capaz de formar estructuras tridimensionales. Éstas se desarrollan en medio mínimo y sin agitación (50). Como se mencionó anteriormente, para realizar los experimentos donde se observa la progresión en el desarrollo del biofilm se utilizaron unas cámaras cuya base es de poliestireno y los bordes de borosilicato. Las bacterias, logran adherirse y desarrollar un biofilm maduro. Dependiendo de la cantidad inicial de células de la que se parte el biofilm tarda entre 4 y 5 días en desarrollarse y se puede observar claramente las diferentes etapas que se encuentran descritas en bibliografía.

Utilizando la cepa silvestre de *Xac*, transformada con el plásmido que contiene la GFP, se observó que, durante el primer día del proceso las bacterias comienzan a adherirse al vidrio principalmente por uno de sus polos (Fig. 1.4A), en la foto aparecen como puntos verdes, esto se debe a la proteína GFP que se expresa constitutivamente. Luego rotan quedándose unidas de forma irreversible a través de sus superficies laterales (Fig. 1.4B), la cantidad de bacterias unidas a la base de las cámaras va aumentando a medida que pasa el tiempo (Fig. 1.4C, D, E).

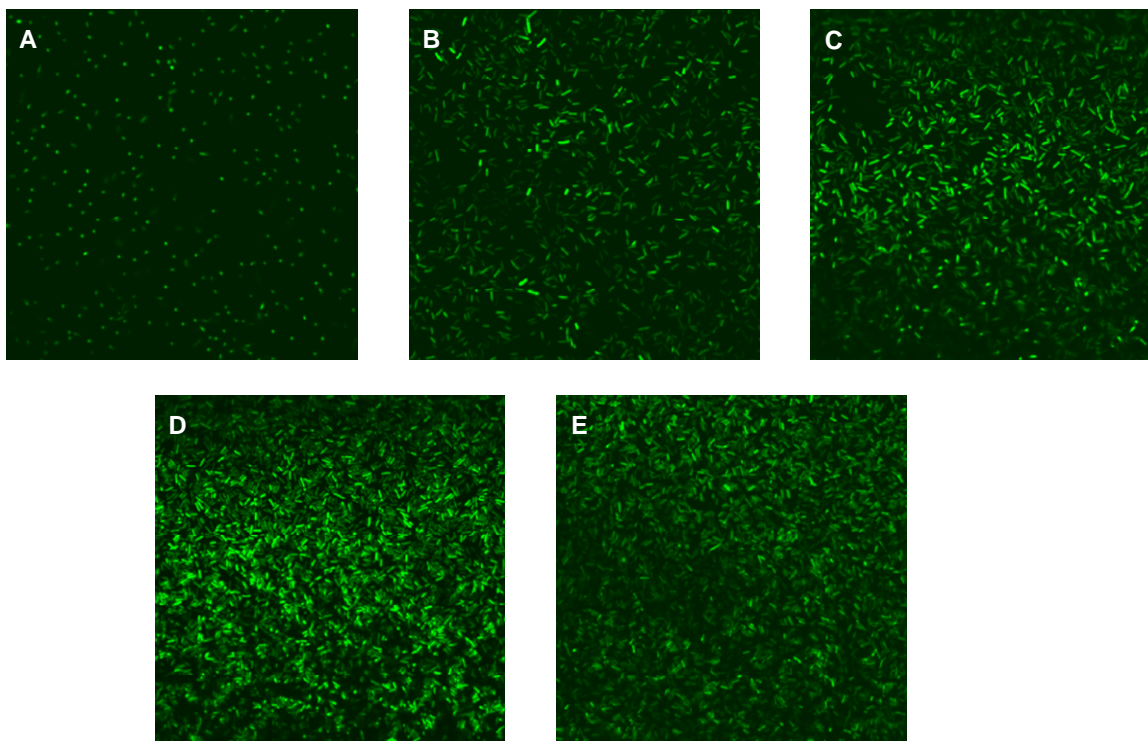


Figura 1.4: Fotos de la base de las cámaras inoculadas con *Xac* en medio mínimo. De izquierda a derecha (de A a E), días 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. Zoom utilizado 1000x.

Entre el tercer y cuarto día las bacterias comienzan a desarrollar microcolonias (Fig. 1.5) que luego darán origen a los pilares de bacterias que conforman el biofilm maduro (Fig.1. 6). La estructura final contiene columnas de bacterias unidas entre sí por sus laterales (Fig. 1.7 y 1.8) y canales de agua que permiten el flujo de líquido, nutrientes, oxígeno y remoción de desechos. En etapas posteriores se observan grupos de bacterias pioneras, las cuales se desprenden de la estructura mayor (Fig.1.6) para poder colonizar nuevas superficies.

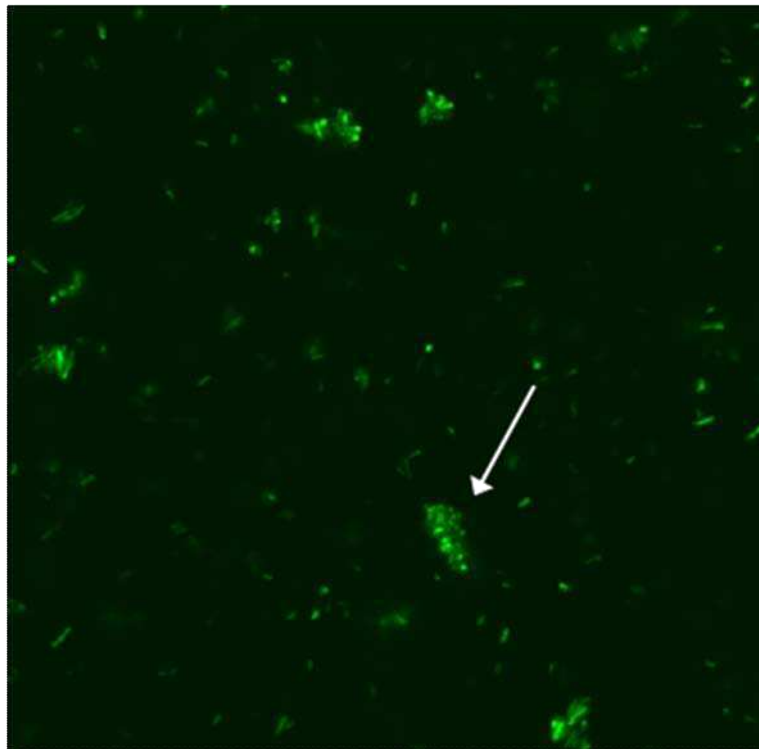


Figura 1.5: Foto del día 4 de la formación del biofilm de *Xac*. La distancia desde la base de la cámara es de 9 μm . La flecha indica una microcolonia. Zoom utilizado 1000x.

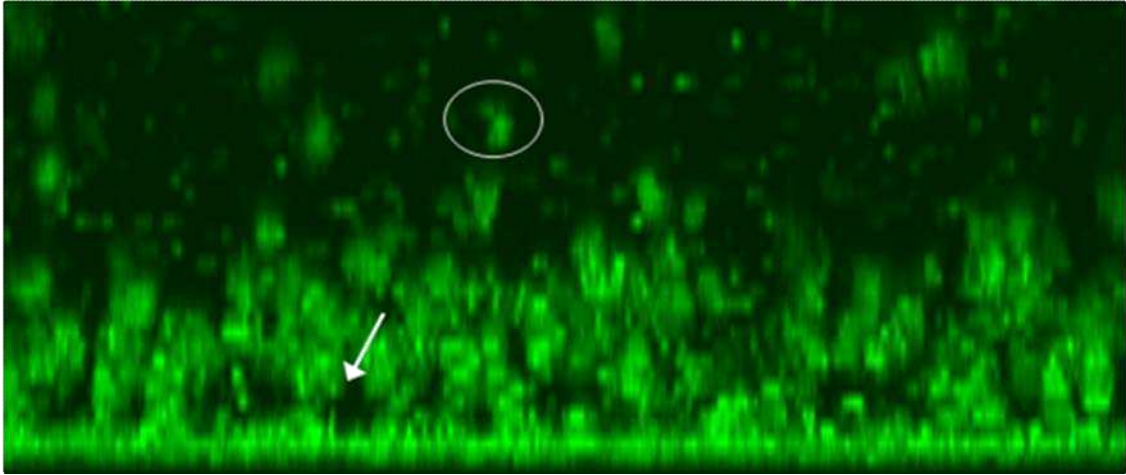


Figura 1.6: Proyección xz del biofilm maduro en medio mínimo de *Xac* a los 5 días. La flecha indica un canal de agua, el círculo indica un grupo de bacterias pioneras. Zoom utilizado 1000x.

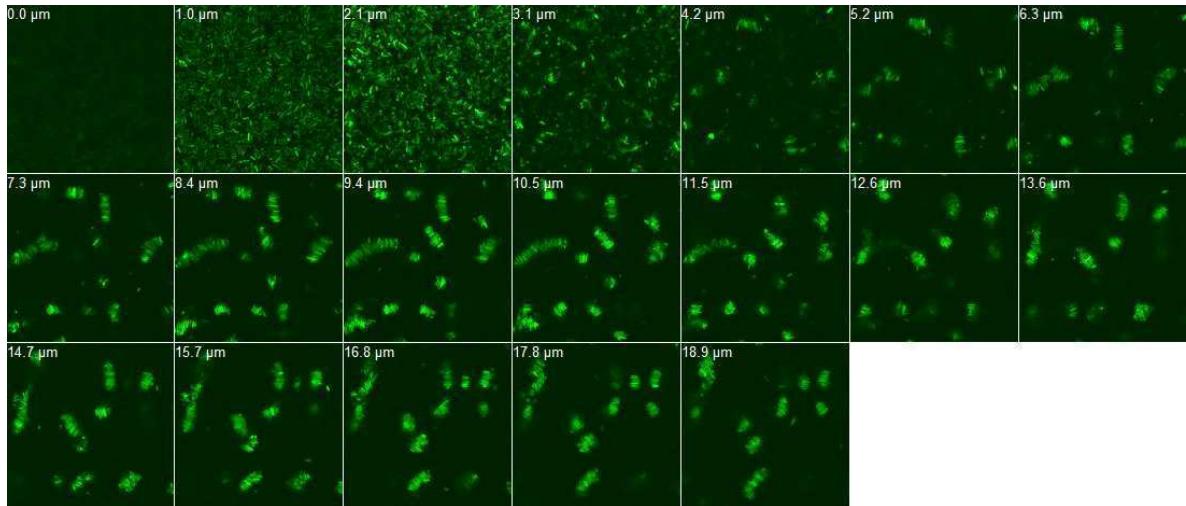


Figura 1.7: Biofilm de *Xac* desde distintas alturas de la base. Zoom utilizado 1000x y 2X digital. Las fotos corresponden al día 4.

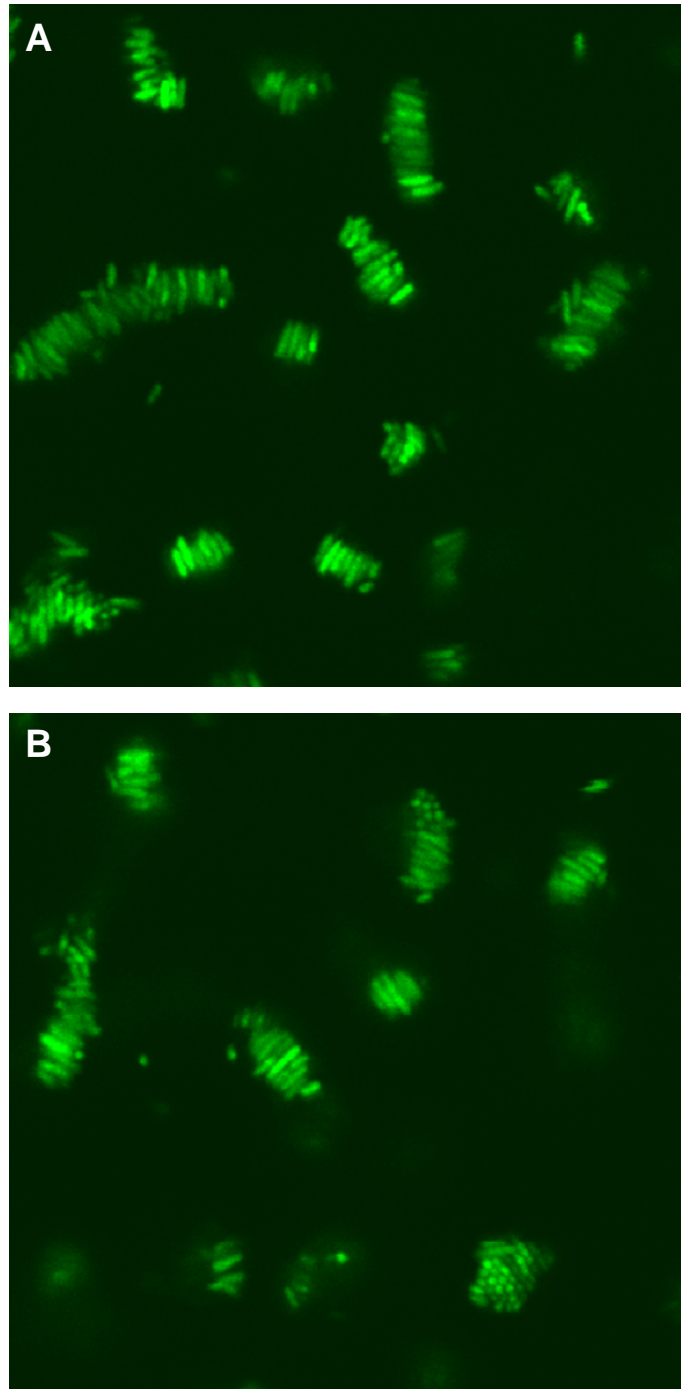


Figura 1.8: Imagen del día 5 de la formación del biofilm de *Xac*. La distancia desde la base de la cámara es de 9 y 14 μm respectivamente de izq. a der. Zoom utilizado 1000x y 2x digital.

2. La importancia del flagelo en el desarrollo del biofilm de *Xac*

Xanthomonas axonopodis pv *citri* posee un solo flagelo polar (133). Como ya se mencionó anteriormente en la introducción, esta estructura está compuesta por aproximadamente 40 proteínas que se las puede organizar en 4 grandes grupos: la estructura externa, el cuerpo basal, el complejo motor y el aparato exportador (134).

Para que un microorganismo logre colonizar un tejido el primer paso es acercarse a la superficie, adherirse y lograr mantenerse unido. Distintos tipos de apéndices presentes en las bacterias cumplen esta función. Como ya se mencionó anteriormente el flagelo, además de servirle a la bacteria para la movilidad también cumple una función en el momento de adhesión a un sustrato (76, 106) de *E.coli* (135). Se vio que en algunos casos esta estructura también es importante en las etapas posteriores del desarrollo del biofilm (76).

Sin embargo también existen estudios donde se plantea que el flagelo no es esencial para la formación del biofilm, de *Pseudomonas aeruginosa* (136) y de *Pseudomonas fluorescens* (137).

Teniendo en cuenta entonces los datos bibliográficos nos propusimos estudiar el rol del flagelo en el desarrollo del biofilm de *Xac* *in vitro* e *in vivo*. Para esto se realizaron dos mutantes en los genes *flgE* y *fliC*.

A) Construcción de mutantes en genes flagelares.

Se decidió generar mutantes del flagelo en las proteínas que forman parte de la región externa del mismo. La proteína FlgE, conforma el gancho flagelar y la proteína FliC da origen a la flagelina. Ambas estructuras están formadas por un centenar de subunidades unidas entre si. Estas proteínas se encuentran codificadas por 2 clusters de genes en diferentes regiones del genoma de *Xac* (Fig. 1.9 A)

Se realizó la mutante *Xac* Δ *fliC* (*fliC*) introduciendo una delección de 950 pb en la secuencia del gen *fliC* (el gen posee 1200 pb) eliminando el extremo N-terminal de la proteína. La mutante *Xac* *flgE*:: Ω (*flgE*) tiene una inserción del cassette omega en el gen *flgE* confiriéndole resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomicina, además de una delección de 212 pb (el gen posee 1224 pb) (Fig. 1.9B). Las mutantes fueron confirmadas por PCR (Fig. 1.9C) y además se realizó una tinción del flagelo corroborando la ausencia del mismo en las cepas mutantes (Fig. 1.9D).

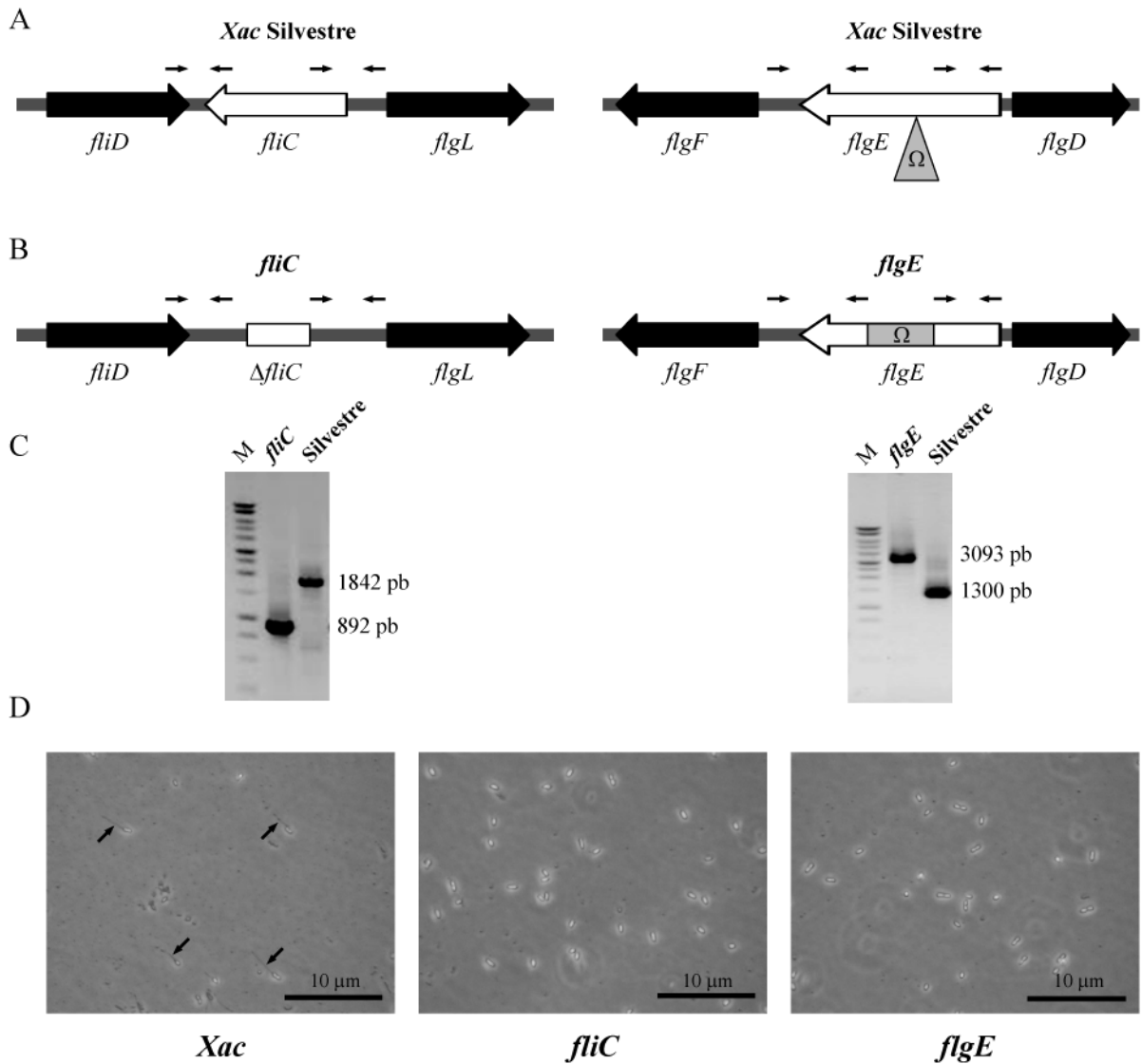


Figura 1.9: mutantes del flagelo. **A)** Mapa de la región *fliC* y *flgE* que muestra la disposición genómica de genes flagelares en *Xac*. **B)** Mutantes de los genes *fliC* y *flgE*, las flechas negras y blancas muestran los genes y la dirección en la cual se transcriben. Las flechas más pequeñas corresponden a los oligonucleótidos utilizados para realizar la mutagénesis. **C)** PCRs de las cepas mutantes y la silvestre para ambos genes. **D)** Tinción del flagelo, imágenes obtenidas con un microscopio óptico. Las flechas indican la presencia del flagelo. El aumento utilizado fue de 1000X. Barra de escala, a 10 μm .

B) Rol del flagelo en la movilidad

Se observó en otros microorganismos que poseen un flagelo la capacidad de moverse en medios de cultivo líquido y a través de un agar blando (131, 138). En *Xac* no se había estudiado este tipo de movilidad al momento de comenzar con esta tesis. Para determinar si el flagelo que posee *Xac* es funcional, se realizaron ensayos de movilidad. En todos los experimentos de movilidad las bacterias fueron crecidas en

medio PYM hasta llegar a la fase estacionaria y 3 μ l de los cultivos fueron inoculados en las diferentes placas (dependiendo del ensayo).

Se inocularon las cepas mutantes *fliC* y *flgE* junto con la silvestre en una placa de agar blando (0,25% de agar). Luego de 72 horas a 28 °C se observó un halo de movilidad menor en el caso de las cepas mutantes (Fig. 1.10). Estos resultados indicarían que *Xac* utiliza su flagelo para realizar el movimiento de *swimming*. También se pudo observar que la cepa silvestre es capaz de moverse en un medio de cultivo líquido, por el contrario ambas mutantes del flagelo no pudieron realizar este movimiento (datos no mostrados).

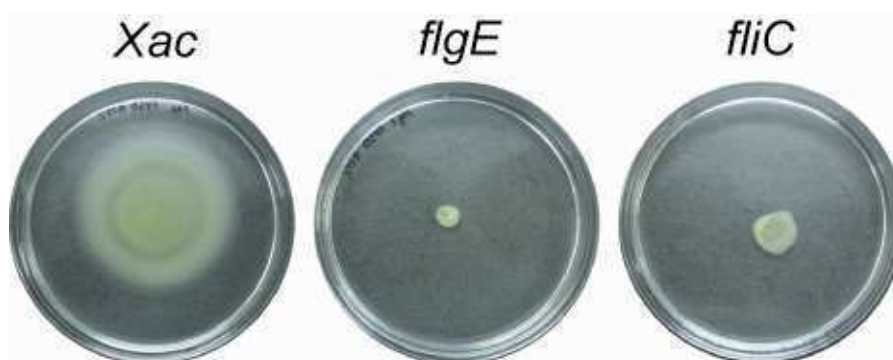


Figura 1.10: Swimming en agar blando. Medio NYGB 0,25% agar de *Xac*, *flgE* y *fliC*. Placas incubadas por 72 horas a 28°C. La imagen es la más representativa de 5 experimentos independientes.

Existen, además del *swimming*, otros tipos de movimientos, tales como *swarming*, *sliding*, *gliding* y *twitching* (139).

Con el propósito de determinar si *Xac* es capaz de realizar *swarming* se realizaron ensayos de movilidad en placas de *swarming*, según lo descrito para otras bacterias, éstas posee una concentración de agar un poco mayor que para el estudio de *swimming* (agar 0.5%). En la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (140) se relaciona la estructura flagelar con este movimiento, en medios semisólidos hay cambios en el número de flagelos y a veces también en su posición (141).

Se observó, que a diferencia de lo que ocurre en otras bacterias, *Xac* posee la capacidad de moverse sin la utilización del flagelo en un medio semisólido (Fig. 1.11). Este movimiento parece ser, lo que otros autores denominaron *sliding* (del inglés: deslizamiento) (142) donde el movimiento se debe a una fuerza expansiva de un cultivo en crecimiento en combinación con las propiedades de la superficie de las bacterias que resultan en la disminución de la fricción entre las células y el sustrato.

Las bacterias se encuentran fuertemente unidas formando una sola capa, esta hoja se mueve uniformemente como una unidad (139).

A este tipo de movimiento, de ahora en más lo llamaremos *sliding*, ya que parece tener algunas de las características descritas antes (139). Al observar al microscopio los bordes de los halos formados las bacterias parecen estar muy unidas y embebidas por una sustancia que parece ser el exopolisacárido que disminuye el rozamiento entre las células y el substrato (datos no mostrados).

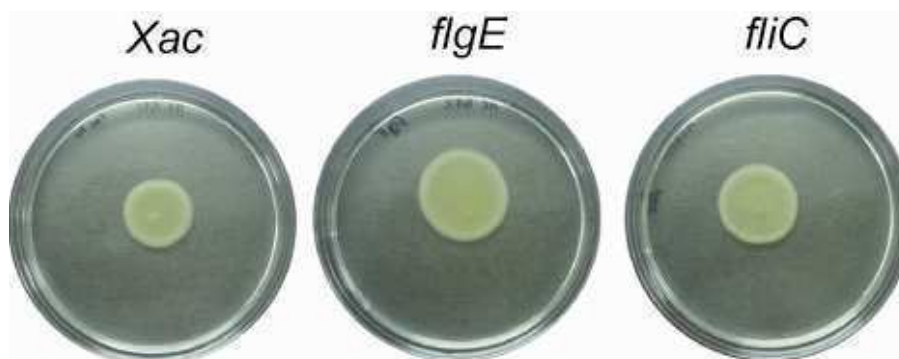


Figura 1.11: Movilidad en placas de swarming. PYM 0,5% agar de *Xac*, *flgE* y *fliC*. Placas incubadas por 72 horas a 28°C. La imagen es la más representativa de 5 experimentos independientes.

Se complementaron ambas cepas deficientes en la movilidad con el plásmido pLARF3 y secuencias que corresponden a cada uno de los genes. Como se observa en la figura 1.12 ambas mutantes recuperaron parcialmente la movilidad en las placas de *swimming*. El plásmido vacío no modificó el fenotipo de la mutante *flgE*.

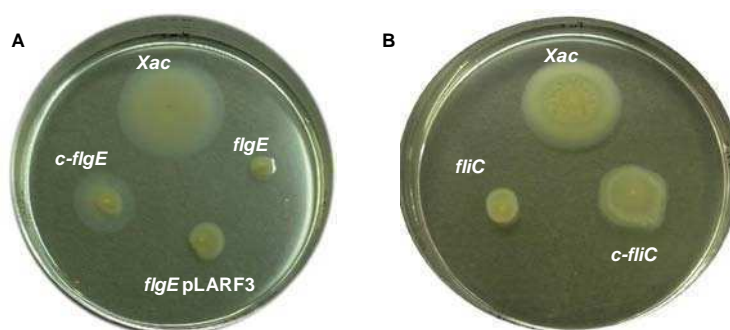


Figura 1.12: Movilidad en placas de swimming de las mutantes complementadas. **A)** *c-flgE*, es la cepa deficiente *flgE* con el plásmido pLARF3 conteniendo la secuencia para complementarla. *flgE*-pLARF3, es la misma cepa con el plásmido vacío. **B)** *c-fliC*, es la cepa deficiente en *fliC* con el plásmido pLARF3 conteniendo la secuencia necesaria para complementarla.

Con el objetivo de determinar si ambos movimientos eran dependientes del sistema de quórum sensing DSF/*rpf* y de la presencia de exopolisacárido se realizaron

ambos ensayos de movilidad con las diferentes mutantes de este sistema. Se utilizaron las cepas ya caracterizadas *rpfF* (sobreproduce DSF y no los sensa), *rpfC* (no produce DSF) y *gumB* (no sintetiza xantano) (50). Como se puede observar en la figura 1.13 ambos movimientos dependen de que el sistema de quorum sea funcional. Las mutantes en los genes *rpf* tienen menor capacidad de movilidad en ambos medios. Por otro lado la mutante del exopolisacárido sólo se vio disminuida en el movimiento observado en el medio semisólido (Fig. 1.13 B).

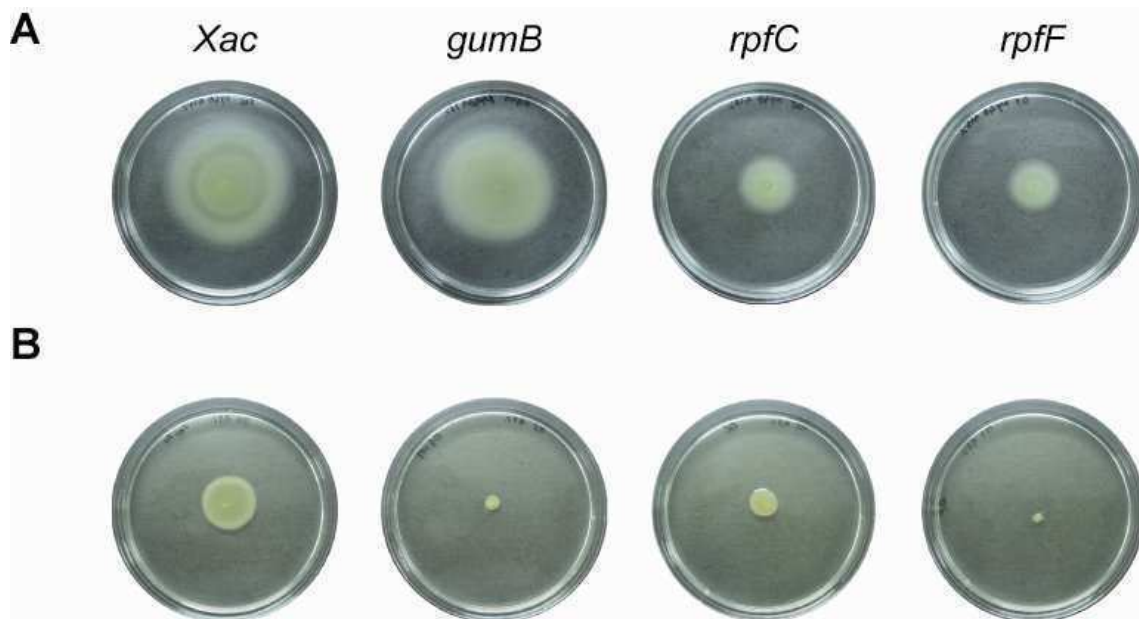


Figura 1.13: Movilidad de las mutantes del quórum y del xantano. A) *Swimming* y B) *sliding*. Placas incubadas por 72 horas a 28°C. La imagen es la más representativa de 5 experimentos independientes.

La regulación de los movimientos de *swimming* y *sliding* por quórum sensing, fue confirmada por complementación en ensayos de co-inoculación, donde se colocó la misma cantidad de una cepa que de otra, entre las cepas mutantes *rpfF* y *rpfC* en placas de movilidad y se pudo observar que se restauran los dos tipos de movimientos (Fig. 1.14 A y B).

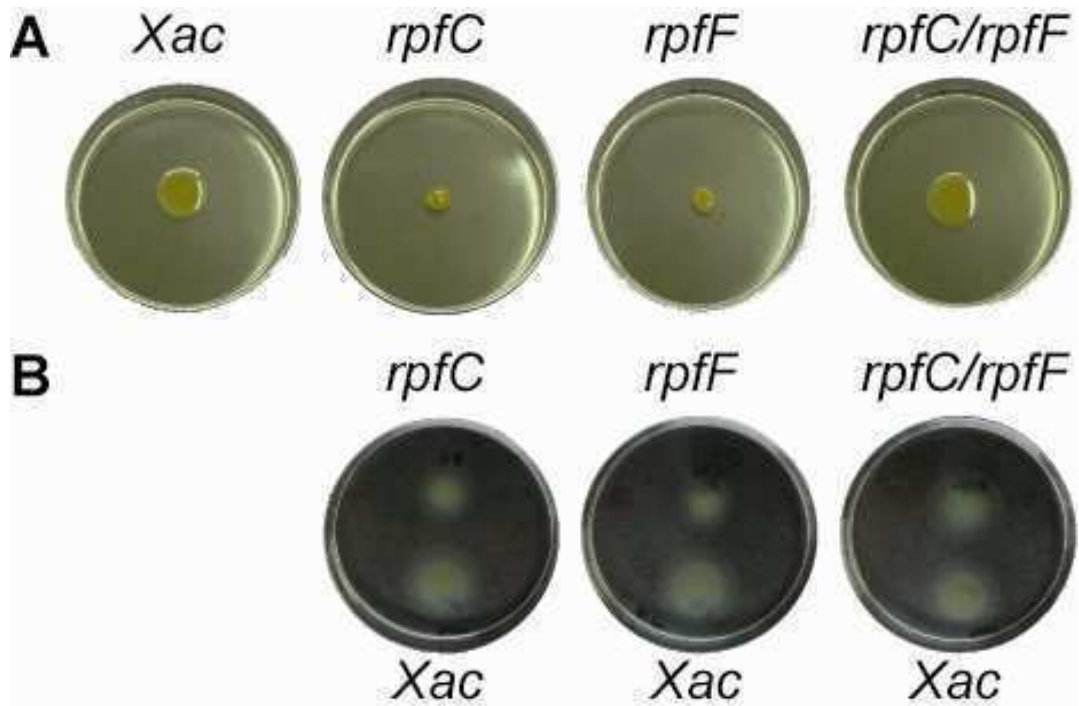


Figura 1.14: Co-inoculación de las cepas defectuosas en los genes del quórum sensing. **A)** Ensayo de *sliding* **B)** Ensayo de *swimming*. En ambos casos las placas se mantuvieron a 28°C, durante 2 días.

Por otro lado, se evaluó la expresión de los genes *fliC* y *gumB* en estas mismas mutantes. Para esto se crecieron en medio mínimo, las cepas mutantes junto con la silvestre hasta llegar a su fase estacionaria, se extrajo el RNA y se realizó una RT-PCR. Como se ve en la figura 1.15 existe una reducción en la expresión de ambos genes (*fliC* y *gumB*) en ambas mutantes al compararlo con la cepa silvestre, esto explica porque las mutantes se encuentran afectadas en ambos movimientos.

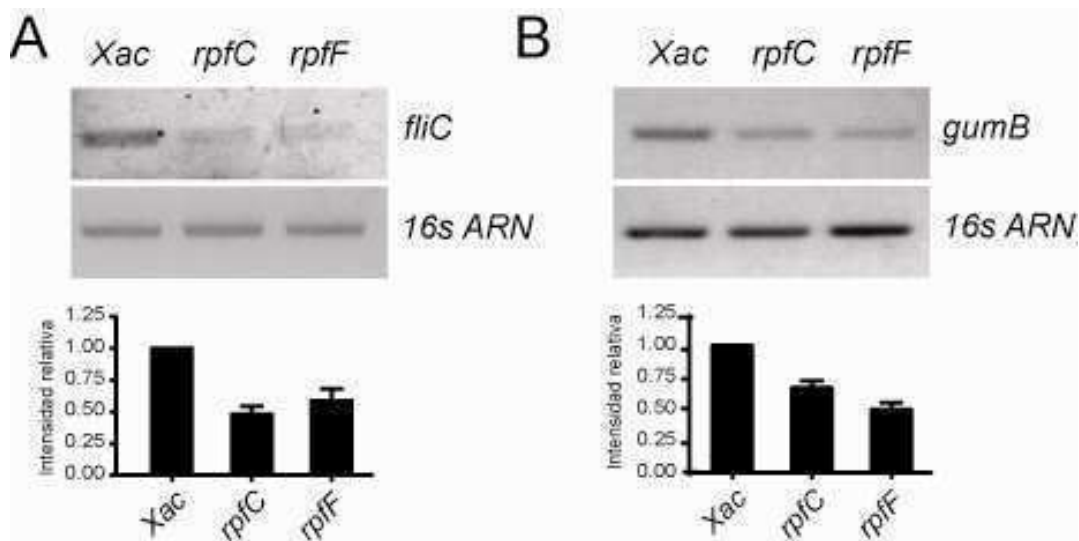


Figura 1.15: RT-PCR de las mutantes en los genes del sistema DSF/RPF para los genes **A) *gumB*** y **B) *fliC***. En ambos casos se utilizó el 16s como gen *housekeeping*

C) Participación del flagelo en la adhesión *in vitro*

Para evaluar si la presencia de la estructura flagelar es necesaria en las etapas tempranas del desarrollo del biofilm de *Xac* se realizaron ensayos de adhesión. Por un lado se estudio esta capacidad utilizando tiempos cortos y cultivos crecidos en medio mínimo a 28°C durante 12 horas (Figura 1.16A) determinando, de esta manera, la implicancia de la estructura flagelar en la adhesión temprana. También se observó la capacidad de la cepa silvestre y de las cepas mutantes de formar un biofilm en condiciones de crecimiento paulatino, con mayores tiempos y menor cantidad inicial de bacterias (Figura 1.16B).

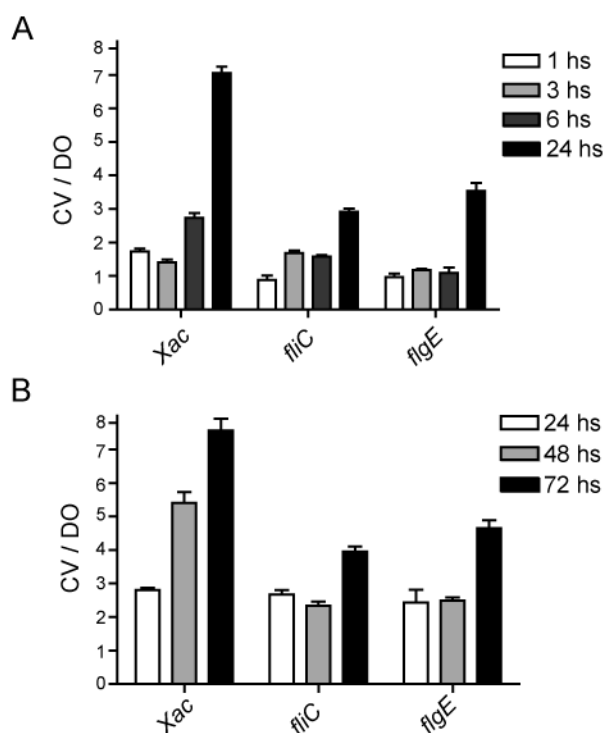


Figura 1.16: Ensayos de adhesión a una superficie abiótica A) a tiempos cortos. **B)** Ensayo de adhesión a una superficie abiótica a tiempos largos. N=8, en ambos casos se realizaron 3 experimentos independientes, los gráficos muestran los resultados de uno de ellos en cada caso.

En los dos ensayos se utilizaron placas de elisa de 96 pocillos y se utilizó un N=8 repitiendo el experimento 3 veces de manera independiente. Con la técnica de tinción con cristal violeta (CV) se pudo cuantificar de manera indirecta las bacterias

que permanecen adheridas al sustrato. Antes de realizar la tinción se midió la DO de los cultivos, para asegurarse que estaban crecidos de manera similar. Este dato además se utilizó para normalizar los resultados de la tinción de las células adheridas con cristal violeta (materiales y métodos). En el ensayo a tiempos cortos se observa que la cepa silvestre, al igual que las mutantes, no se adhiere durante las primeras horas, recién a las 24 hs hay una adhesión significativa. Por otro lado ambas mutantes no logran adherirse en ningún momento de la misma manera que la cepa silvestre. Este resultado estaría indicando la importancia de este apéndice en la unión temprana de la bacteria al sustrato (Fig. 1.16A).

En el ensayo de CV a tiempos largos (Fig. 1.16B), se puede ver que las mutantes y la cepa silvestre se adhieren de igual manera el primer día. La diferencia se ve, recién después durante el segundo y tercer día. A pesar de que las bacterias deficientes del flagelo se adhieren menos que la silvestre, no perdieron del todo esta capacidad.

D) Rol del flagelo durante el desarrollo del biofilm.

Para determinar si las bacterias que no poseen flagelo presentan diferencias en el desarrollo del biofilm *in vitro* se realizó un seguimiento utilizando las mismas cámaras con fondo de poliestireno mencionadas anteriormente. Las bacterias fueron transformadas con el plásmido pBBR2-GFP que posee resistencia a kanamicina y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente bajo un promotor de expresión constitutiva. Las bacterias fueron llevadas a la misma DO y se colocaron 500 μ l en cada pocillo. Las fotos muestran uno de los 3 ensayos realizados por duplicado y de forma independiente.

Al contrario de lo que ocurre con la cepa silvestre las mutantes del sistema flagelar (*fliC* y *flgE*) no ocupan la totalidad del pocillo (Fig. 1.17). En la figura las flechas están indicando las regiones no colonizadas por las cepas mutantes.

Este resultado, junto con lo observado en el ensayo de tinción con cristal violeta de las células adheridas, nos permite especular que para poder abarcar toda la superficie de adhesión sería necesaria la presencia de flagelo entero. El flagelo estaría implicado en la movilidad temprana de las células adheridas.

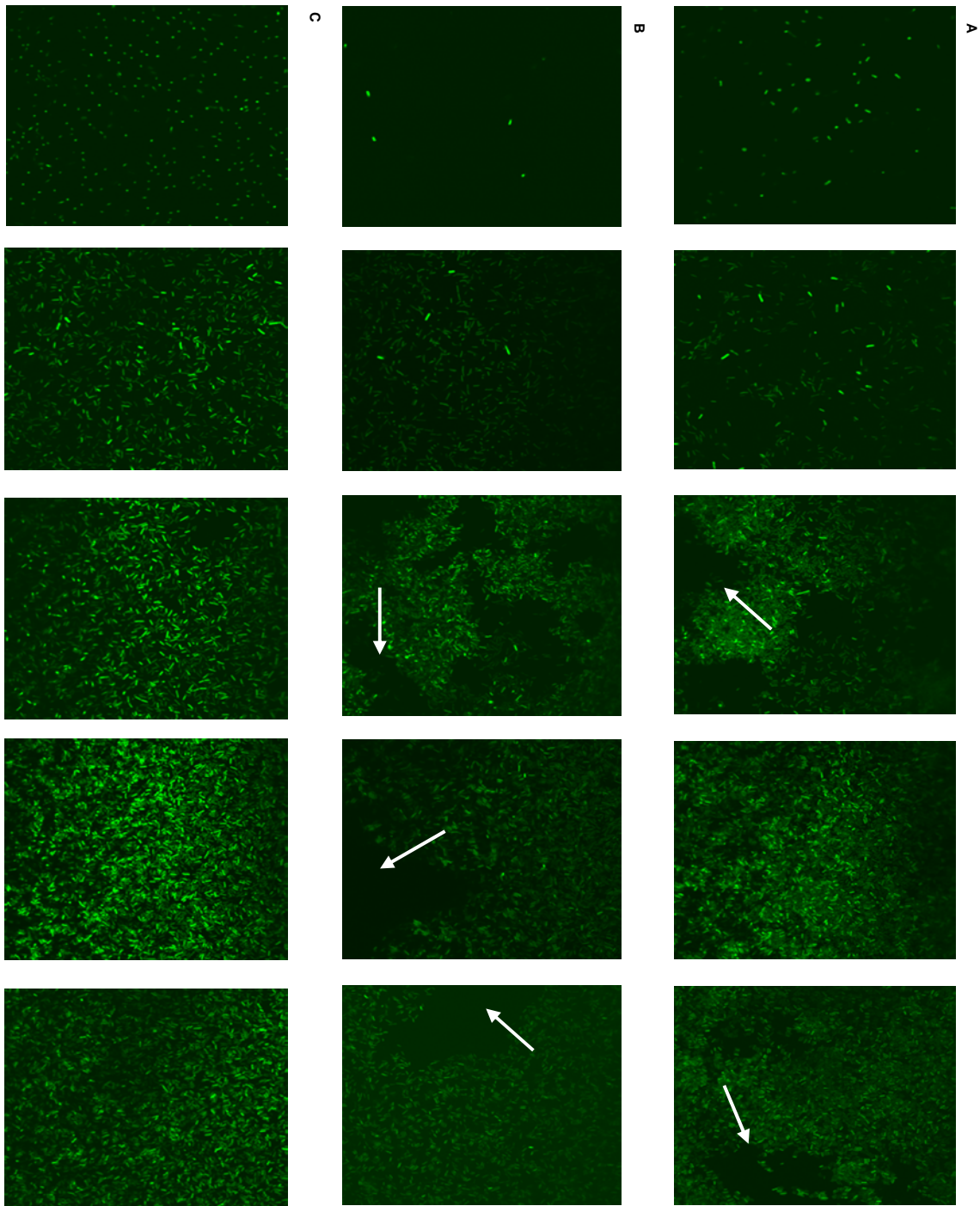


Figura 1.17: Fotos de la base de las cámaras inoculadas con A) *fliC*, B) *flgE* y C) cepa silvestre en medio mínimo. De arriba hacia abajo, días 1, 2, 3,4 y 5. Zoom utilizado 1000x. Las flechas señalan las regiones sin colonizar en las mutantes en los diferentes días.

Llamativamente estas cepas tampoco fueron capaces de organizarse formando canales de agua y columnas (Fig. 1.18). Las agrupaciones de bacterias no llegaron a madurar y de esta manera no pudo formarse una estructura ordenada. En la proyección xz del quinto día no se ven canales de agua, por otra parte la estructura formada es muy compacta (Fig. 1.18). Sin embargo imágenes de mayor aumento

permitieron observar las uniones entre las bacterias y constatar que se unen de igual manera que la cepa silvestre (Fig. 1.19), la flecha señala agrupaciones de bacterias unidas lateralmente entre sí.

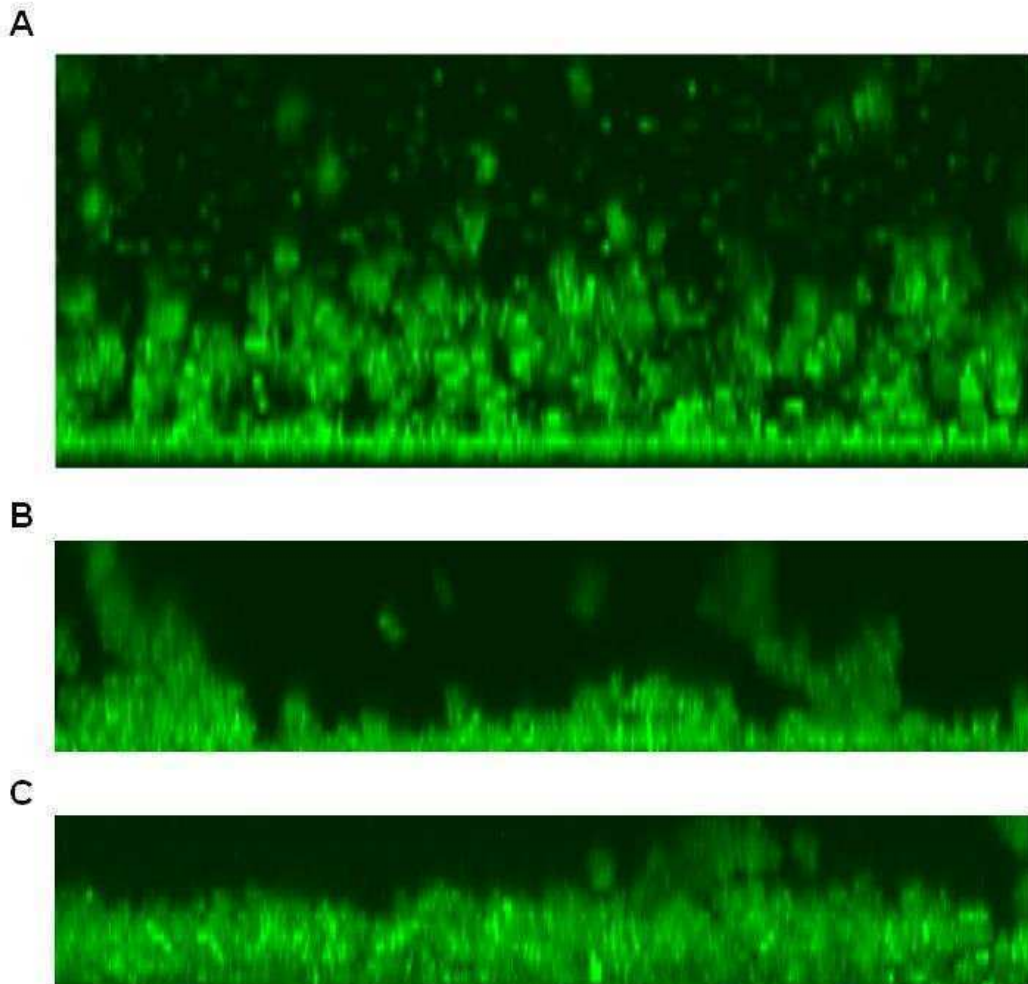


Figura 1.18: Proyección xz del biofilm maduro de A) Cepa silvestre B) *fliC* y C) *flgE* en medio mínimo. Zoom utilizado 1000x.

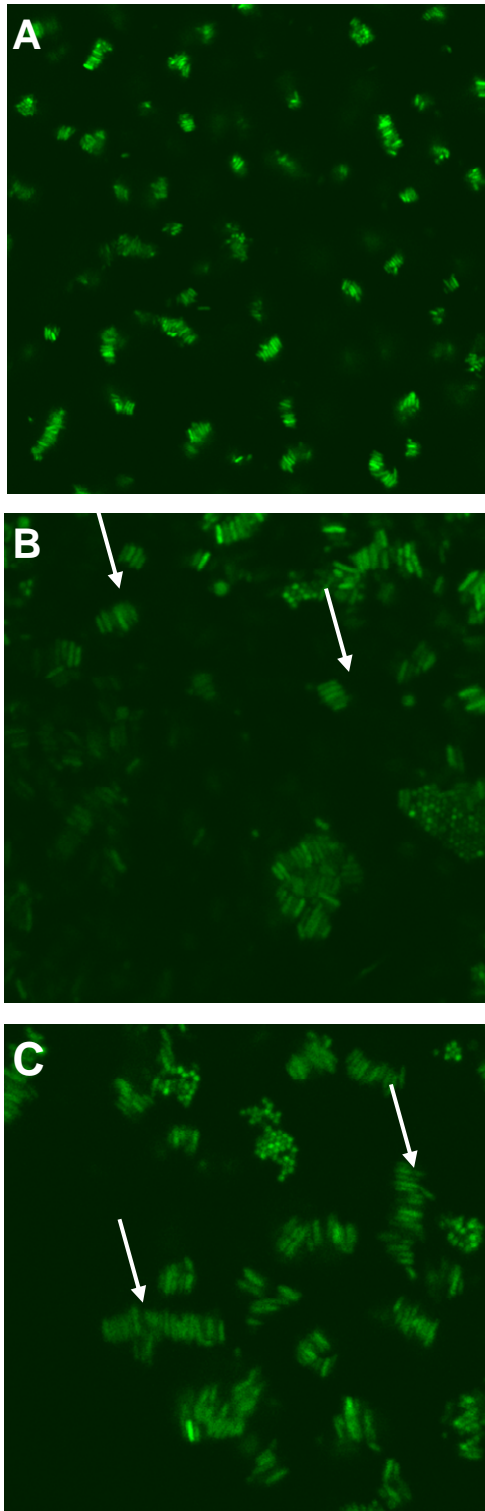


Figura 1.19: Biofilm maduro de A) *Xac* B) *fliC* y C) *flgE*. La distancia desde la base de la cámara es de 3 μm en ambos casos. Las flechas indican a las bacterias unidas de forma lateral. Zoom utilizado 1000x y 2x digital.

F) El flagelo está involucrado en la maduración del biofilm sobre la superficie de las hojas y es requerido parcialmente en el crecimiento bacteriano y en el desarrollo de canchros.

En trabajos publicados anteriormente por nuestro laboratorio se observó que *Xac* es capaz de formar estas estructuras ordenadas en las superficies de las hojas a diferencia de la mutante en el gen *gumB* que no lo hace (50). Los ensayos *in vivo* se realizaron inoculando las hojas mediante el método de aspersión con las cepas *Xac* silvestre, *fliC* y *flgE* a una DO de 1×10^6 ufc/ml. Esta forma de inocular las bacterias se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza ya que esta bacteria es transportada por el viento y la lluvia. Luego de 6 días post inoculación se observaron las hojas en un microscopio confocal invertido. Como se observó anteriormente (50) la cepa silvestre forma agregados típicos de un biofilm. Por el contrario las mutantes del flagelo se encuentran formando pequeños agregados en el caso de *fliC* o directamente de manera dispersa (*flgE*) (Fig. 1.20D). La mutante del gancho flagelar, *flgE*, se vio más afectada que la mutante de la flagelina, *fliC*, sugiriendo que esta estructura también podría estar involucrada en la adhesión. Al estudiar la cantidad de canchros formados por las diferentes cepas en las hojas infectadas, la mutante *fliC* no mostró diferencias significativas con la *Xac* silvestre en ninguna de las dos condiciones ensayadas. Por el contrario se observa que la cepa *flgE* se encuentra más comprometida en su capacidad de formar canchros (Fig. 1.20A y Fig. 1.20B). Cuando comparamos el número de bacterias crecidas en la planta, la mutante *flgE* volvió a mostrar una mayor reducción que la mutante *fliC* en comparación con la cepa silvestre (Fig. 1.20C).

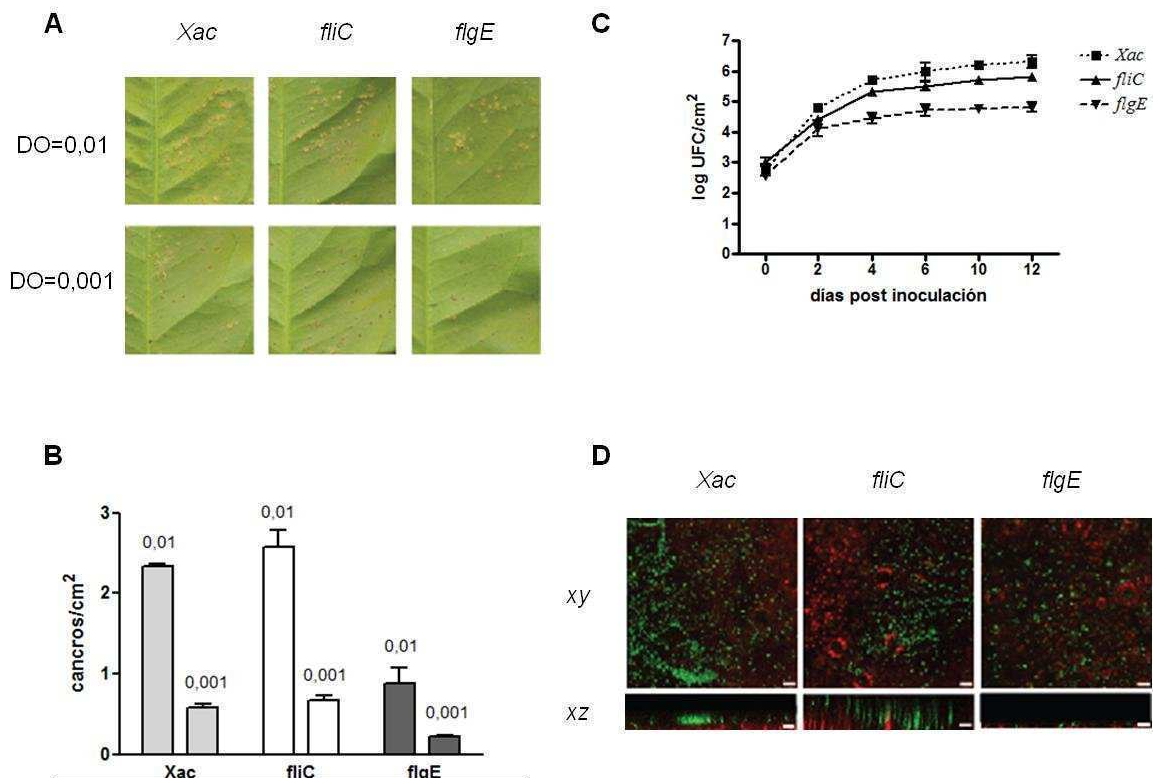


Figura 1.20: Formación del biofilm, crecimiento bacteriano y desarrollo del cancro en hojas infectadas utilizando el método de aspersión. A) Hojas de limón infectadas con 1×10^4 (DO=0,01) y 1×10^5 (DO=0,001) ufc/ml luego de 22 días. B) Cuantificación de los cancros en la superficie de las hojas, los valores están expresados como promedios de 4 ensayos independientes \pm desviación estándar. C) Crecimiento *in vivo* de las cepas de *Xac* en hojas de infectadas con 1×10^6 ufc/ml. Los valores están expresados como el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar. D) Hojas de *C. limon* fueron inoculadas con una suspensión de 1×10^6 ufc/ml de las diferentes cepas conteniendo la proteína GFP. Los paneles muestran la proyección en los planos xy y xz con una amplificación de 100x luego de 6 días de la inoculación con *Xac*, *fliC* y *flgE*. Se realizaron tres experimentos independientes.

3. La adhesina filamentosa FhaB.

En muchos microorganismos la adhesión es de vital importancia para que ocurra una exitosa infección (143). EL rol de la adhesión en la patogenicidad fue demostrado en los patógenos de plantas: *Agrobacterium tumefaciens* y *Xylella fastidiosa* (79, 132, 144).

Existen distintos tipos de estructuras importantes en la adhesión de las bacterias, tanto las fimbriales como las no fimbriales que se conocen comúnmente como adhesinas (145, 146). Dentro de las adhesinas fimbriales se encuentra el pili de tipo IV (147) que sirve en diversas funciones tales como la agregación de bacterias, formación de microcolonias y movilidad de tipo twitching (141, 148). Las adhesinas no fimbriales están altamente representadas en los grupos α -, β - y γ -proteobacteria y

contienen distintas clases de proteínas implicadas en la adhesión (149) . Estas proteínas pertenecen a la familia de autotransportadores que contienen los transportadores triméricos, por ejemplo XadA y YadA (150) y al sistema de secreción de dos proteínas como las hemoaglutininas filamentosas, FhaB y YapH (151).

Se encontraron muchos genes que codifican para estructuras de adhesión en los genomas de *Xanthomonas* spp. (13, 152) y estudios de genómica comparativa sugieren que tendrían un rol importante en la patogenicidad (10). Además se encontró que este gen posee su expresión aumentada cuando se crece la bacteria en el medio XVM2 (132).

Xac y *Xcc* poseen genes para el pili fimbriar de tipo IV que podrían actuar como adhesinas no fimbriales (132, 153).

Al jugar un rol importante en la adhesión se puede especular que también podría tener alguna implicancia en la formación del biofilm. Por esta razón se realizó una mutante en el gen que codifica para la proteína FhaB. Se trata de un gen muy grande que posee 14 262 pb (*Xac*1815). Para construir esta mutante se insertó el cassette Ω con resistencia a spectinomicina. Se eligió utilizar éste porque posee en su secuencia un terminador de la transcripción. De esta manera cuando se transcribe el gen que posee el cassette insertado sintetiza un transcripto de menor tamaño, sin la región que se encuentra rio abajo del cassette. Esta resistencia fue introducida al principio del gen (materiales y métodos).

A) Adhesión a sustratos *in vitro*

Para estudiar la adhesión temprana de esta mutante se realizó el ensayo de adhesión a tiempos cortos en medio mínimo de la misma manera que en el caso de las mutantes flagelares (Fig. 1.21A). Los resultados están expresados como adhesión relativa al crecimiento. Se puede observar que hay una diferencia significativa en los 4 tiempos ensayados.

A tiempos largos también se realizó utilizando la misma metodología que con las mutantes del flagelo. Se observa que al partir de una menor cantidad de bacterias también se ven diferencias significativas durante los tres días que duró el ensayo (Fig. 1.21B).

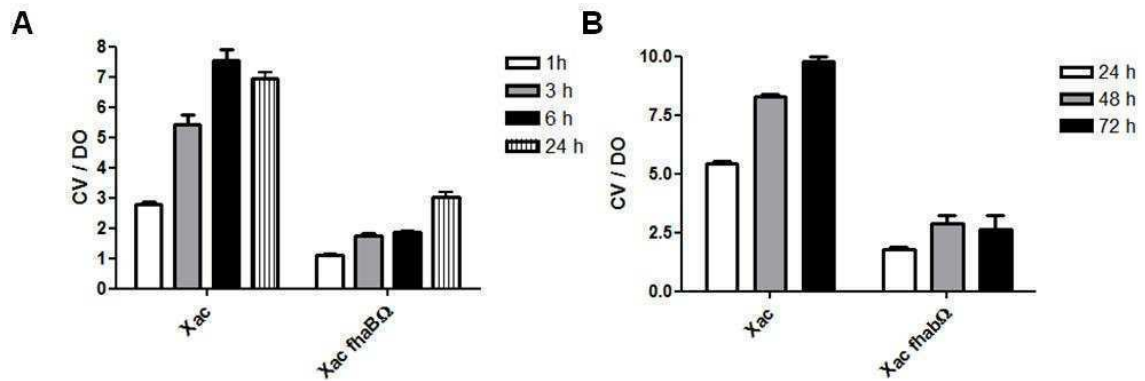


Figura 1.21: Ensayos de adhesión a una superficie abiótica. A) a tiempos cortos. N=8, el gráfico muestra los resultados de uno de ellos. **B)** Ensayo de adhesión a una superficie abiótica a tiempos largos. N=8, en ambos casos se realizaron 3 experimentos independientes, los gráficos muestran los resultados de uno de ellos en cada caso.

B) Desarrollo del biofilm de la mutante *fhaB*

Se realizaron los mismos ensayos efectuados para las mutantes flagelares, en el CSLM, con la mutante de la adhesina *fhaB*. Se pudo observar que esta mutante logra desarrollar un biofilm maduro, pero a diferencia de la cepa silvestre no se mantiene ordenado durante los 4 días del experimento (Fig. 22 y Fig. 23). Luego del tercer día el biofilm se desarma y las bacterias vuelven a estar en su mayoría en estado planctónico (últimas dos fotos de las figuras 22 y 23).

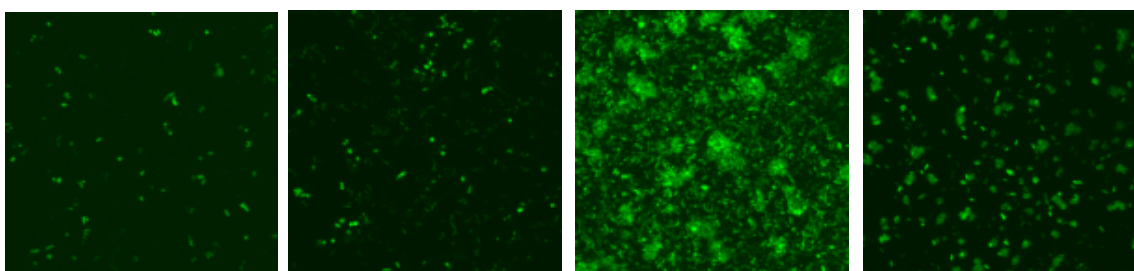


Figura 1. 22: proyección xy de la mutante en *fhaB*, de izquierda a derecha día 1, 2, 3 y 4.. Zoom 1000x.

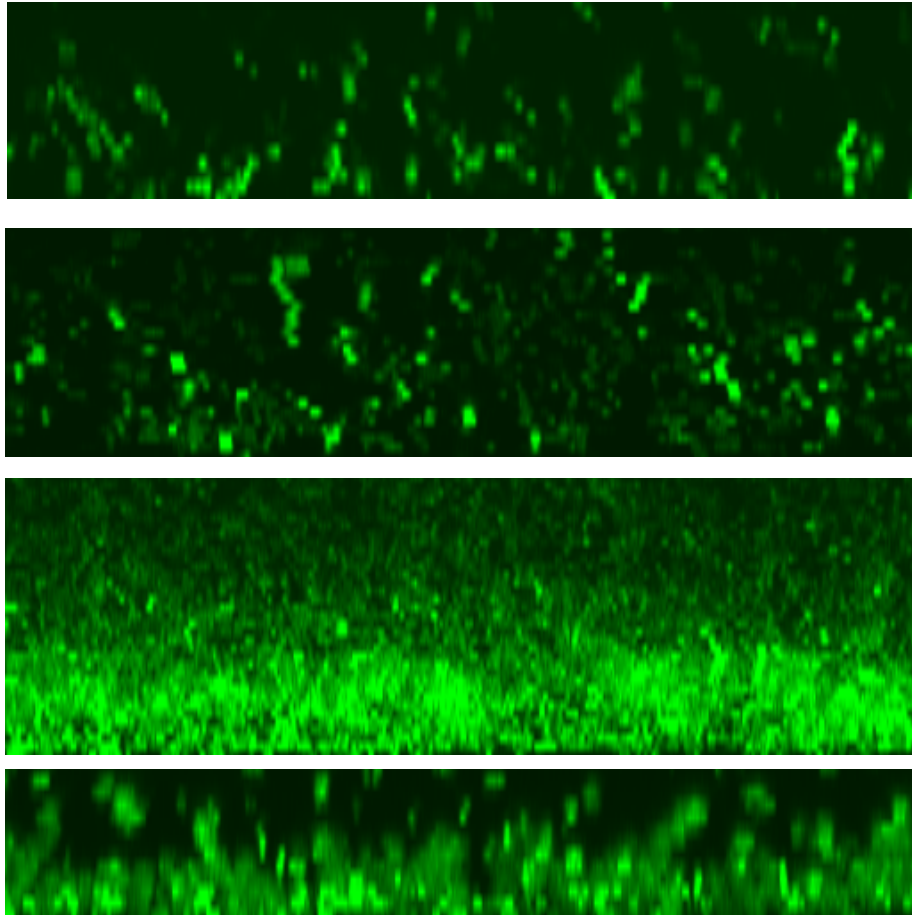


Figura 1.23: proyección *xz* de la mutante en *fhaB*, de arriba hacia abajo día 1, 2, 3, y 4. Zoom 1000x.

CAPITULO II: *Genes relacionados con la síntesis del sistema de secreción de tipo II y su rol en la formación del biofilm de Xac*

Gracias a la secuenciación del genoma de *Xac* se pudo determinar la presencia de dos sistemas de secreción de tipo II, T2S, (13), cuyos genes se encuentran organizados en dos agrupamientos génicos ó *clusters*:

xpsEFGHIJKLMND y

xcsCDEFGHIJKLMN

Hasta el momento estos sistemas no han sido caracterizados en *Xac*. Para estudiar si son funcionales, se utilizaron dos cepas mutantes una para cada uno de ellos. En ambos casos la mutación fue realizada en los genes que codifican para las proteínas del poro: *xcsD* (*Xac0695*) y *xpsD* (*Xac3534*) (119).

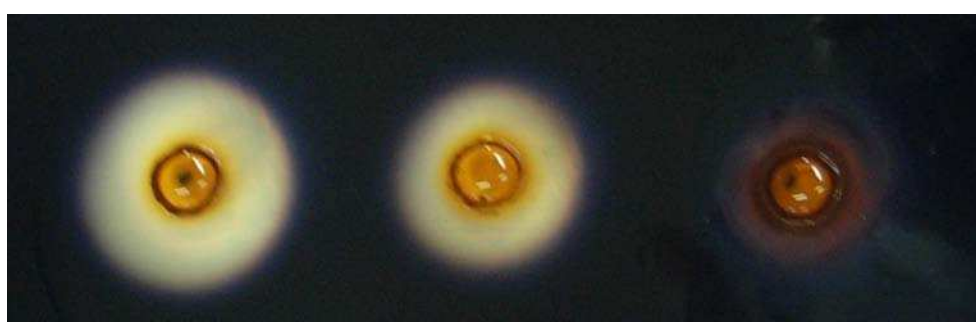
Ambas mutantes desarrollaron menor cantidad de canchales en hojas jóvenes inoculadas. Además se observaron diferencias en cuanto a la secreción de amilasas, producción de xantano y movilidad de tipo *sliding*.

En los ensayos de adhesión ambas mutantes fueron capaces de adherirse al sustrato abiótico pero en menor grado que la cepa silvestre. En cuanto al biofilm, no se observaron las mismas estructuras características de la cepa silvestre.

1. Funciones de los sistemas de secreción de tipo II.

Las mutantes utilizadas fueron realizadas en el Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeiropolis, San Pablo (119). Ambas poseen un cassette de resistencia a kanamicina en el último gen de cada *cluster*. Estos genes (*xcsD* y *xpsD*) son los responsables de formar el poro en la membrana externa de la bacteria, por donde se van a secretar las enzimas. La amilasa es una de las enzimas secretada a través de este sistema en otras bacterias (154), para poder determinar si estos sistemas son funcionales en *Xac* se realizaron ensayos de secreción de la misma.

Se crecieron las bacterias en medio rico PYM, hasta que alcanzaran la fase estacionaria. Los cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante de cada uno de ellos fue utilizado para sembrar en placas conteniendo almidón al 1%. Luego de 24 horas a 28 °C las placas se revelan con una solución de yodo (ver materiales y métodos). En la figura 2.1 se observa que la mutante *xpsD* está severamente afectada, por otro lado la mutante *xcsD* no presentó una disminución tan marcada en su capacidad de degradar el almidón. En el gráfico se muestra el promedio de 3 ensayos independientes, ambas mutantes mostraron un menor halo de degradación pero en el caso de la cepa *xpsD* la diferencia con la cepa silvestre fue mayor.



Xac

xcsD

xpsD

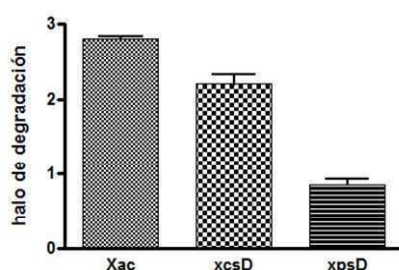


Figura 2.1: Secreción de amilasa. La foto es la más representativa de los 3 ensayos. El gráfico de barras es el promedio de 3 experimentos independientes. Los datos fueron tomados con el programa ImageJ1.41 (ver materiales y métodos).

Se realizaron ensayos de patogenicidad inoculando ambas mutantes junto con la cepa silvestre. Para esto se crecieron las 3 cepas en medio rico y se diluyeron en agua hasta estar las 3 a una misma densidad óptica. Luego se realizaron lastimaduras en hojas jóvenes de limón y se inocularon las bacterias utilizando un hisopo. Las mutantes presentaron una capacidad de infección disminuida en comparación con la silvestre (Fig. 2.2), corroborando que ambos sistemas son funcionales y están relacionados de alguna forma con la capacidad de producir canchales. El ensayo se repitió 4 veces de manera independiente.



Figura 2.2: Infección de hojas jóvenes de limón. Se realizaron lastimaduras en la hoja y se inocularon con hisopos a las diferentes cepas a una misma DO de 0,1. Las fotos fueron tomadas luego de 3 semanas de infección.

Se estudió también la habilidad de estas mutantes en cuanto a la producción de exopolisacárido. Para poder obtener el xantano se crecieron las bacterias en 15 ml de medio rico (PYM) durante 12 horas, hasta que llegaron a fase estacionaria. Se centrifugó el cultivo para separar las células del sobrenadante, que es la fracción donde se encuentra el EPS. Se agregó la sal KCl para neutralizar las cargas positivas del xantano, de esta manera el polímero se vuelve menos soluble y más fácil de precipitar, luego se agregan 2 volúmenes de etanol 96%. Se dejó precipitando a temperatura ambiente durante una hora y luego se separó el xantano mediante centrifugación. Tanto las células como el polímero fueron liofilizados hasta sequedad total. Los datos se muestran como el promedio de 3 experimentos independientes, donde se grafica la producción de xantano relativizado al peso seco de las células (Fig. 2.3).

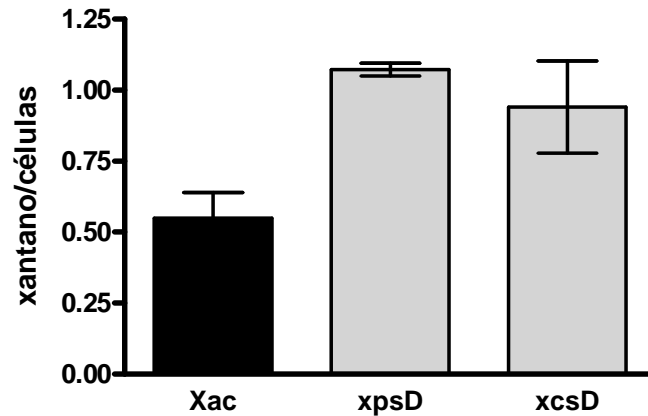


Figura 2.3: Producción de xantano. El gráfico es un promedio de 3 experimentos independientes. Tanto el xantano como las células fueron liofilizadas hasta sequedad total y luego pesadas. Se grafica el peso del xantano en relación con el peso de las células. Los datos fueron analizados con t-student ($p < 0,05$)

La mutante *xpsD* produce una cantidad mayor de xantano que la cepa silvestre. La diferencia que se observa con la cepa *xcsD* no fue significativa (Fig. 2.3).

Como vimos anteriormente en el capítulo I de esta tesis, el xantano está implicado en el movimiento de *sliding*. Se realizaron ensayos en placas con un porcentaje de agar del 0,5 % y medio PYM. Las cepas fueron inoculadas y se dejaron por 72 horas en una estufa a 28°C.

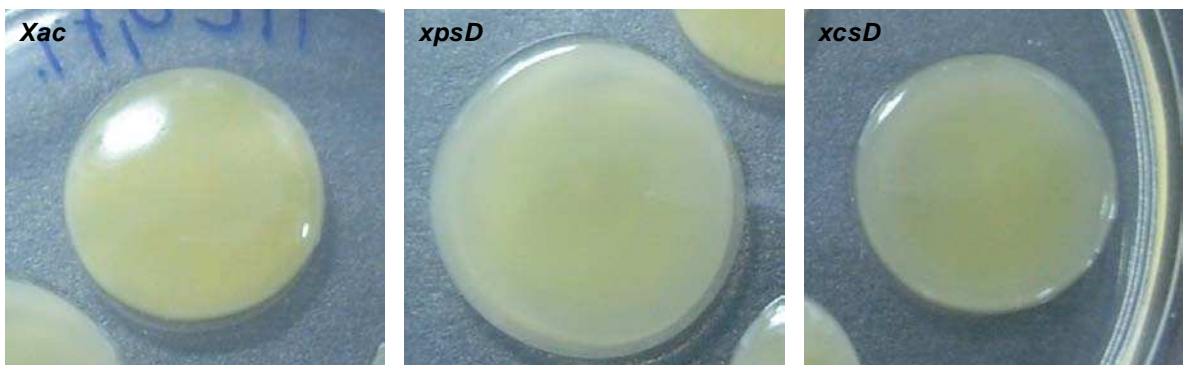


Figura: 2.4: Movilidad de sliding. Placas con PYM 0,5% agar fueron inoculadas con las cepas *Xac*, *xpsD*, *xcsD* e incubadas por 72 horas a 28°C. La imagen es la más representativa de 3 experimentos independientes

La mutante *xpsD* mostró mayor movilidad que el resto (Fig. 2.4).

2) Participación del T2S en la adhesión *in vitro* en *Xac*

Se vio que en otras especies de *Xanthomonas* el *cluster* de genes *xps* codifica proteínas que son esenciales para la secreción de enzimas al medio extracelular (155). El otro sistema de secreción de tipo II que posee *Xac* no ha sido descrito aún, en consecuencia no se le conoce ningún fenotipo asociado. Éste se encuentra codificado por el grupo de genes *xcs*. Para determinar si ambos sistemas de secreción están involucrados en el desarrollo del biofilm de *Xac in vitro* se realizaron ensayos de adhesión y desarrollo del biofilm a tres tiempos diferentes, 24, 48 y 72 h. (Fig. 2.5).

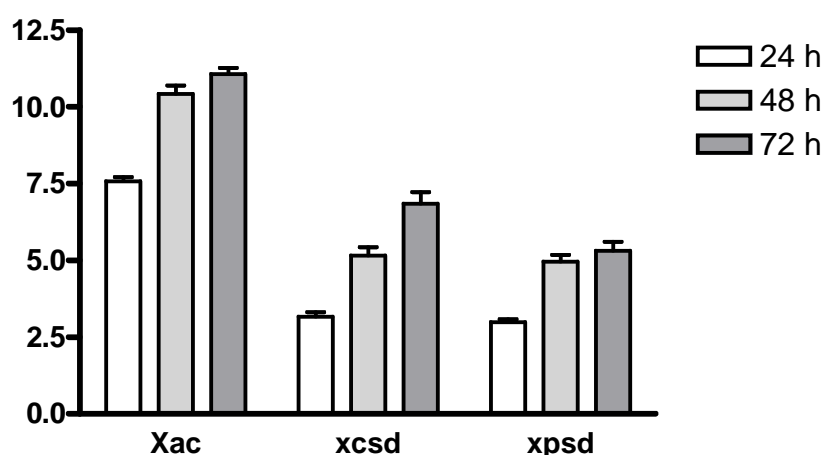


Figura 2.5: Ensayo de formación del biofilm de las cepas *Xac306*, *xcsD*, y *xpsD*. Los resultados se expresaron como adhesión relativa. N=8, se realizaron 3 experimentos independientes, el gráfico muestra los resultados de uno de ellos. Las barras corresponden para cada cepa a los 3 tiempos ensayados, 24, 48 y 72 horas.

De los resultados obtenidos en el gráfico de la figura 2.5 se puede observar que las mutantes se adhieren menos que la cepa silvestre, esto es cierto en los 3 tiempos utilizados. Pero, aunque la adhesión haya sido menor, las mutantes no perdieron totalmente esta capacidad. Se podría especular entonces que aunque se encuentran involucrados, estos sistemas no son esenciales durante la adhesión. Tampoco lo son en los siguientes pasos ya que se ve un aumento de la biomasa en ambas mutantes durante los otros tiempos ensayados.

Para estudiar en detalle las razones de esta menor adhesión de las cepas defectuosas en los T2S, se analizó el biofilm desarrollado por estas en un medio mínimo y en comparación con la cepa silvestre, utilizando un microscopio confocal invertido.

3) Desarrollo del biofilm en las mutantes del T2S

Se llevaron a cabo experimentos con microscopía confocal para estudiar el desarrollo del biofilm de las mutantes en los T2S. Para esto se introdujo el plásmido pmp2444 (121) en todas las cepas de estudio, que posee un gen de resistencia a gentamicina y el gen que codifica la proteína GFP expresándose constitutivamente y que permite visualizar a las bacterias al iluminarlas con un laser de argón. Al comparar las proyecciones xz de las distintas cepas se puede observar que a diferencia de la cepa silvestre las mutantes no forman ninguna estructura ordenada, aunque se logran finalmente adherir al fondo de las cámaras y entre ellas (Fig. 2.6).

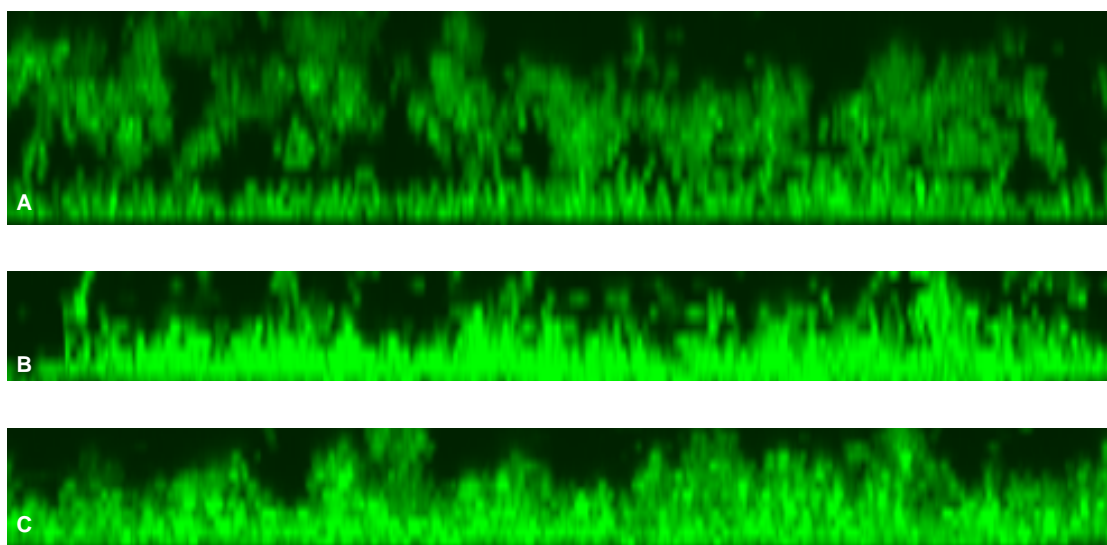


Figura 2.6: Proyecciones xz del biofilm maduro de A) *Xac306*, B) *xcsD*, C) *xpsD*. En medio mínimo. Zoom utilizado 1000x.

Estos resultados son los primeros obtenidos con respecto a estas proteínas en *Xac*.

CAPITULO III: Búsqueda y análisis de nuevos genes implicados en el biofilm de *Xac*.

En los dos primeros capítulos de esta tesis se estudiaron diferentes proteínas de superficie en cuanto a su participación en la adhesión, desarrollo del biofilm y patogenicidad. Además, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se determinó que tanto el exopolisacárido (xantano) como el sistema de quórum sensing son importantes para el buen desarrollo del biofilm en *Xac* (50, 120).

Mediante la utilización del transposón Tn5, que se inserta al azar en el genoma de la bacteria, se construyó una biblioteca de 7000 mutantes en *Xac*. La misma fue utilizada en la búsqueda de nuevos genes involucrados en las primeras etapas del desarrollo del biofilm (adhesión). Se ensayó la capacidad de adhesión de estas mutantes, utilizando placas de poliestireno y el método de tinción con cristal violeta.

Se obtuvieron 31 mutantes que mostraban una disminución en su adhesión, una de ellas poseía dos inserciones así que se la descartó. Para dos genes distintos se obtuvieron dos mutantes con inserciones en el mismo gen, así que en esos casos se decidió trabajar con una de ellas solamente, en total fueron 28 las mutantes defectuosas en la adhesión.

Dentro de las mutantes encontradas algunas de ellas ya habían sido relacionadas con biofilm en *Xac*. Se encontraron mutantes en el sistema de secreción de tipo II y en genes relacionados con la producción del xantano.

1) Búsqueda de nuevos genes relacionados con el biofilm de *Xac*

A) Construcción de la biblioteca de mutantes

Para la construcción de la biblioteca de mutantes, se eligió trabajar con un kit de mutagénesis que contiene el transposón Tn5. El "EZ-Tn5™ <KAN-2> Transposon" contiene el Tn903 con un gen de resistencia a kanamicina funcional en *Escherichia coli* flanqueado por 19 pb de una secuencia de terminación reconocida por la transposasa. La cual reconoce esta secuencia introduciéndola al azar en el genoma bacteriano. Esta proteína viene unida al transposón.

Para realizar la mutagénesis con el complejo transposón-transposasa, se prepararon células electrocompetentes de la cepa silvestre 306 (ver materiales y métodos). El método de transformación elegido fue el de la electroporación en vez de la conjugación, ya que este método es más eficiente permitiendo obtener una mayor cantidad de bacterias transformadas. Luego de electroporar se dejó recuperando a las bacterias transformadas por 4 horas y se las plaqueó en un medio selectivo con el antibiótico kanamicina (Km). Las colonias resistentes fueron repicadas nuevamente en un medio con Km, colocándolas ordenadamente desde la posición 2 a la 96. Luego de un día a 28°C se picaron todas las colonias con un ansa y se las volvieron a colocar ordenadamente dentro de unas placas especiales que permiten colocar 2 ml de medio. En la posición 1 se creció la cepa silvestre para tener un control en cada placa. Los cultivos crecidos fueron centrifugados y resuspendidos con una solución estéril de glicerol 12 %. Luego se los traspasó a placas estériles de 96 pocillos y se los almacenó a una temperatura de -80°C. En la figura 3.1 se puede ver el esquema utilizado.

El nombre de cada mutante está compuesto por el número de la placa, la fila y la columna donde se encuentra dentro de la colección, por ejemplo la mutante 90H5, se encuentra en la placa 90, en la fila H y la columna 5.

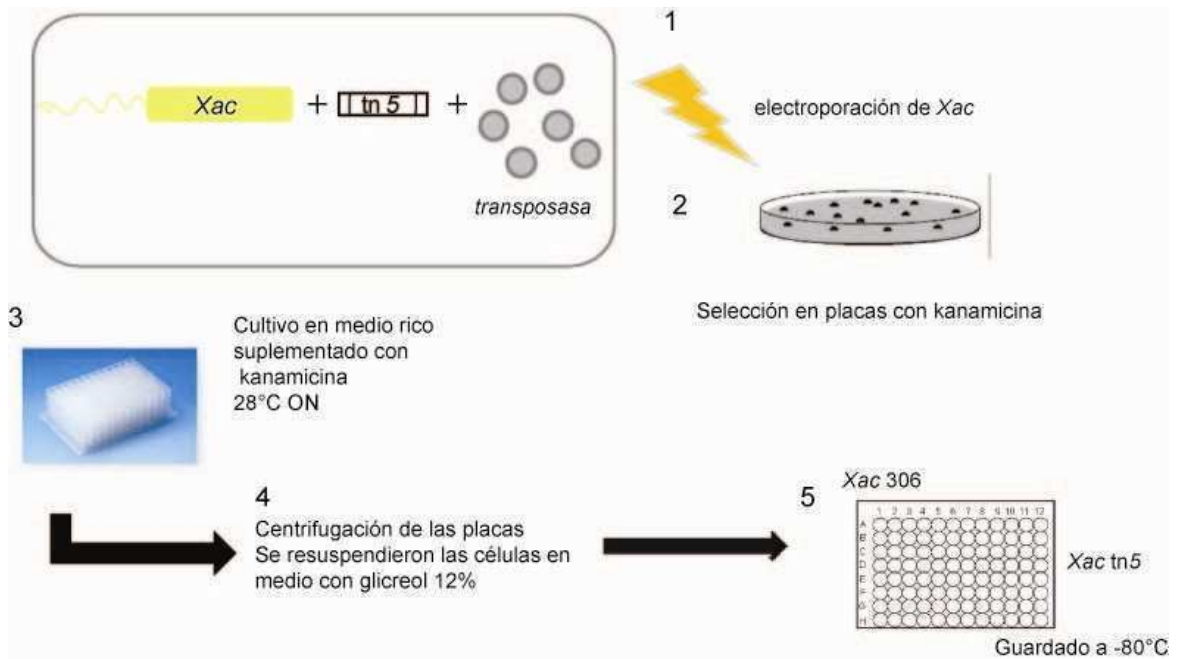


Figura 3.1: Esquema de la obtención de mutantes con el Tn5.

B) Método de screening

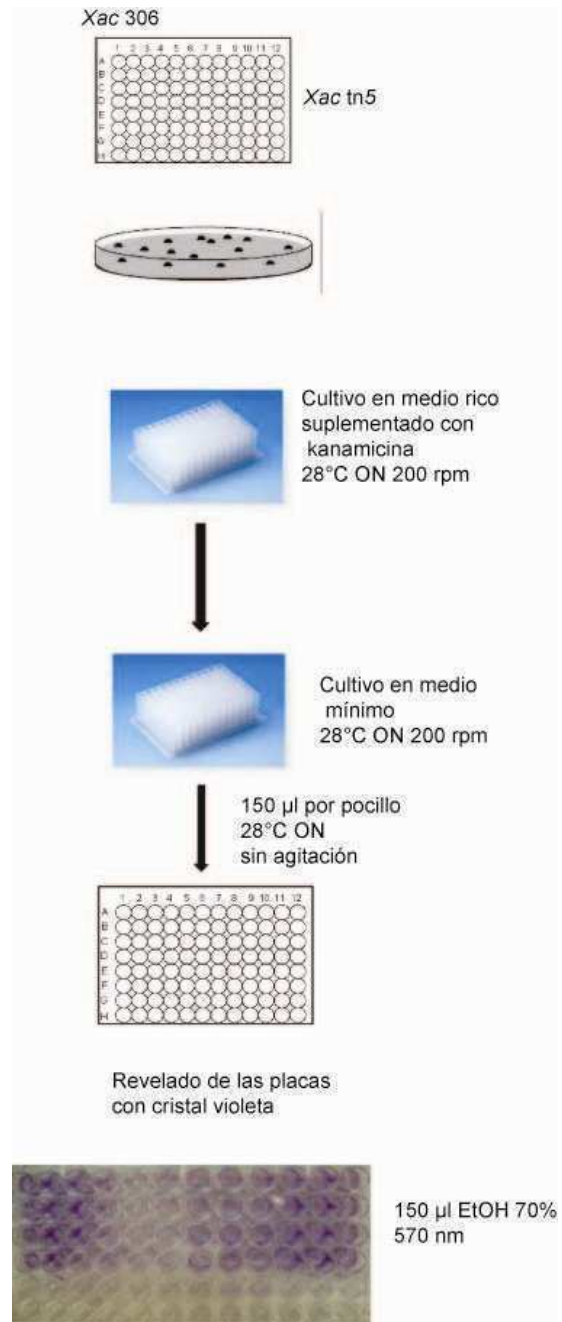
Se utilizaron alrededor de 7×10^4 mutantes provenientes de la biblioteca generada en esta tesis y de otra biblioteca generada en el laboratorio del Dr Do Amaral, Centro Apta Citros, Sylvio Moreira, Cordeirópolis SP Brasil.

Para la búsqueda de mutantes disminuidas en la adhesión al sustrato se realizó un *screening* rápido usándose el método de cristal violeta para revelar el grado de adhesión a la base de poliestireno de las placas utilizadas. Brevemente, se tomó una alícuota de las bacterias crecidas en medio rico y se lo traspasó al medio mínimo dejando que crezcan durante aproximadamente 16 horas. Se introdujo en los pocillos 150 μ l de cada cepa por triplicado y se los dejó en una estufa a 28°C. Luego de 16 horas de incubación se midió la DO de todas las cepas en las placas cerciorándonos de esta manera que las diferencias existentes en el teñido con el cristal violeta no fueran a causa del crecimiento. Se retiró el medio y se realizó la tinción con cristal violeta (CV). De esta manera se obtuvieron aproximadamente unas 500 mutantes reducidas en su adhesión, comparándolas con la cepa silvestre, a partir de 7000 mutantes ensayadas. Se eligió dejar a las bacterias durante un tiempo más prolongado que en experimentos anteriores, ya que se observó que los resultados eran más reproducibles.

En la figura 3.2 se esquematiza los pasos realizados en el screening.

Figura 3.2: Esquema del screening.

Las bacterias guardadas a una temperatura de -80 °C fueron repicadas en una placa con kanamicina y luego de dos días a 28°C se las creció en medio rico líquido a la misma temperatura por 16 horas. Una alícuota de este cultivo se traspasó a medio mínimo, se las incubó y luego de una noche en agitación se tomaron 150 µl y se los colocaron en placas de poliestireno, el ensayo se realizó por triplicado. Luego de 16 horas de incubación se midió la DO de todas las placas. Luego se realizó el ensayo de tinción con CV. Se disolvió el CV con etanol 70% y se midió en un lector de Elisa a una longitud de onda de 570 nm.



Las 500 mutantes candidatas en estar afectadas en genes involucrados en la adhesión bacteriana, fueron nuevamente sometidas a un ensayo de adhesión, esta vez utilizando un número de repeticiones del experimento mayor. Finalmente se decidió continuar solo con 31 mutantes que presentaban claros problemas en la adhesión. En la figura 3.3 se graficaron los resultados del ensayo de adhesión utilizando un N= 8 y relativizando la adhesión al crecimiento de las cepas. En cada

placa utilizada se colocó a la cepa silvestre como control de la adhesión. Además se la utilizó para comparar de manera independiente cada ensayo.

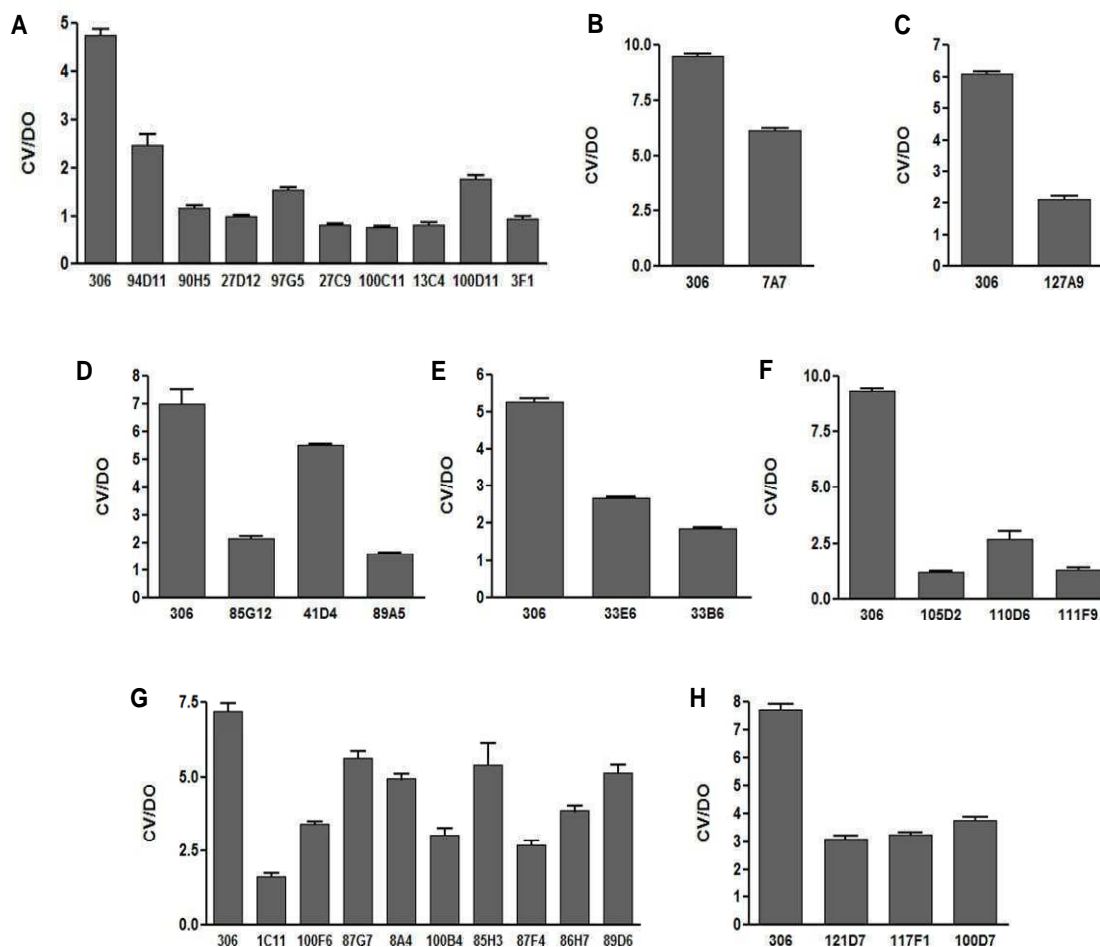


Figura 3.3: Resultado del ensayo de adhesión revelado con CV. Cada ensayo se encuentra junto con la cepa silvestre. N=8

Para determinar si el Tn5 había interrumpido el genoma de la bacteria una sola vez se realizó un Southern utilizando como sonda un sector de la secuencia del transposón. La sonda se aparea con una región común de los Tn5 utilizados para la construcción de ambas bibliotecas.

Para visualizar las membranas radioactivas se expusieron ante una placa sensible (Amersham-pharmacia) que luego fueron escaneadas utilizando un scanner (STORM 820, Amersham-pharmacia). En las figuras 3.4 A y B se observan los resultados. Como en algunos casos la hibridación con la sonda no fue buena, se decidió volver a extraer el ADN, digerirlo y exponerlo a la sonda marcada nuevamente. Como se observa en la figura 3.4 C una de las mutantes (33B6) presenta una doble inserción, por esta razón se decidió descartarla para los siguientes ensayos realizados.

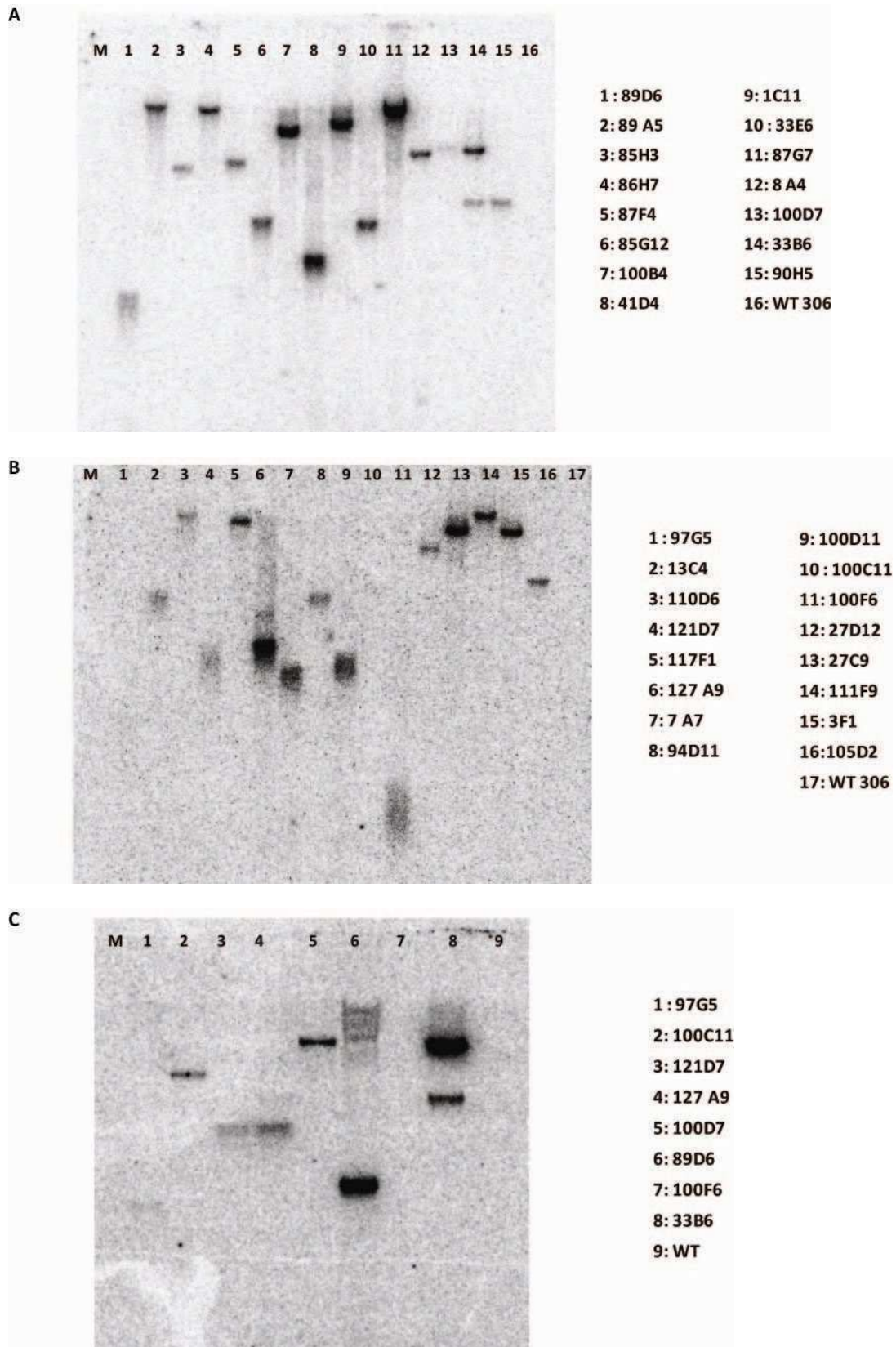


Figura 3.4: Southern blot de las mutantes de *Xac* con el Tn5. En los tres geles se agregó el genoma digerido de la cepa silvestre como control negativo. La membrana C es una repetición de los genomas que presentaron dudas en los casos anteriores. Se volvió a extraer y a digerir estos genomas y se los expuso nuevamente con la sonda marcada.

C) Determinación de las secuencias flanqueantes a la inserción del Tn5

Para determinar cuáles eran los genes que se encontraban interrumpidos por el Tn5 se secuenciaron las 30 mutantes obtenidas. Para esto se realizó una PCR invertida (iPCR) utilizando los cebadores que se detallan en la tabla 3 de materiales y métodos. En la figura 3.5 se muestra un esquema de lo realizado.

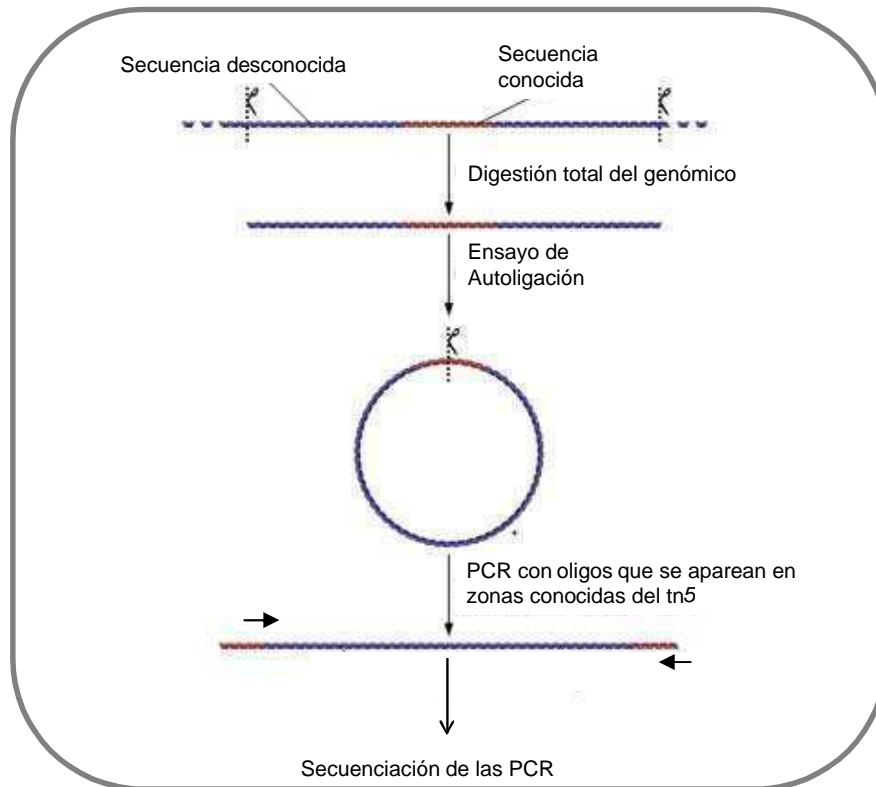
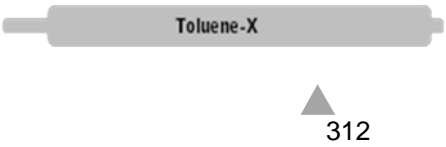
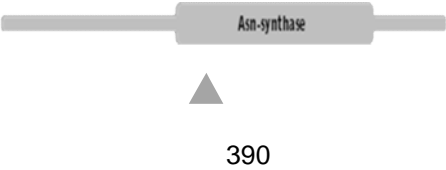
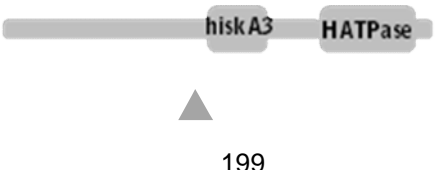
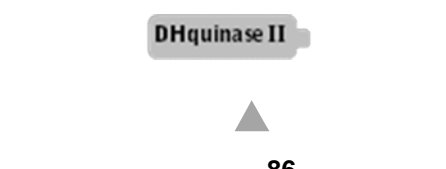
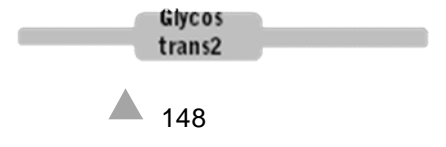

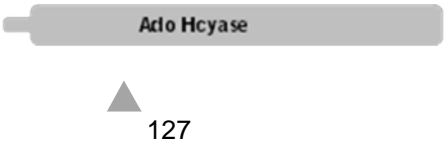


Figura 3.5: Esquema de la iPCR. Los genomas de todas las cepas son digeridos con una enzima de restricción que no corte dentro de la zona que se apareará con la sonda. Luego de la autoligación se realiza la PCR y el fragmento amplificado es secuenciado. Las flechas indican donde se aparean los oligonucleótidos.

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa, purificados y mandados a secuenciar utilizando los oligonucleótidos especificados en materiales y métodos. En la **tabla 1**, se detalla el nombre de la mutante, el Xac ID (el identificador en la base de datos del *genbank*), el nombre del gen en los casos de que este exista, los dominios estructurales conservados y que se encuentran en bases de datos, la posición donde cayó el transposón y la función putativa de la proteína.

Las estructuras conservadas fueron encontradas utilizando la base de datos de la página pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), en algunos casos (Xac2301; Xac3266; Xac3657) no se encontraron dominios conservados. En el caso de la mutante 105D2 el Tn5 se insertó en una zona no codificante en el plásmido pXac 64, uno de los dos

vectores presentes en esta bacteria. Las mutantes 110D6 y 111F9 resultaron tener la misma mutación, así que se decidió trabajar solamente con una de ellas. También se encontraron dos mutantes en el gen *gumB* y por esta razón se decidió seguir con una sola.

Nombre de la mutante	Xac ID	gen	Dominios estructurales conservados Posición donde se insertó el tn5 (aa)	Función putativa
85H3	Xac0019	<i>omp1</i>	 <p>Toluene-X 312</p>	Proteína de membrana externa
41D4	Xac0059	<i>asn</i>	 <p>Asn-synthase 390</p>	Proteína similar a la asparagina sintetasa
90H5	Xac 0135	SN	 <p>hisK3 HATPase 199</p>	Sistema de dos componentes, proteína sensora
27D12	Xac0533	<i>aroQ</i>	 <p>DHquinase II 86</p>	3- dehidroquinato deshidratasa
33E6	Xac0618	<i>hrpM, mdoH</i>	 <p>Glycos trans2 148</p>	proteína de biosíntesis de glucanos periplásmicos
27C9	Xac 0695	<i>xcsD</i>	 <p>Secretin 92</p>	Sistema de secreción tipo II
3F1	Xac0804	<i>sadH</i>	 <p>Ado Hcyase 127</p>	S-adenocil-L-homocisteína hidrolasa

89D6	Xac0966	<i>rpoC</i>	<p>1373</p>	Subunidad β de la RNA polimerasa
89A5	Xac 1043	SN	<p>179</p>	Proteína hipotética
111F9	Xac1081	<i>hupB</i>	<p>47</p>	Proteína tipo histona
100D11	Xac1099	<i>moaD</i>		Cadena I del factor de conversión de la molibdopterina
117F1	Xac1260	<i>cyoC</i>	<p>83</p>	Subunidad III citocromo O ubiquinol oxidasa
87F4	Xac1495	<i>xrvA</i>	<p>73</p>	Regulador de virulencia
97G5	Xac 1516		<p>107</p>	Proteína de la membrana externa
86H7	Xac 1548	SN	<p>47</p>	Regulador transcripcional de la familia GntR
13C4	Xac1844	<i>serA</i>	<p>355</p>	Dominio catalítico D-3 fosfoglicerato dehidrogenasa.

100B4	Xac2092	<i>uvrC</i>		Subunidad C de la exinucleasa ABC
94D11	Xac2113	SN		Proteína hipotética
1C11	Xac2292	<i>galU</i>		UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa
87G7	Xac2301	SN	No hay dominios conservados: el Tn5 se insertó en la posición 24	Proteína hipotética
7 A7	Xac2583	<i>gumD</i>		Fosfotransferasa de glucosas
127 A9	Xac2585	<i>gumB</i>		Proteína de membrana externa transportadora de polisacáridos
100C11	Xac3266	SN	No hay dominios conservados	Proteína hipotética
100D7	Xac3534	<i>xpsD</i>		Sistema de secreción tipo II proteína D
100F6	Xac3657	SN	No hay dominios conservados: el Tn5 se insertó en la posición 67	Proteína hipotética
8A4	Xac3733	SN		Regulador transcripcional de la familia NtrC


85G12	Xac3991	yodB		citocromo b561
105D2	Xaca0023	SN	No hay dominios conservados	Proteína hipotética Plasmido pXAC64

Tabla 3.1: lista de mutantes obtenidas con la adhesión disminuida. aa, aminoácidos SN, sin nombre

Dentro de los genes interrumpidos por el Tn5 encontramos genes que ya se los habían relacionado con el desarrollo del biofilm de *Xac*. Mutantes en genes que no producen xantano: *gumB* (127A9) (50) y *galU* (1C11) (156). Y también mutantes en los genes que forman los poros de los sistemas de secreción de tipo II: *xscD* (27C9) y *xpsD* (100D7). Además también se encontró una mutante en otro gen que también está involucrado en la síntesis de xantano, *gumD* (7A7) (157).

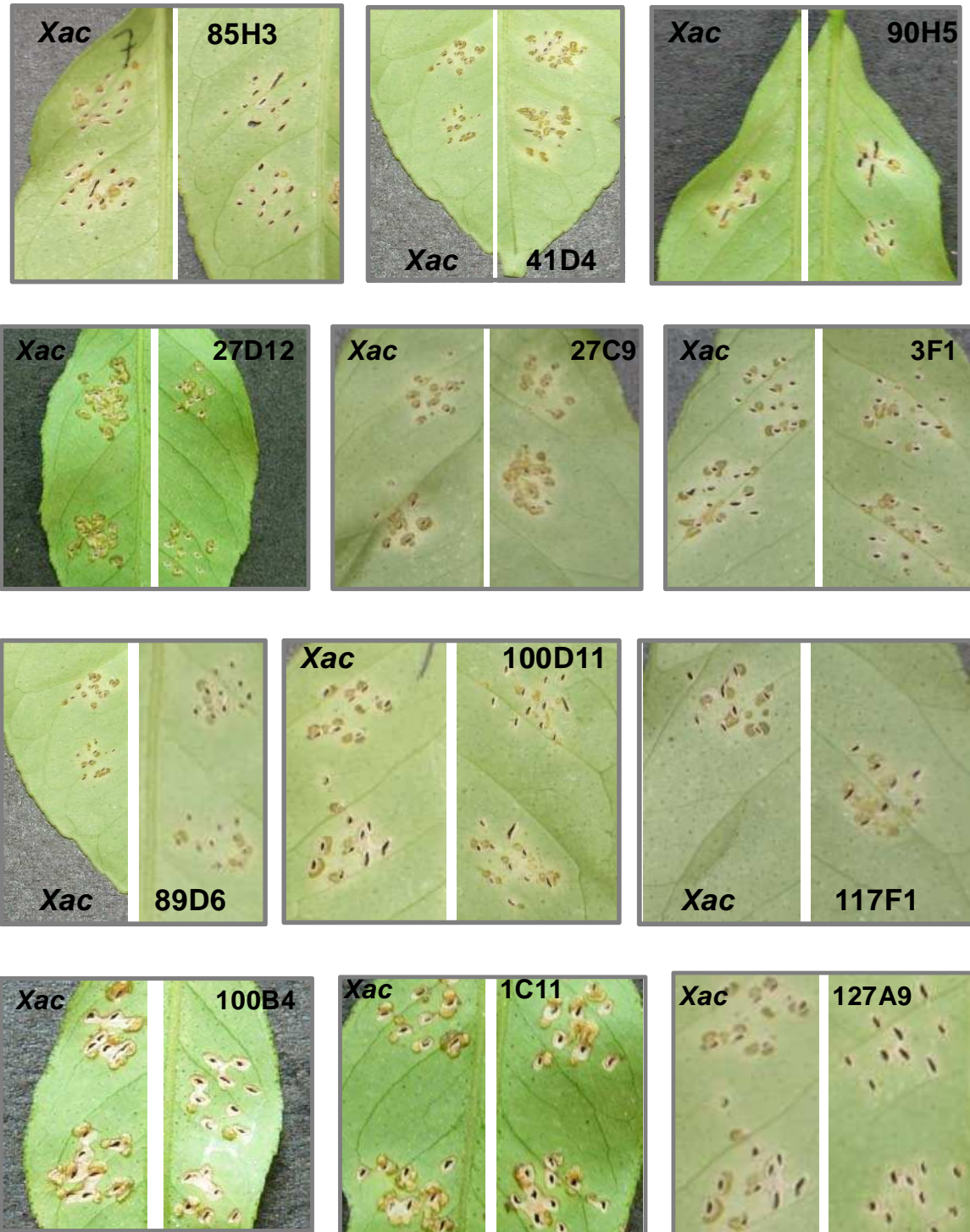
Dentro de las mutantes encontradas algunas ya fueron relacionadas con factores de virulencia en otras bacterias, por ejemplo la mutante en el gen *uvrC* (100B4) y la mutante *hupB* (111F9). Otras, en cambio, no se les asignó ninguna función, por ejemplo la mutante en el gen Xac0135 (90H5), que codifica para una proteína sensora que forma parte de un sistema de dos componentes

Se discutirá más en detalle en la discusión.

2) Caracterización de las mutantes obtenidas: Patogenicidad de las cepas deficientes en la adhesión.

Para ver si estas mutantes tenían algún tipo de diferencia con respecto a la cepa silvestre, en cuanto a su capacidad de formar canchales en plantas de limón, se realizaron ensayos de infección. Se tomaron hojas jóvenes de esta planta, se las lastimó con una aguja y se colocaron 10 µl de una suspensión de bacterias en agua con una DO de 0,1. Luego de 4 semanas las hojas fueron cortadas y se tomaron las fotos. En los casos en donde la bacteria no fue capaz de generar canchales en la planta de limón se decidió probar también con plantas de pomelo, que son más susceptibles a desarrollar esta enfermedad.

En la figura 3.6 se observan los resultados obtenidos luego de la infección, las cepas que no formaron canchales en las hojas de las plantas de limón fueron nuevamente inoculadas en plantas de pomelo. Los ensayos fueron repetidos 3 veces.



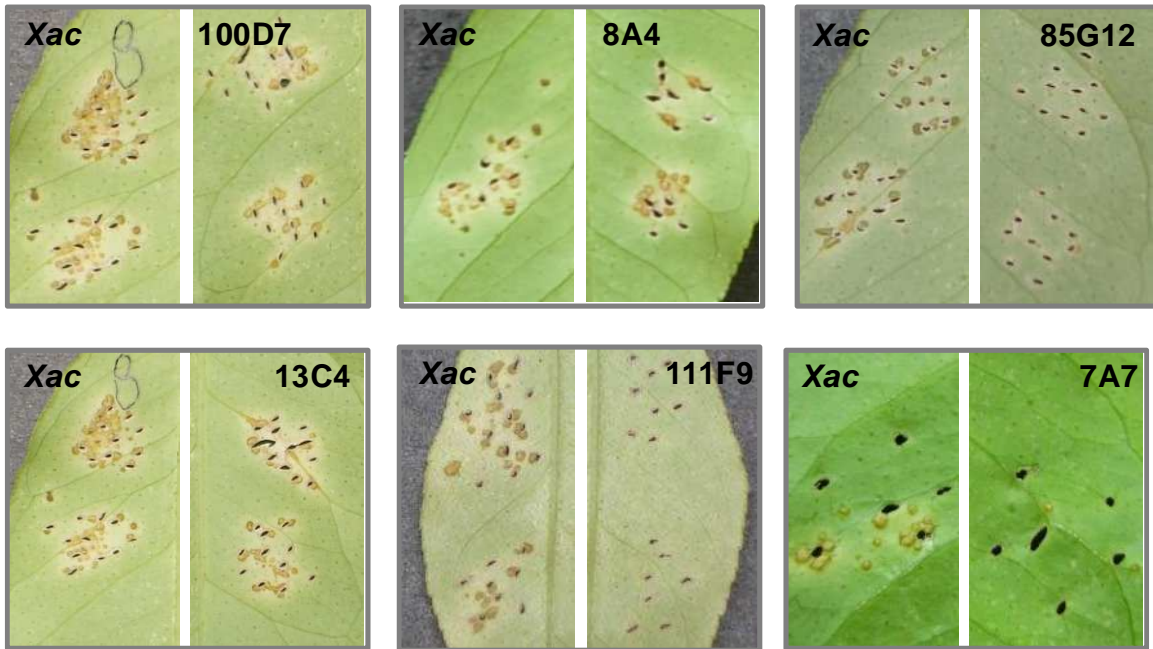


Figura 3.6: Infección de hojas. Se Infectaron hojas jóvenes de **limón** con las mutantes obtenidas en el screening. Se lastimó la hoja con la punta de una jeringa y se inocularon las cepas resuspendidas en un agua con una DO final de 0,1. Las fotos fueron tomadas luego de un mes de infección. Los ensayos se realizaron 3 veces de manera independiente.

Algunas de las mutantes mostraron estar seriamente afectadas en cuanto a su patogenicidad ya que no pudieron desarrollar canchros en las hojas de limón. Para ver si estas mutantes seguían siendo poco patógenas se las inoculó en plantas de pomelo, que es más susceptible (Fig. 3.7).

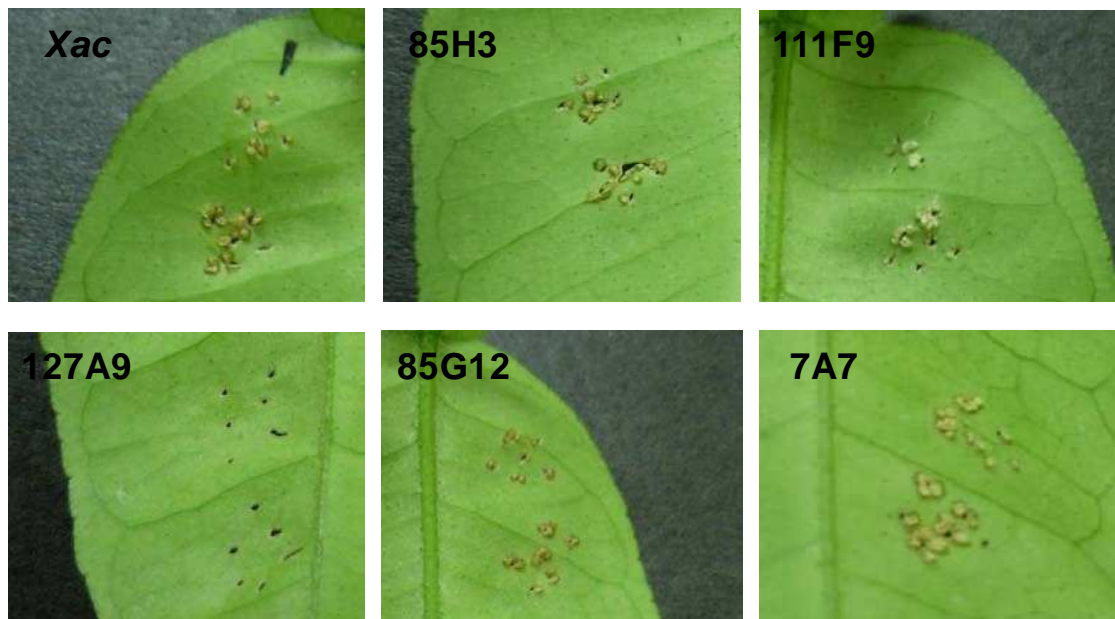


Figura 3.7: Infección de hojas. Se Infectaron hojas de **pomelo** jóvenes con las mutantes que no presentaron lesiones en hojas de limón. Se lastimó la hoja con la punta de una jeringa y se inocularon las cepas resuspendidas en un agua con una DO final de 0,1. Las fotos fueron

tomadas luego de un mes de infección. Los ensayos se realizaron 2 veces de manera independiente.

3) Caracterización de las mutantes cuyo Tn5 se insertó en secuencias que codifican proteínas hipotéticas.

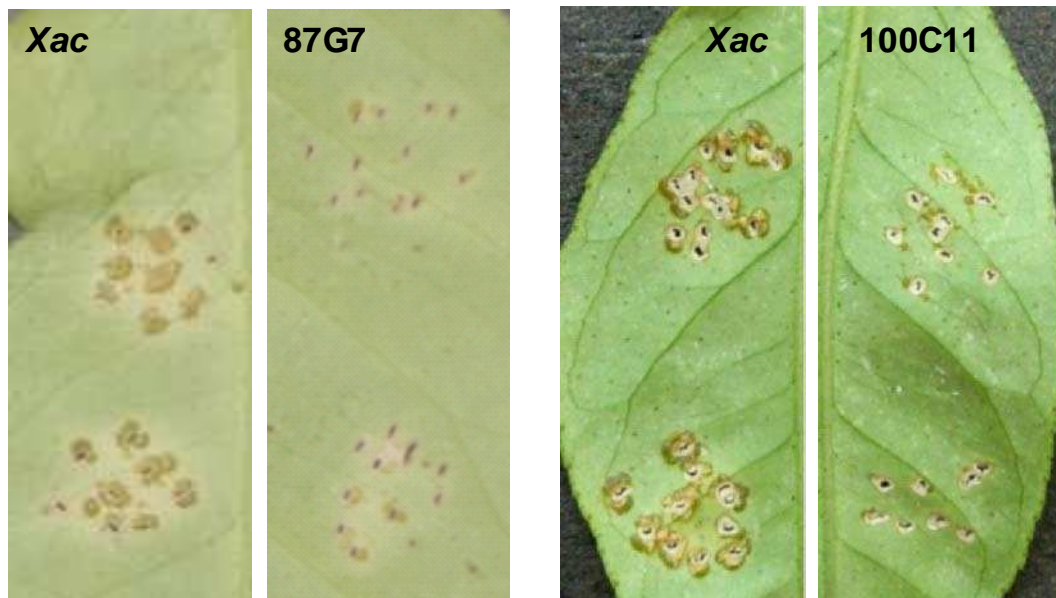
Se decidió caracterizar algunas de las mutantes encontradas en el screening. Las mutantes elegidas para esto fueron las que presentaron la inserción del Tn5 en ORFs (marco de lectura abierto) que codifican para proteínas hipotéticas:

- 89A5 (Xac1043)
- 94D11 (Xac2113)
- 87G7 (Xac2301)
- 100C11 (Xac3266)
- 100F6 (Xac3657)

Y la mutante 105D2, que tiene la inserción en una región no codificante.

A) Patogenicidad de las mutantes en proteínas hipotéticas.

De la misma manera que en los casos anteriores se realizaron ensayos de patogenicidad en hojas jóvenes de limón.



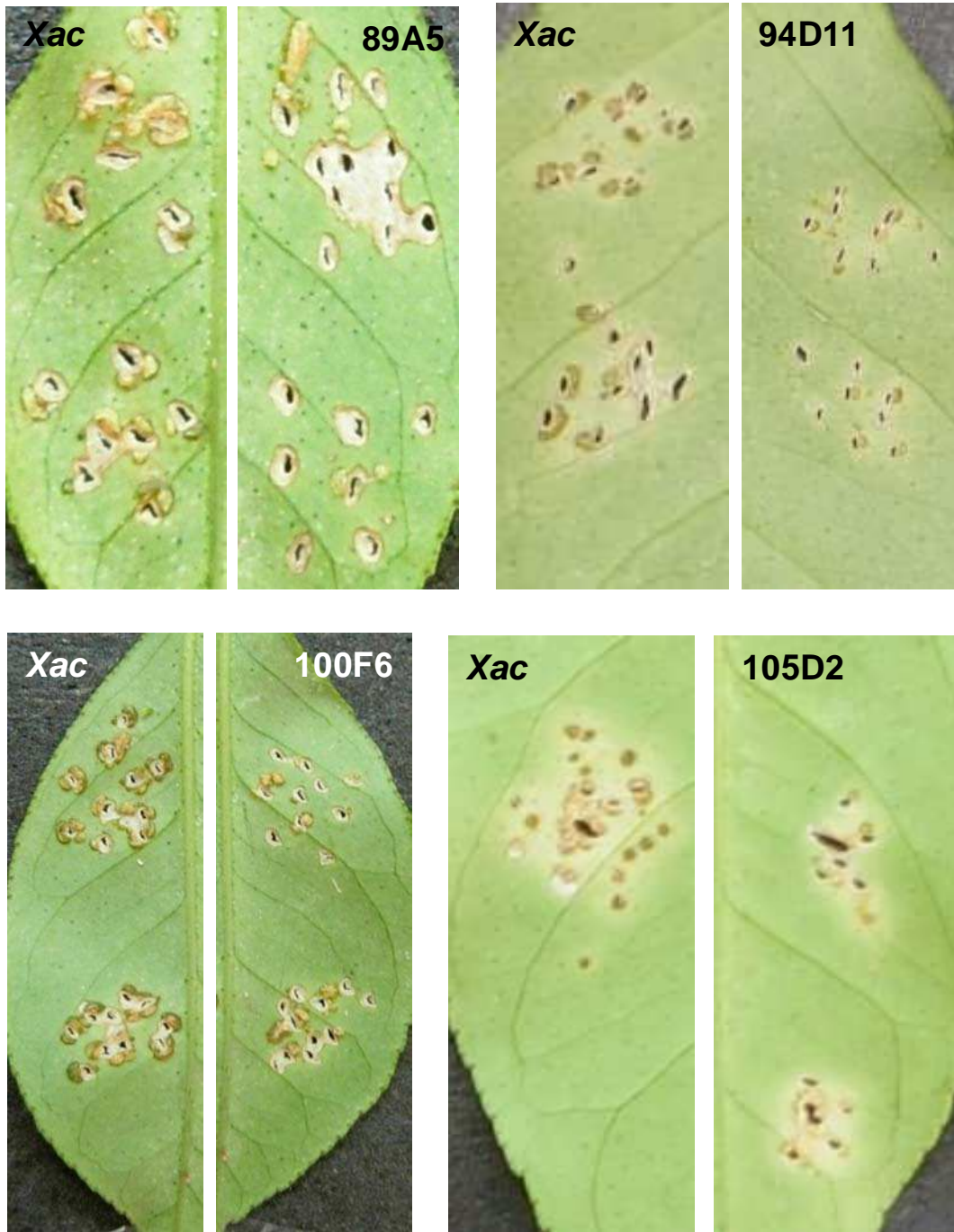


Figura 3.8: Infección de hojas. Con mutantes en proteínas hipotéticas. Se Infectaron hojas de limón jóvenes las mutantes en proteínas hipotéticas, obtenidas en el screening. Se lastimó la hoja con la punta de una jeringa y se inocularon las cepas resuspendidas en un agua con una DO final de 0,1. Las fotos fueron tomadas luego de un mes de infección. Los ensayos se realizaron 3 veces de manera independiente.

Las 6 mutantes presentaron problemas en el desarrollo del cancro. Las mutante 89A5 y 100C11 no lograron formar nada, en cambio las otras sí. Para continuar con la caracterización se realizaron diferentes ensayos con el objetivo de determinar qué factores de virulencia, además de la capacidad de desarrollar biofilm estaba afectado en estas mutantes.

B) Síntesis del exopolisacárido (EPS) y resistencia al H₂O₂

La producción del EPS xantano en las bacterias que pertenecen al género *Xanthomonas* spp. está relacionada con la patogenicidad de la misma (52). Por tratarse entonces de un factor de virulencia importante se decidió analizar su producción en las diferentes cepas mutantes.

Las bacterias fueron cultivadas a 28 °C con agitación y el xantano fue extraído (como se explicó en el capítulo II y en materiales y métodos) una vez que éstas llegaron a su fase estacionaria.

El experimento se repitió 3 veces para cada una de las cepas. Los gráficos muestran la producción de xantano de las mutantes en relación con el peso seco de las bacterias.

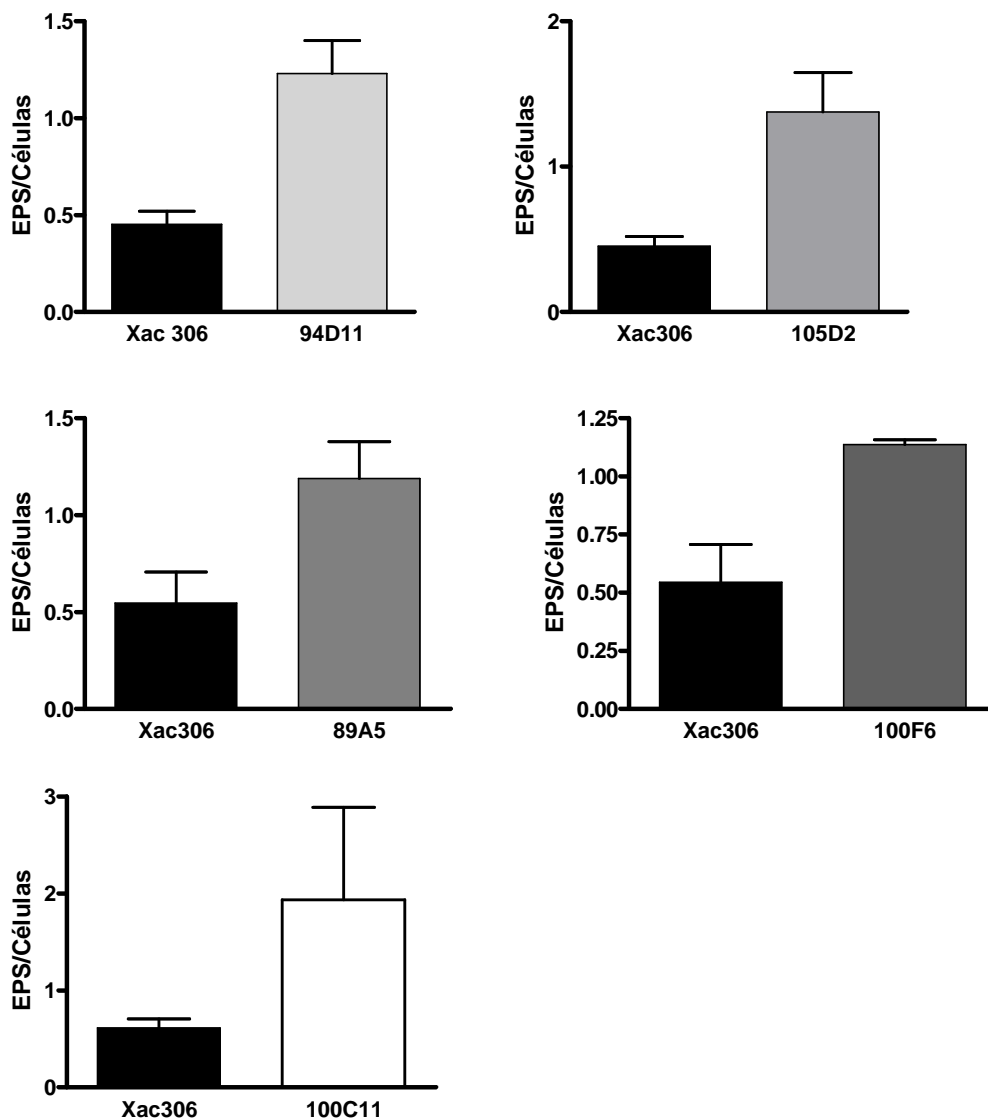


Figura 3.7: Producción de xantano. Se tomaron cultivos en fase estacionario de la cepa silvestre y las mutantes se separaron mediante centrifugación y posterior precipitación el xantano de las células. Ambos fueron liofilizados y pesados. Los gráficos muestran el peso seco del xantano/peso seco de las células del promedio de 3 experimentos independientes.

Como se observa en la figura 3.7 todas presentaron un aumento en la producción de este polímero.

Los organismos aeróbicos están expuestos a una gran variedad de especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2 , además estos compuestos son también importantes durante la respuesta inmune de las plantas. Es por eso que muchos patógenos necesitan superar este estrés oxidativo para poder establecerse y mantenerse dentro de su hospedador. Estos compuestos conducen a lesiones en el ADN, daños en enzimas que utilizan los grupos hierro-azufre como cofactores, etc

(158). La mayoría de los organismos han desarrollado una gran cantidad de enzimas que actúan directamente en la detoxificación de estos compuestos o que reparan los daños generados por ellos. Las catalasas son unas enzimas que degradan el H_2O_2 . En *Xac* estas enzimas están presentes y son funcionales, además se vio que la resistencia al H_2O_2 aumenta a medida que la bacteria se acerca a su fase estacionaria (159).

Para evaluar si algunas de estas mutantes estaban afectadas en la capacidad de sobrevivir al H_2O_2 se realizó un ensayo de inhibición de crecimiento. Para el mismo se hisoparon las diferentes cepas crecidas en medio líquido hasta la fase estacionaria en placas de PYM-agar sin antibiótico y se colocaron 3 discos de papel whatman que fueron inoculados con 3 μ l de H_2O_2 con una concentración final de 100 mM. Luego de 24 horas se midieron las áreas de los halos generados y el área total de la placa (área de crecimiento) con el programa ImageJ, ver materiales y métodos para más detalles. Luego se relativizó cada halo con el área total y este dato fue usado para comparar las mutantes con la cepa silvestre *Xac* 306. Los ensayos se realizaron por triplicado en 4 experimentos independientes observándose la misma tendencia. A continuación se muestran los gráficos más representativos.

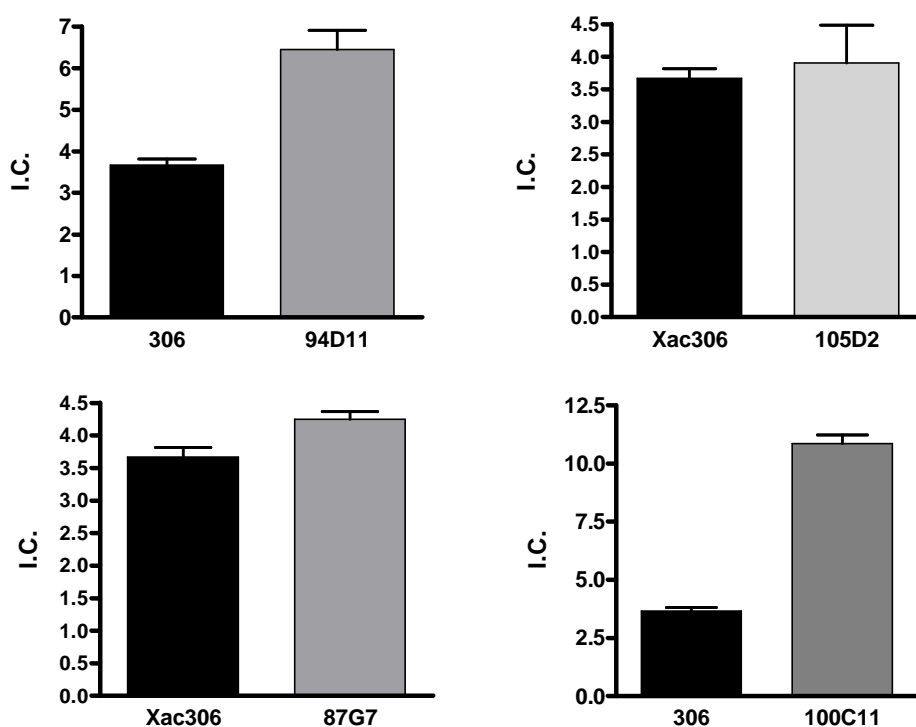


Figura 3.8: Resistencia al H_2O_2 : 100 μ l de cultivos en fase estacionaria fueron hisopados en placas PYM. Se inocularon discos de papel whatman con 3 μ l de agua oxigenada. I.C. es la inhibición de crecimiento por el H_2O_2

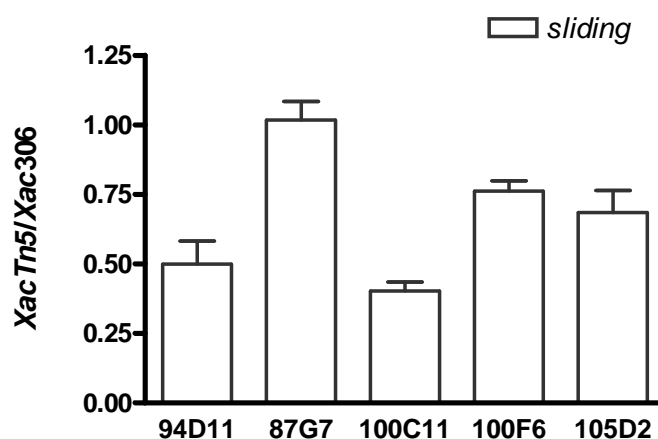
Se pudo observar que en el caso de las mutantes 94D11 y 100C11 la inhibición del crecimiento fue mayor, es decir que ambas cepas son más sensibles al H₂O₂ que la cepa silvestre.

C) Movilidad

Como se mencionó anteriormente otra propiedad muy importante para que las bacterias logren sobrevivir e infectar al hospedador es la capacidad de moverse. Entonces, para ver si esta capacidad se encontraba afectada en las mutantes de los genes que codifican las proteínas hipotéticas, se efectuaron los ensayos de movilidad: *swimming* y *sliding*.

Se tomaron 3 µl de todas las bacterias crecidas en medio PYM durante toda la noche y se las sembró en placas de NYGB 0,25%, para el ensayo de *swimming* y en placas PYM 0,5% en el caso del ensayo de *sliding*. Luego de 72 horas se tomaron las fotos. Se midieron los halos generados por la movilidad de cada cepa y el área total de la placa con el programa ImageJ. Con estos datos se obtuvo un **índice= halo de movilidad/ área total**

Para graficar se relativizó la movilidad de cada mutante con la de la cepa silvestre. La figura 3.9 muestra los resultados para todas las mutantes de ambas movilidades.



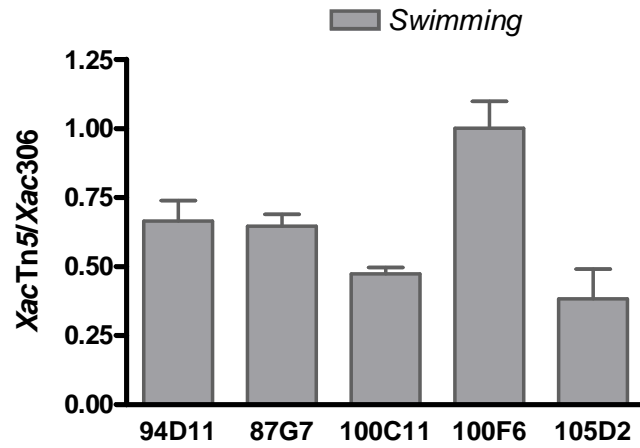


Figura 3.9: Movilidad de las cepas. Luego de 72 horas a 28°C se tomaron las fotos. Los gráficos representan el promedio de 4 ensayos independientes.

Se observa que la mutante 100C11 se encuentra disminuida en ambos tipos de movilidad. En cambio la movilidad de las mutantes 87G7 y 100F6 no mostraron mayores diferencias con respecto a la cepa silvestre.

4) Importancia de la proteína HrpM en el biofilm y la patogenicidad de *Xac*

Una de las mutantes encontradas en el *screening* posee el Tn5 insertado en el gen que codifica la proteína HrpM (mutante 33E6). Esta proteína está implicada, en otras especies, en la síntesis de glucanos osmorreguladores periplasmáticos, específicamente los glucanos lineales.

En la figura 3.10 se muestra la región donde se insertó el Tn5, el resultado del southern que muestra una sola inserción, el contexto genómico de este gen y la cuantificación de la adhesión utilizando la técnica de tinción con cristal violeta.

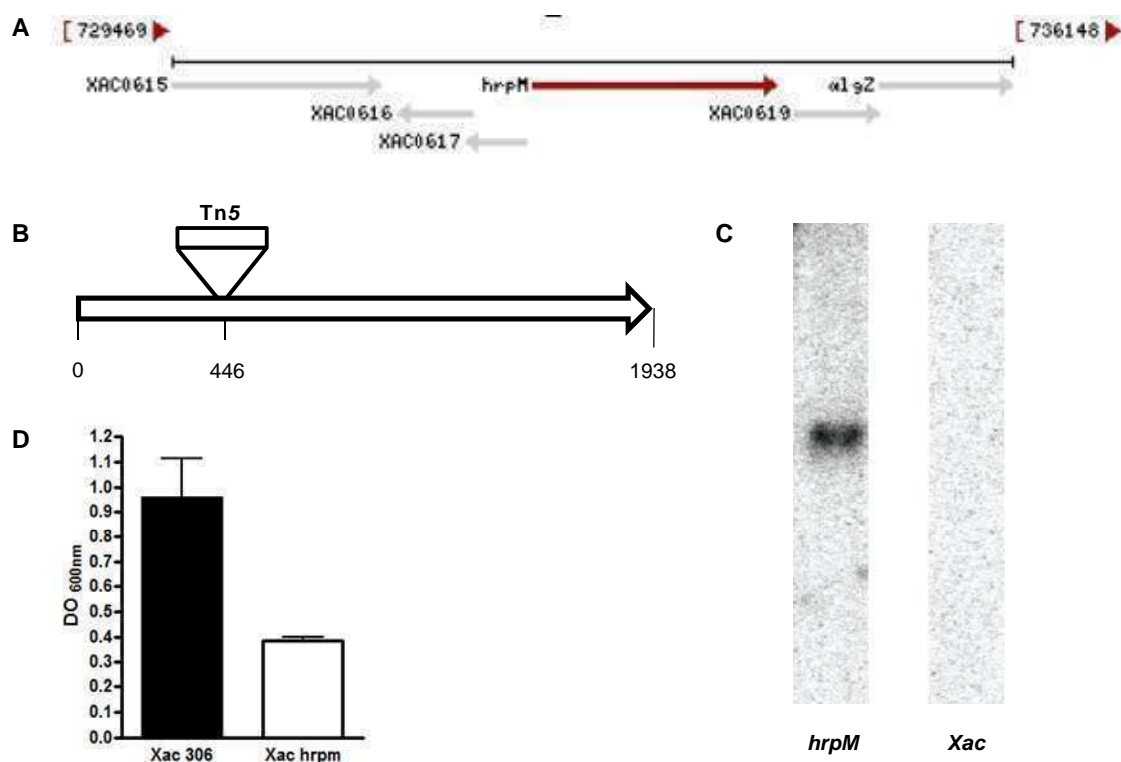


Figura 3.10: Mutante 33E6. **A)** Contexto genómico del gen *xac0618* (*hrpM*). **B)** Esquema del gen *hrpM* y del lugar donde se encuentra la inserción del Tn5. **C)** Southern blot con la sonda hibridiza a una región del transposón. **D)** Formación del biofilm en medio mínimo YMM.

A) Producción de glucanos cíclicos

Se evaluó la capacidad de producir glucanos cíclicos. Para ello se utilizaron bacterias crecidas hasta fase estacionaria en el medio rico PYM. Luego de una extracción etanólica la muestra se sembró en una placa de TLC y fue desarrollada dos

veces en un buffer etanol:butanol: agua (5:5:4). La placa fue revelada utilizando una solución de etanol/ácido sulfúrico (95/5).

En la figura 3.11 la flecha indica la posición donde se ven los glucanos cíclicos en la cepa silvestre.

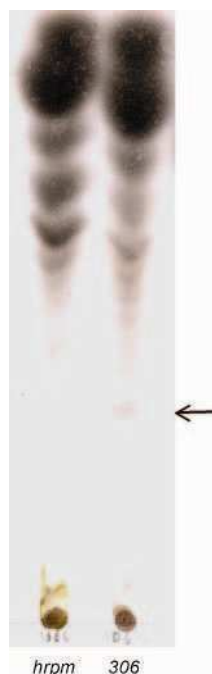


Figura 3.11: Cromatografía en capa delgada (TLC) de extractos de células crecidas hasta fase estacionaria de la mutante *hrpM* y la cepa silvestre 306. La flecha marca el *spot* correspondiente a los glucanos cíclicos.

Sorprendentemente se vio que la mutante en el gen *hrpM* no sintetiza esta molécula. Se podría especular que los glucanos lineales estarían siendo utilizados por otra proteína para ciclarlos y por esta razón al no tener glucanos lineales en la mutante tampoco hay cíclicos.

B) Importancia de los glucanos en la patogenicidad

Nos propusimos estudiar la importancia del gen *hrpM* en el proceso infeccioso. Para esto se inoculó la cepa silvestre (306) y mutante en hojas jóvenes de limón y de pomelo. En ambos casos se realizó una lastimadura en la hoja y se colocaron 10 μ l de una suspensión bacteriana con una DO de 0,1. Las infecciones se realizaron por triplicado.

Se eligieron siempre hojas jóvenes ya que son más susceptibles que las hojas mayores. Por otro lado también se probó con plantas de pomelo ya que este cultivar es altamente susceptible a la cancrrosis. Como se puede observar en la figura 3.12A y B la mutante no pudo producir la enfermedad en ninguno de los dos cultivares

ensayados. Estos resultados nos estarían indicando que los glucanos sintetizados por esta proteína son esenciales para que la bacteria pueda sobrevivir de manera epifítica.

Para ver si la bacteria logra sobrevivir dentro de la planta sin tener que pasar la barrera de la cutícula se inoculó por infiltración ambas cepas dentro de la hoja del limón, la figura 3.12C se ve que la mutante a diferencia de la cepa silvestre sigue siendo incapaz de desarrollar la enfermedad (Fig. 3.12C).

Estos resultados estarían indicando que la presencia de los glucanos sintetizados por la proteína HrpM son esenciales para el buen desarrollo de la enfermedad sin importar que tipo de cultivar se utiliza ni la manera de inocular.

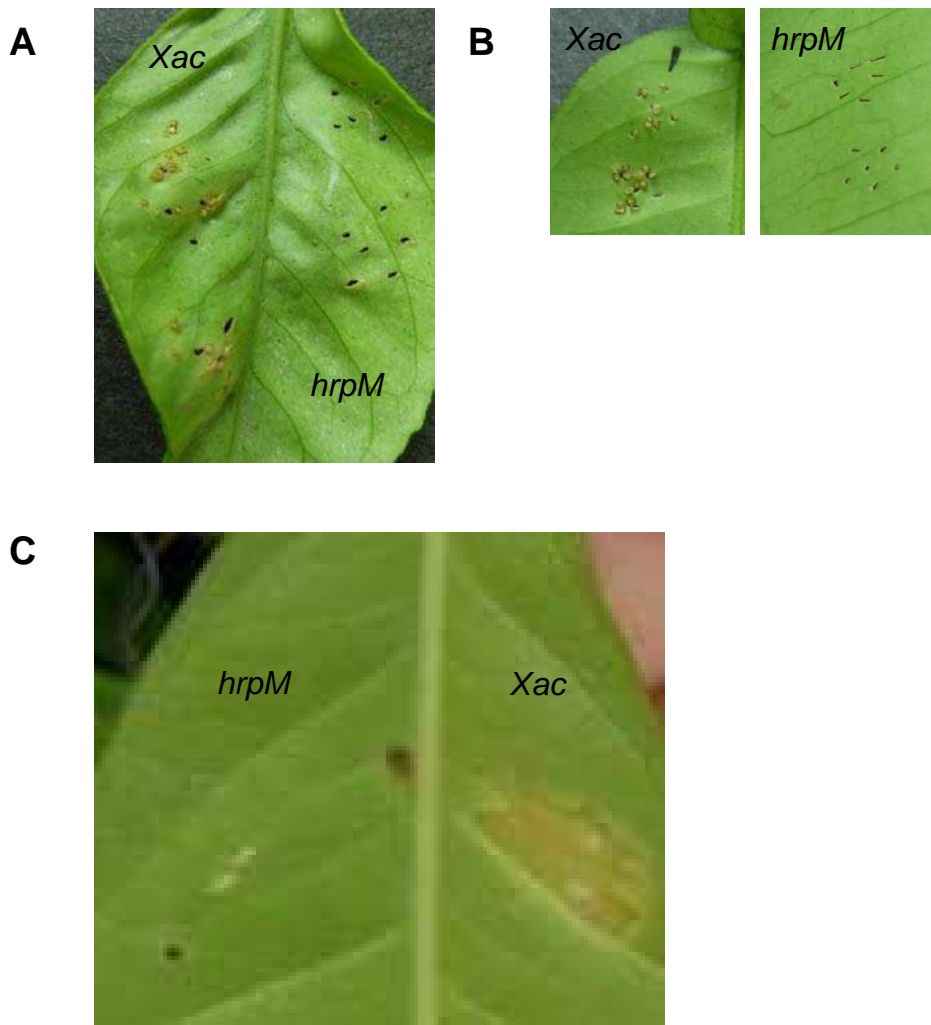


Figura 3.12: Infección en hojas jóvenes. A) de pomelo. **B)** de limón. **C)** infiltrando con una DO de 0,1 en hojas jóvenes de limón. Las fotos fueron tomadas luego de 4 semanas en el caso de A) y B) y 2 semanas en el caso de C).

C) Producción de factores de virulencia de la mutante *hrpM*

Para tratar de entender mejor el rol que juega esta proteína en la patogenicidad de *Xac* se evaluaron diferentes factores de virulencia que pudieran estar afectados.

Como se mencionó anteriormente la capacidad de moverse es una característica muy importante y necesaria. Gracias a ello las bacterias pueden dirigirse hacia zonas con mayor concentración de nutrientes. Nosotros describimos dos tipos de movilidad en *Xac*, una dependiente del flagelo y la otra dependiente de la síntesis del exopolisacárido.

Se realizaron los ensayos por triplicado, obteniendo siempre la misma tendencia. En la figura 3.13 se muestra uno de ellos.

En placas de petri se sembraron 3 μ l de la cepa silvestre en la zona superior y 3 μ l de la mutante en la región inferior. Para los dos tipos de movilidad se utilizaron diferentes medios (ver materiales y métodos). Para esto se utilizaron cultivos en fase estacionaria de menos de 20 hs de crecimiento. Se puede observar que la mutante posee una movilidad disminuida en el *swimming*, esto es dependiente del flagelo (Fig. 3.13A). En cambio no hubo diferencias en el *sliding*, que depende en parte de la presencia del exopolisacárido.

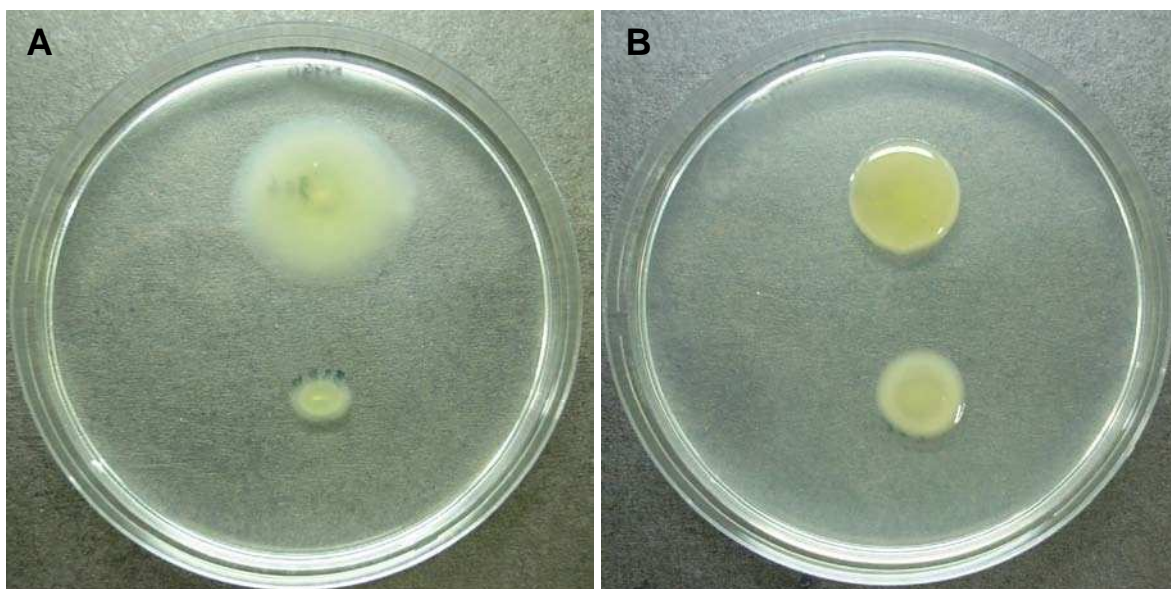


Figura 3.13: Movilidad de la cepa *hrpM*. A) *Swimming* en agar blando. B) *sliding*. Foto más representativa. N=3

Como se describió anteriormente los exopolisacáridos en bacterias fitopatógenas son secretados y se encuentran vinculados con la patogenicidad y la virulencia. El xantano es el principal exopolisacárido que produce *Xac*. Con el objetivo

de determinar si la ausencia de virulencia de la mutante *hrpM* está relacionada con una disminución en su producción se realizaron ensayos de precipitación, donde las bacterias fueron crecidas en medio rico. En el gráfico se muestra el promedio de la relación entre el xantano (peso seco) producido por la cantidad de células (peso seco). Las muestras siempre fueron liofilizadas hasta sequedad total antes de ser pesadas. Como se evidencia en el gráfico de la figura 3.14 no hubo una diferencia significativa entre ambas cepas.

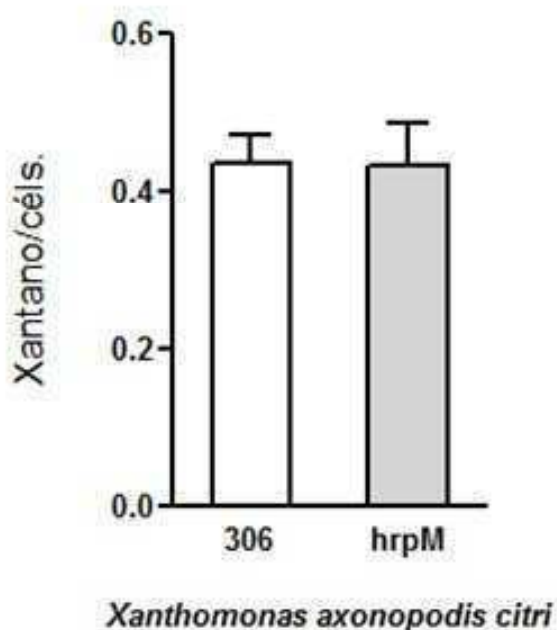


Figura 3.14: Producción de exopolisacárido. En la mutante *hrpM* y la cepa silvestre en cultivos crecidos en medio rico hasta fase estacionaria. N=6.

Se estudió la secreción de dos tipos de enzimas conocidas por su participación en el momento de la infección: amilasa y proteasa. Estos ensayos fueron realizados con sobrenadantes de cultivos de bacterias en la fase estacionaria y crecidas en el medio PYM. Se tomaron 20 μ l de los sobrenadantes y se colocaron en pocillos realizados en placas conteniendo almidón o leche descremada, dependiendo del experimento. Se graficaron los datos de 6 experimentos independientes. Se puede observar en la figura 3.15 que hay una diferencia en la secreción de la proteasa, pero no en la secreción de la amilasa.

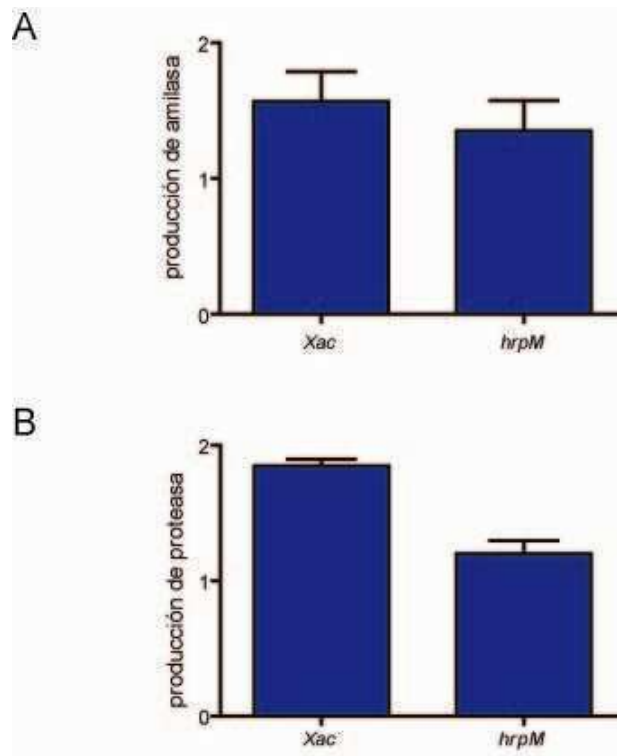


Figura 3.15: Ensayos de producción de enzimas extracelulares. A) Producción de amilasa y **B)** Producción de proteasa. En ambos casos se crecieron las bacterias en medio rico N=6

Como el sistema de defensa las plantas producen una cantidad de compuestos antimicrobianos como por ejemplo especies reactivas del oxígeno dentro de las cuales se encuentra el agua oxigenada. Suponiendo que los glucanos estarían actuando de alguna manera en la estabilización de la membrana se trato de ver si la ausencia de los mismos podría ocasionar algún efecto en la resistencia a este producto. Se realizó el ensayo de inhibición de crecimiento por presencia de H_2O_2 . Las bacterias que fueron utilizadas para hisopar las placas, fueron crecidas esta vez en el medio mínimo YMM. Luego de 48 horas en una estufa a $28\text{ }^\circ\text{C}$ se midieron los halos de inhibición del crecimiento y se tomaron las fotos. El experimento fue repetido 3 veces. Como se observa en la figura 3.16 la mutante es más sensible al peróxido de hidrógeno que la cepa silvestre.

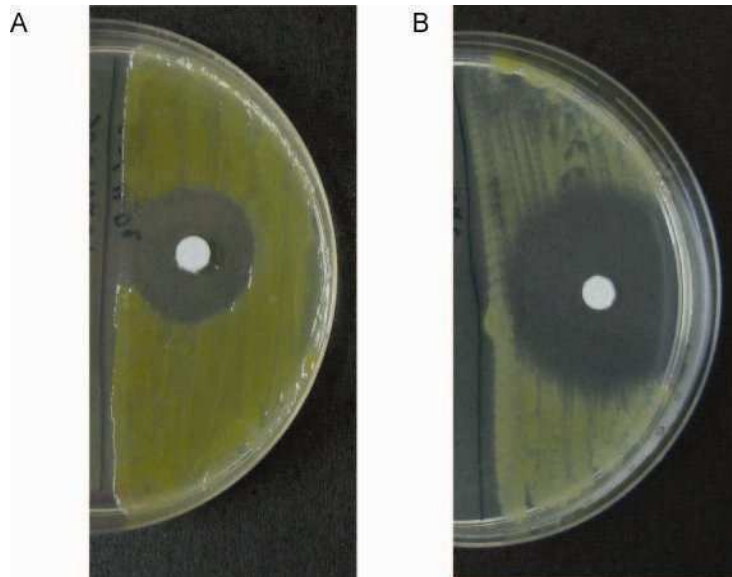


Figura 3.16: Resistencia al peróxido de hidrógeno. A) Cepa silvestre B) Cepa deficiente en producción de glucanos lineales. Ambas fueron crecidas en medio mínimo e hisopadas en placas sin antibióticos. En el disco se colocaron 3 µl de H₂O₂

En conjunto estos resultados muestran por primera vez que existe una relación entre la capacidad de formar biofilm, la síntesis de glucanos y la virulencia en *Xac*.

Se pudo constatar que el gen *hrpM* está involucrado en la síntesis de glucanos cíclicos, aunque no se puede descartar que también esté involucrado en la síntesis de los lineales.

Discusión

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (*Xac*) es una bacteria fitopatógena que produce la cancrrosis de los cítricos, con grandes pérdidas económicas en nuestro país y en los países que poseen de manera endémica esta enfermedad. Se transmite por el viento y la lluvia sin la necesidad de un vector, entrando la bacteria a las hojas a través de sus estomas o por la existencia previa de lastimaduras. La infección produce una estructura corchosa con forma de pústula llamada cancro, en cuyo interior se encuentran las bacterias. Para que logren formarse los cancros, *Xac* tiene que evadir el sistema de defensa de la planta y sobrevivir al ambiente hostil de la hoja.

El biofilm es una comunidad de microorganismos, embebida en una matriz de exopolisacáridos donde también se encuentran presentes proteínas y ADN, unidos a un soporte (86); *Xac* es capaz de formar biofilm sobre un soporte abiótico y en un medio mínimo que simula el exterior de las hojas (50). También se pudo observar la existencia de un ordenamiento sobre las hojas de los cítricos y adentro de los cancros (50).

En esta tesis de doctorado se estudiaron diversos factores importantes en la interacción de *Xac* con su hospedador. El estudio realizado estuvo enfocado en la búsqueda de nuevos genes que estuvieran implicados en el desarrollo del biofilm, en particular en la primera etapa de este proceso: la adhesión.

Estructuras externas

A fin de determinar qué papel cumple el flagelo en el desarrollo del biofilm, se generaron dos mutantes en genes implicados en la síntesis de la flagelina (*fliC*) y del gancho flagelar (*flgE*). Ambas estructuras se encuentran en la parte externa de la bacteria.

Los ensayos realizados mostraron que *Xac* utiliza el flagelo para nadar a través de un ambiente acuoso, o con bajo porcentaje de agar, ya que a diferencia de la cepa silvestre ambas mutantes fueron incapaces de moverse en estas condiciones. Esta estructura es una de las organelas más grandes que poseen las bacterias. Muchos trabajos la relacionan no solo con la movilidad de tipo “nado” ó *swimming* sino también con el *swarming* ó movimiento de tipo enjambre. Este último depende, además, de la cantidad y de la posición de los flagelos, de la coordinación entre las células que forman parte de esa comunidad y de la presencia de agentes surfactantes (139, 141).

Para evaluar si *Xac* era capaz de realizar *swarming* se hicieron ensayos en un medio con un mayor porcentaje de agar, ambas mutantes y la cepa silvestre no presentaron diferencias. Esto indicaría que el movimiento detectado, que no depende del flagelo, no sería *swarming*, ya que éste necesita, por definición, a la estructura intacta. En cambio, la necesidad del xantano para que este movimiento se produzca (la mutante en el gen *gumB* no mostró movilidad no dependiente de flagelo) indica que estamos en presencia del movimiento *sliding* ó deslizamiento, cuya característica es que no depende de la presencia del flagelo pero si de un agente surfactante que reduzca la fricción entre las células y el sustrato (139). A la vez se observó que ambos tipos de movimiento dependen del sistema de *quorum sensing* de *Xac*, ya que las mutantes en los genes *rpfF* y *rpfC*, no mostraron la misma capacidad para moverse que la cepa silvestre. En este sentido la disminución en la expresión de los genes *fliC* y *gumB* en ambas mutantes confirma claramente esta afirmación.

Existen muchos ejemplos de bacterias capaces de realizar más de un tipo de movimiento dependiendo del lugar donde se encuentran. *Pseudomonas aeruginosa*, por ejemplo, es un patógeno oportunista que habita diferentes ambientes, uno de ellos es el tracto respiratorio del hombre. En esta situación la producción del flagelo está regulada negativamente (160) y la bacteria se desplaza mediante un movimiento que no depende de esa estructura. En otro trabajo, realizado con esta misma bacteria, se demuestra que a pesar de la deficiencia en la síntesis del flagelo y del pili de tipo IV (involucrado en un tipo de movimiento llamado *twitching*) sigue siendo capaz de desplazarse. Los autores postulan que el movimiento realizado por estas mutantes es *sliding* (142).

Xac posee la capacidad de vivir de manera epifítica y, de manera endofítica, en el espacio intercelular ó apoplástico de las hojas. Ambos ambientes son muy diferentes entre sí, y, posiblemente, la bacteria necesite movilizarse en estos dos hábitats de manera distinta. Podríamos especular entonces, que los dos tipos de movilidad estudiados son utilizados en estas dos situaciones.

Diversos trabajos le conceden al flagelo una función determinante durante la colonización de superficies abióticas y bióticas. En *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* mutantes deficientes en esta estructura son incapaces de adherirse a semillas y raíces (161-163). En *Pseudomonas aeruginosa* también se vio que su presencia es necesaria para la adhesión (96).

El medio de cultivo donde se realizan estos estudios es un factor importante. Mutantes de movilidad de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, que eran incapaces de adherirse al soporte abiótico, lograron revertir esta situación cuando se agregó citrato en el medio de cultivo (97). En exudados de raíces y de semillas hay altas concentraciones de este compuesto (164). Estos resultados nos indican que existen distintos agentes para que la bacteria pueda o no formar el biofilm.

En el modelo que nosotros elegimos para realizar los estudios de adhesión y desarrollo del biofilm, utilizamos un medio de cultivo pobre en nutrientes, con cantidades mínimas de sales, glucosa y glutamato de sodio. Al tratarse de una bacteria con capacidad de crecer epifíticamente, *Xac* se encuentra en un ambiente donde los nutrientes son muy pocos y por esto el medio utilizado resulta acorde a lo que acontece en la naturaleza.

Nuestros resultados demuestran, que mutantes afectadas en la formación del flagelo poseen una adhesión reducida al soporte abiótico utilizado. Además, el biofilm no fue similar al de la cepa silvestre, el cual posee canales de agua y pilares de bacterias. Lo que si se mantuvo igual fue la forma de unión entre las células. Por otra parte, al realizar ensayos de infección se vio que ambas mutantes no sufrieron una reducción drástica en su grado de virulencia. Aunque la mutante en el gen *flgE* presentó una reducción significativa en su capacidad de formar cancros, aún posee esta habilidad.

La adhesión es el primer paso en el proceso de desarrollo del biofilm. Las bacterias poseen distintos tipos de apéndices que pueden estar involucrados en esta etapa. Las adhesinas son uno de ellos. Numerosos estudios realizados en patógenos de animales proponen que las adhesinas se encuentran relacionadas con la virulencia. En bacterias fitopatógenas el rol de estas proteínas resulta menos claro. Estudios realizados en *Xylella fastidiosa* (165) y en *Erwinia chrysanthemi* (166), proponen que mutantes deficientes en este tipo de proteínas no son capaces de adherirse entre ellas en el caso de *X. fastidiosa* ó a las hojas de una planta hospedadora en el caso de *E. chrysanthemi*. En *X. fastidiosa* las bacterias se mantienen unidas a través de estas proteínas, y, en esta bacteria, esta interacción modula el grado de virulencia. Las mutantes en las adhesinas, de manera distinta a lo que ocurre en otros casos, son más virulentas que la cepa silvestre. Según los resultados de estos autores las adhesinas no están involucradas en la adhesión *in vitro* a un sustrato. Por el contrario

las mutantes en el gen *hecA* en *E. chrysanthemi* no fueron capaces de unirse a la planta y además son no virulentas.

Con el objetivo de determinar qué función cumple la adhesina FhaB en *Xac* se realizó una mutante en el gen que la codifica. En el momento que comenzamos con estos ensayos no se sabía nada acerca de la función de esta estructura en *Xac*. En el año 2009, el grupo de la Dra. Ottado publicó un trabajo que estudia la función de FhaB en la patogenicidad de *Xac*. Para ello realizaron infecciones en hojas de naranjos, estudios de adhesión, desarrollo de biofilm, etc (167). Si bien, los estudios comparten la misma mutante, el medio utilizado difiere y por lo tanto los resultados no son comparables

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que el medio que ellos utilizan ,el medio XVM2, que induce la expresión de genes del sistema de secreción de tipo III y se supone que mimetiza el ambiente interno de las hojas, el apoplasto, (132) no es capaz de inducir la formación de biofilm (resultados de esta tesis, capítulo 1). En cambio, el medio mínimo que sería similar al ambiente exterior de la planta, sobre las hojas, sí induce estas estructuras.

Los ensayos de adhesión mostraron que la mutante *fhaB* no se adhiere al sustrato abiótico en ninguno de los tiempos estudiados. Además se pudo observar que la mutante fue capaz de agruparse formando estructuras de tipo biofilm pero en comparación a la cepa silvestre estas no son tan estables, al cuarto día ya no se observan.

Sistema de secreción de tipo II

En el segundo capítulo de esta tesis se estudió la relación entre los dos sistemas de secreción de tipo II que posee *Xac* (*xps* y *xcs*), la formación de biofilm y la virulencia en plantas de limón.

Hasta el momento estos sistemas no habían sido estudiados en *Xac*, por consiguiente lo primero que se hizo fue caracterizarlos para ver si eran funcionales. Se trabajó con dos mutantes, una para cada sistema, que poseen mutaciones en los genes que codifican para la proteína que conforma el poro (*xcsD* y *xpsD*). Se sabe que estos sistemas secretan al medio proteínas implicadas en la patogenicidad (35, 168, 169), una de ellas, la amilasa, está relacionada con la degradación de compuestos de la pared celular de la planta. En el ensayo realizado de degradación del almidón, no se observaron diferencias significativas entre los halos de degradación de la cepa silvestre y la mutante *xcsD*, en cambio el sobrenadante del cultivo de la mutante *xpsD*

no fue capaz de degradarlo como lo hizo la cepa silvestre. Este resultado y datos obtenidos por el grupo del Dr. A.M. do Amaral, donde se observa el mismo fenotipo para la secreción de proteasas y endoglucanasas (119), nos estaría indicando que el sistema *xcs* no interviene en la exportación de enzimas y que en cambio el sistema *xps* funciona como un típico sistema de secreción de tipo II. Una de las hipótesis que explicaría este resultado es que el sistema *xcs* no es funcional, para evaluar esta posibilidad realizamos infecciones *in vivo*.

Los ensayos de patogenicidad realizados inoculando hojas jóvenes de limonero, mostraron que ambas mutantes tienen una menor capacidad de generar canchales que la cepa silvestre. Estos datos, sumado a los resultados obtenidos por el grupo del Dr. A.M. do Amaral donde estudian la transcripción *in vivo* de ambos sistemas mediante una PCR cuantitativa, indican que ambos sistemas son funcionales en la planta (119). El sistema de secreción de tipo II se encuentra muy relacionado con el pili de tipo IV (170), ambos comparten algunos genes. Este apéndice está involucrado en el movimiento de *twitching* (42), que se lo relaciona con la movilidad de las bacterias en ambientes con poca cantidad de agua. Además, se vio que la ausencia de esta estructura y por consecuencia la imposibilidad de realizar este movimiento, afectan el desarrollo del biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* (96). Nosotros no pudimos observar este tipo de movimiento en *Xac*, pero no descartamos su existencia. A través del estudio realizado *in vitro* de la adhesión y la formación del biofilm demostramos que ambas cepas se adhieren menos al soporte sintético y no desarrollan estructuras ordenadas. Este es un primer fenotipo asociado a la menor patogenicidad de la cepa *xcs*. Pero, al igual que lo que ocurre con las mutantes del flagelo, la enfermedad pudo desarrollarse, aunque la cantidad de canchales fue menor.

Otro factor de virulencia que se estudió fue la producción del xantano. Según los resultados obtenidos la mutante *xpsD* produce mayor cantidad que la cepa silvestre, esto se ve reflejado además en el aumento del movimiento *sliding*. Este resultado no era lo que se esperaba ya que esta descrito que la presencia del xantano está íntimamente relacionada con la patogenicidad en las bacterias del género *Xanthomonas*, y no es el caso de esta mutante.

Como conclusión, ambas mutantes tienen disminuida su capacidad de adhesión al sustrato abiótico, no son capaces de formar un biofilm son menos patógenas. Con estos resultados podemos concluir que el *cluster* de genes *xps* codifica para un sistema de secreción de tipo II. En cambio, el otro *cluster* de genes no se comporta, al menos no de la manera tradicional, como un sistema de secreción.

Podría tratarse de un pili de tipo IV, pero al no lograr observar el movimiento de *twitching*, habría que realizar algunos otros estudios para corroborarlo.

De los dos primeros capítulos de esta tesis podemos concluir que la incapacidad de formar un biofilm *in vitro* dificulta el desarrollo de la enfermedad en las hojas, pero no la elimina. Trabajos realizados con *Pseudomonas* sostienen que la capacidad de realizar biofilm depende del ambiente en donde se encuentra la bacteria, del estado fisiológico, nutricional y del sustrato. Algo parecido ocurre con *Xac*, la bacteria logró adherirse en condiciones de bajo contenido de nutrientes y a ciertos sustratos abióticos. Por otro lado, aunque no se formara el mismo biofilm ordenado de la cepa silvestre, las mutantes que no poseían flagelo, ni los genes *xcsD* y *xpsD* si bien son infectivas, el grado de virulencia de las mismas está reducido y podría estar relacionado a su incapacidad en producir estructuras de biofilm maduras similares a la cepa silvestre.

Nuevos genes involucrados en el biofilm de *Xac*

En los dos primeros capítulos de esta tesis se estudió la participación de algunos genes en la adhesión y el desarrollo del biofilm de *Xac*. Esto se realizó mediante mutaciones sitio dirigidas en los genes blanco.

Con el objetivo de encontrar nuevos genes que participen en el desarrollo del biofilm de *Xac* se generó una población de mutantes por inserción al azar del transpón Tn5 en el genoma bacteriano. Esta población fue utilizada para realizar un *screening* buscando nuevos genes relacionados con la adhesión. El *screening* se realizó utilizando la técnica de tinción con cristal violeta desarrollada por O'toole y colaboradores (128).

Se obtuvieron 28 mutantes reducidas en la adhesión al soporte abiótico utilizado, algunas presentaron más problemas para adherirse que otras. Dentro de esta lista obtuvimos mutantes en genes cuya participación en el desarrollo del biofilm de *Xac* ya era conocida. Estos genes son:

- *Xac0695*, *xcsD* (esta tesis y 119)
- *Xac2292*, *galU* (156)
- *Xac2585*, *gumB* (50)
- *Xac3534*, *xpsD* (esta tesis y 119)

Y genes que participan en el desarrollo del biofilm en otras especies bacterianas:

- Xac0019, *omp1* (171)
- Xac0618, *hrpM* (172)
- Xac1081, *hupB* (173)
- Xac1495, *xrvA* (174)

El hecho de que algunos de estos genes interrumpidos por el Tn5 ya hayan sido relacionados con el desarrollo del biofilm avala el método de screening elegido.

Se encontraron dos mutantes con inserciones en el gen *gumB*, que como se mencionó anteriormente codifica para una de las proteínas implicada en la síntesis del xantano, el exopolisacárido producido por las bacterias del género *Xanthomonas*. En un trabajo realizado por nuestro grupo se determinó su importancia tanto en el desarrollo del biofilm como en la patogenicidad de *Xac* (50). Pero no solo en esta bacteria el exopolisacárido es importante, como se mencionó también en la introducción, hasta el momento todos los biofilms bacterianos estudiados poseen algún polisacárido como principal componente (87, 89, 90, 91). Otros genes mutados, que confirman la importancia del xantano en la formación del biofilm de *Xac* fueron: Xac2583 (mutante 7A7) que codifica para la proteína *GumD* Esta proteína realiza la transferencia de una glucosa-fosfato proveniente de la UDP-glucosa dadora al lípido-fosfato situado en la membrana interna bacteriana, comenzando de esta manera a sintetizarse el lipido-difosfato-pentasacárido, unidad repetitiva del xantano (175). La mutante Xac2292 (mutante 1C11) que codifica para la proteína GalU, una UDP-glucosa pirofosforilasa, cataliza la formación de UDP-glucosa a partir de glucosa 1 fosfato y UTP. La UDP-glucosa está involucrada en la síntesis del lipopolisacárido, una estructura de superficie que se encuentra glucosilada.

Otra de las mutantes encontrada en el *screening*, la mutante 85H3, posee la inserción en el gen Xac0019, codifica para una proteína de la membrana externa que transporta ácidos grasos de cadena larga. En un *screening* realizado con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en búsqueda de genes que afectaran su adhesión a la fibronectina encontraron una mutante, que además, era incapaz de desarrollar un biofilm en una superficie abiótica ni de infectar el modelo de estudios que ellos utilizaron (171). Nosotros vimos que la mutante en este gen, homólogo al de *P. fluorescens*, además de no adherirse correctamente a la superficie abiótica tampoco logró desarrollar la enfermedad en hojas de limón, pero sí de pomelo.

Una de las mutantes encontradas que posee la inserción en un gen que codifica para una proteína sensora que forma parte de un sistema de dos

componentes no descrito antes, 90H5 (Xac0135), abre una línea interesante de trabajo a ser desarrollada en el laboratorio.

También se encontraron proteínas involucradas en la regulación transcripcional y post-transcripcional:

Mutante en el gen *rpoC* (subunidad β de la RNA polimerasa)

Mutante en el gen *GntR*

Mutantes en genes que codifican proteínas de tipo histona, como ser las mutantes Xac1495 y Xac1081, codifican para un regulador de virulencia (*xrvA*) (176) y para una proteína de tipo histona (*hupB*).

De las 28 mutantes encontradas en el *screening* 5 de ellas poseían una inserción del Tn5 en proteínas hipotéticas y una de ellas en una región reguladora de uno de los dos plásmidos que posee Xac (pXac64).

El gen **Xac2301** (mutante 87G7) codifica una proteína de 109 aminoácidos muy conservada dentro del género de *Xanthomonas*. A pesar de esto, al realizar una búsqueda en las bases de datos disponibles, no se encontraron dominios conocidos similares a esta. Lo mismo ocurrió con la mutante 100C11, cuyo Tn5 se insertó en el gen **Xac3266**. A diferencia del caso anterior, se encontró que esta proteína esta interactuando con una región de la proteína VirD4, que forma parte del sistema de secreción de tipo 4 de *Xanthomonas* (177).

En la mutante 94D11 el Tn5 se insertó en un gen (**Xac2113**) que codifica para una proteína hipotética de 603 aminoácidos muy conservada dentro del género y que posee una secuencia conocida (*pfam*) cuya función se desconoce, DUF3300 (del inglés, domain of unknown function). Este dominio posee un segmento largo e hidrofóbico que nos permitiría especular la posición de la misma dentro de una membrana (valor E= 8.51e-56).

Xac3657 es otra de las proteínas hipotéticas que mostraron una disminución en la adhesión cuando el Tn5 se insertó. El gen mutado en esta mutante (100F6) codifica para una proteína de 270 aminoácidos, que se encuentra muy conservada dentro del género, y que, en otras bacterias se le otorgó como función putativa la de ser secretada (*pfam*).

La mutante 89A5 (gen Xac 1043) codifica una proteína de 548 aminoácidos, con un dominio de metaloproteasa. Estas proteínas necesitan del metal para funcionar. Son proteínas de membrana y están involucradas en proteólisis. En algunos biofilms se vio que las mismas están formando parte de la matriz extracelular. Sin embargo para poder entender mejor que función cumplen estas proteínas en el

desarrollo del biofilm y en la patogenicidad de *Xac* hacen falta más estudios. Se podría realizar ensayos de expresión *in vivo*, para determinar si estos genes son funcionales en la planta. También se podrían realizar estudios de interacción con otras proteínas para ver los caminos metabólicos en los cuales están involucradas.

Nuevos genes involucrados en el biofilm de *Xac*: mutante en el gen *hrpM*

En particular se decidió ahondar con mayor profundidad en la caracterización de una de las mutantes encontradas. En esta mutante el Tn5 se insertó en el gen que codifica la proteína HrpM, encargada de la síntesis de los glucanos lineales.

En general, mutantes de diferentes especies en genes que participan en la síntesis de glucanos, ya sean lineales o cíclicos (GC), poseen la virulencia atenuada (65). Para evaluar si esto mismo ocurre en *Xac* se realizaron ensayos *in vivo*, los resultados obtenidos demuestran que la mutante no es capaz de desarrollar la enfermedad al inocularla con hisopos en la cara abaxial de hojas lastimadas. Es importante recalcar que este método se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza. Este mismo resultado se obtuvo cuando se utilizó el método de infiltración, forzando la entrada al apoplasto de una mayor cantidad de bacterias.

Ambos fenotipos, el de adherirse en menor grado que la cepa silvestre y no provocar enfermedad, no fueron observados en todas las mutantes que se utilizaron en esta tesis. En general observamos que algunas de las bacterias con deficiencias para adherirse seguían siendo patógenas. Podríamos pensar que en esos casos los genes truncados no son tan esenciales o cumplen una o pocas funciones. En cambio en esta mutante (algo similar ocurre con la mutante en el gen *gumB* (50)) el desajuste ocasionado por la falta de glucanos conlleva a un desbalance mayor que impide su supervivencia en la planta. Como se observó en otras bacterias, la deficiencia en la síntesis de los glucanos causa fenotipos pleiotrópicos.

Los glucanos lineales y cíclicos se encuentran en el periplasma de las bacterias Gram negativas que pertenecen al grupo de las proteobacterias (55). Su presencia aporta estabilidad que genera un ambiente propicio para el correcto ensamblado de distintas estructuras presentes en las membranas plasmáticas. La ausencia de GC en *E. coli* produjo una disminución en el número de flagelos (178). Nosotros observamos una disminución en la movilidad de tipo *swimming* en la mutante *hrpM*. Esto podría deberse a una dificultad en el ensamblado del flagelo ó a una disminución en la expresión de alguno de los genes que lo conforman.

Por otro lado, otro fenotipo observado en mutantes de *E. coli* es el aumento en la síntesis del ácido colánico, un exopolisacárido presente en enterobacterias (179). Esto mismo se observa en un trabajo reciente realizado con mutantes *hrpM* en *Pseudomonas syringae* (172) donde la producción de alginato (el EPS de *Pseudomonas* spp.) es 10 veces mayor en la mutante. Nuestros resultados muestran, a diferencia de lo anterior que tanto la producción del xantano como el *sliding* no se vieron alterados.

El H₂O₂ es uno de los productos que sintetiza la planta para defenderse de los patógenos. Éstos, a su vez poseen diferentes tipos de enzimas que degradan la molécula y la vuelven inocua (158; 159). Al realizar ensayos de inhibición del crecimiento se observó que la mutante *hrpM* es más sensible a este compuesto que la cepa silvestre. Al desorganizarse la membrana plasmática, a causa de la ausencia de los glucanos, compuestos tóxicos como el H₂O₂ se volverían más permeables, aumentando de esta manera su concentración adentro de las células.

Utilizando el método de cromatografía en capa delgada se analizaron extractos de células en cuanto a la producción de glucanos cíclicos y se observó que la mutante no es capaz de producirlos, confirmando por primera vez en *Xac* que el gen *hrpM* sintetiza un glucano sintetaza.

Xac posee dos genes que estarían siendo responsables de la síntesis de estas moléculas osmorreguladoras: *hrpM*, *ndvB*. En *Rizhobium* spp. existe una proteína NdvB que sintetiza el polímero de glucosa y luego lo cicla (180), produciendo de esta manera glucanos cíclicos. En *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) existen 3 genes putativos para la síntesis de glucanos, *ndvB*, *psG* y *hrpM*. Al mutar el gen *ndvB* la síntesis de los glucanos cíclicos no se vio afectada (datos no publicados), en cambio al mutar los otros dos genes la bacteria fue incapaz de producirlos (66, datos no publicados). En el genoma de *Xac* solo se encontraron dos genes involucrados en la síntesis de glucanos, y son aquellos con homología a los genes *psG* y *hrpM* de *Xcc*. Tanto en *Xac* como en *Xcc* las mutantes en genes involucrados en la síntesis de glucanos lineales están afectadas en la síntesis de glucanos cíclicos.

La dificultad de realizar biofilm *in vitro* en mutantes en el gen *hrpM* también se vio en dos especies de *Pseudomonas*. En el año 2010 en un trabajo realizado con *Pseudomonas syringae* se mostró que mutantes en el gen *hrpM* no son capaces de adherirse *in vivo* y tampoco *in vitro*. Lo curioso es que esta mutante tiene la producción del alginato exacerbada. En nuestro caso la mutante produce la misma cantidad de xanthano que la cepa silvestre. Una hipótesis para explicar esto podría ser que para

que el biofilm se logre desarrollar el exopolisacárido tiene que tener glucanos, que estarían proporcionando estabilidad a la estructura. Otro trabajo demuestra que en *Pseudomonas aeruginosa* la mutante en el gen *hrpM* solamente es incapaz de formar un biofilm cuando se la cultivo en cámaras de flujo continuo (181).

A diferencia de lo que se vio en otras bacterias, en *Xac* los genes involucrados en la síntesis de los glucanos no se encuentran en un cluster (*opgGH* ó *mdoGH*) (182). En *Xac* el gen que codifica la proteína HrpM (homóloga a MdoH) es el gen número 0618, como se observa en la figura 1A. En cambio el gen responsable de la síntesis del homólogo a *mdoG* es el gen 4284.

BIBLIOGRAFÍA

1. M.Goto AT, M.A.Messina (1980) A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancrisis B in Argentina. *Ann.Phytopathol. Soc.* 46:329–338.
2. Canteros B (2003) cancrisis de los citrus.).
3. Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, & Achor DS (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. (Translated from eng) *Mol Plant Pathol* 5(1):1-15.
4. Gottwald TR, Hughes G, Graham JH, Sun X, & Riley T (2001) The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. *Phytopathology* 91(1):30-34.
5. federcitrus (2008) La actividad citrícola Argentina. in <http://www.federcitrus.org.ar/>.
6. Coletta-Filho HD, *et al.* (2006) Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *J Appl Microbiol* 100(2):279-285.
7. Brunings AM & Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 4(3):141-157.
8. Gottwald TR, Graham, J. H., and Schubert, T. S. (2002) Citrus canker: The pathogen and its impact. . *Online Plant Health Progress* 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
9. Vojnov AA, do Amaral AM, Dow JM, Castagnaro AP, & Marano MR (Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):467-477.
10. Texeira DC, Wulff N A, Martins E C, Kitajima E W, Bassanezi R, Ayres A J, Eveillard S, Saillard C, Bové J M (2008) A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'- Broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* (98):997-984.
11. Swings J & Civerolo E (1993) *Xanthomonas* (Chapman & Hall).
12. Lu H, *et al.* (2008) Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *xanthomonas*. *PLoS One* 3(11):e3828.
13. da Silva AC, *et al.* (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417(6887):459-463.
14. Goto M (1992) Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. in *San Diego: Academic Press*).
15. Stall REJ, Miller, J.W., Marco, G.M. & Canteros de Echenique B.I. (1980) Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing cancrisis of citrus in Argentina. *Proc.Fla.Hort.Soc* 93:10-14.
16. Gotwald JG, Graham, E.L., Civerola, Barrett, H.C. & Hearn, C.J. (1993) Differential host range of citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Dis.* 77:1004-1009.
17. Bradbury JF (1984) *Xanthomonas*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed Krieg NRH, J.G (Williams & Wilkins), Vol 1.
18. Polek M. VG, Godfrey K. (2007) *Citrus Bacterial Canker Disease and Huanglongbing* (University of California, California), (services AaNRC).
19. Puhler A, *et al.* (2004). What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr Opin Plant Biol* 7(2):137-147.
20. Beattie GA & Lindow SE (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89(5):353-359.

21. Lindow SE & Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69(4):1875-1883.
22. Thompson IP, M. J. Bailey, J. S. Fenlon, T. R. Fermor, A. K. Lilley, J. M. Lynch, P. J. McCormack, M. P. McQuilken, and K. J. Purdy (1993) Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Soil* 150:177-191.
23. Mercier J & Lindow SE (2000) Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol* 66(1):369-374.
24. Mansvelt EL & Hattingh MJ (1989) Scanning Electron Microscopy of Invasion of Apple Leaves and Blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol* 55(2):533-538.
25. Leben C (1969) Colonization of soybean buds by bacteria: observations with the scanning electron microscope. *Can J Microbiol* 15(3):319-320.
26. Davis CL & Brlansky RH (1991). Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* 57(10):3052-3055.
27. Hutchison ML & Gross DC (1997). Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol Plant Microbe Interact* 10(3):347-354.
28. Finlay BB & Falkow S (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2):136-169.
29. Saier MH, Jr. (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 214(2):75-90.
30. Buttner D & Bonas U (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 34(2):107-133.
31. Troisfontaines P & Cornelis GR (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 20:326-339.
32. Kay S & Bonas U (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. (Translated from eng) *Curr Opin Microbiol* 12(1):37-43 (in eng).
33. Journet L, Hughes KT, & Cornelis GR (2005). Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review). *Mol Membr Biol* 22(1-2):41-50.
34. Soscia C, Hachani A, Bernadac A, Filloux A, & Bleves S (2007). Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189(8):3124-3132.
35. Jha G, Rajeshwari R, & Sonti RV (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 18(9):891-898.
36. Sandkvist M (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* 69(6):3523-3535.
37. Pugsley AP (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57(1):50-108.
38. Voulhoux R, *et al.* (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* 20(23):6735-6741.
39. Sandkvist M (2001). Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40(2):271-283.
40. Lindeberg M, Boyd CM, Keen NT, & Collmer A (1998). External loops at the C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the out type II pathway. *J Bacteriol* 180(6):1431-1437.
41. Kulkarni R, *et al.* (2009). Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 4(3):e4752.

42. Mattick JS (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56:289-314.
43. Asikyan ML, Kus JV, & Burrows LL (2008). Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190(21):7022-7034.
44. Jha G, Rajeshwari R, & Sonti RV (2007). Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 20(1):31-40.
45. da Silva FR, Vettore AL, Kemper EL, Leite A, & Arruda P (2001). Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiol Lett* 203(2):165-171.
46. Vojnov AA, Slater H, Daniels MJ, & Dow JM (2001). Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 14(6):768-774.
47. Harding NE, Cleary JM, Cabanas DK, Rosen IG, & Kang KS (1987). Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol* 169(6):2854-2861.
48. Denny TP (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33:173-197.
49. Dharmapuri S & Sonti RV (1999). A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol Lett* 179(1):53-59.
50. Rigano LA, *et al.* (2007). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 20(10):1222-1230.
51. Chou FL, *et al.* (1997). The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem Biophys Res Commun* 233(1):265-269.
52. Yun MH, *et al.* (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol* 141(1):178-187.
53. Torres PS, *et al.* (2007). Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol* 9(8):2101-2109.
54. Dow JM, *et al.* (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19):10995-11000.
55. Bohin JP (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 186(1):11-19.
56. Miller KJ, Kennedy EP, & Reinhold VN (1986). Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 231(4733):48-51.
57. Lequette Y, Odberg-Ferragut C, Bohin JP, & Lacroix JM (2004). Identification of mdoD, an mdoG paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. *J Bacteriol* 186(12):3695-3702.
58. Higgins CF, Sutherland L, Cairney J, & Booth IR (1987). The osmotically regulated proU locus of *Salmonella typhimurium* encodes a periplasmic betaine-binding protein. *J Gen Microbiol* 133(2):305-310.
59. Bhagwat AA, *et al.* (1999). Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1-->3)-beta-glucosyl. *Plant Physiol* 119(3):1057-1064.
60. Geremia RA, *et al.* (1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1---2) glucan. *J Bacteriol* 169(2):880-884.

61. Hamburg A, *et al.* (2001). Comparative degradation of [14C]-2,4-dichlorophenoxyacetic acid in wheat and potato after Foliar application and in wheat, radish, lettuce, and apple after soil application. *J Agric Food Chem* 49(1):146-155.
62. Mukhopadhyay P, Mukhopadhyay M, & Mills D (1990). Construction of a stable shuttle vector for high-frequency transformation in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* 172(1):477-480.
63. Mukhopadhyay P, Williams J, & Mills D (1988). Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* 170(12):5479-5488.
64. Talaga P, Fournet B, & Bohin JP (1994). Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* 176(21):6538-6544.
65. Minsavage GV, Mudgett MB, Stall RE, & Jones JB (2004). Importance of *opgHXcv* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 17(2):152-161.
66. Rigano LA, *et al.* (2007). Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell* 19(6):2077-2089.
67. Debarbieux L, Bohin A, & Bohin JP (1997). Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179(21):6692-6698.
68. Chevance FF & Hughes KT (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6(6):455-465 .
69. Apel D & Surette MG (2008). Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* 1778(9):1851-1858.
70. Aizawa SI (1996). Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 19(1):1-5.
71. Jarrell KF & McBride MJ (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6(6):466-476.
72. Barken KB, *et al.* (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 10(9):2331-2343.
73. Van Houdt R & Michiels CW (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 156(5-6):626-633.
74. Yildiz FH & Visick KL (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol* 17(3):109-118.
75. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, & Kolter R (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* 39(2):223-235.
76. Pratt LA & Kolter R (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30(2):285-293.
77. Davey ME & O'Toole G A (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):847-867.
78. Girard V & Mourez M (2006). Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol* 157(5):407-416.
79. Feil H, Feil WS, & Lindow SE (2007). Contribution of Fimbrial and Afimbrial Adhesins of *Xylella fastidiosa* to Attachment to Surfaces and Virulence to Grape. *Phytopathology* 97(3):318-324.
80. Das A, Rangaraj N, & Sonti RV (2009). Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 22(1):73-85.

81. Boller T & Felix G (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406.
82. Jones JD & Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329.
83. Katagiri F & Tsuda K (2010). Understanding the plant immune system. *Mol Plant Microbe Interact* 23(12):1531-1536.
84. Odjakova M HC (2001). THE COMPLEXITY OF PATHOGEN DEFENSE IN PLANTS. *BULG. J. PLANT PHYSIOL.* 27:101–109.
85. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, & Lappin-Scott HM (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-745.
86. Costerton JW (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11(3-4):217-221; discussion 237-219.
87. Watnick P & Kolter R (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182(10):2675-2679.
88. Paster BJ, *et al.* (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12):3770-3783.
89. Kolter R & Greenberg EP (2006). Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441(7091):300-302.
90. O'Toole G, Kaplan HB, & Kolter R (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79.
91. Monds RD & O'Toole GA (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 17(2):73-87.
92. Sauer K (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* 4(6):219.
93. Watnick PI & Kolter R (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* EI Tor biofilm. *Mol Microbiol* 34(3):586-595.
94. O'Toole GA, Gibbs KA, Hager PW, Phibbs PV, Jr., & Kolter R (2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182(2):425-431.
95. Pringle JH & Fletcher M (1986). Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 51(6):1321-1325.
96. O'Toole GA & Kolter R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30(2):295.
97. O'Toole GA & Kolter R (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28(3):449-461.
98. Stanley PM (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can J Microbiol* 29(11):1493-1499.
99. Keyhani NO & Roseman S (1996). The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinase. *J Biol Chem* 271(52):33414-33424.
100. Pruzzo C, Crippa A, Bertone S, Pane L, & Carli A (1996). Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin-binding proteins. *Microbiology* 142 (Pt 8):2181-2186.
101. Werner E, *et al.* (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70(10):6188-6196.
102. Kihara K, *et al.* (2009). Global/temporal gene expression analysis of *Escherichia coli* in the early stages of symbiotic relationship development with the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biosystems* 96(2):141-164.

103. Davies DG & Geesey GG (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 61(3):860-867.
104. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, & Costerton JW (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187-209.
105. Stoodley P, *et al.* (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5608-5613.
106. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, & Davies DG (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184(4):1140-1154.
107. Bassler BL, Greenberg EP, & Stevens AM (1997). Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179(12):4043-4045.
108. Davies DG, *et al.* (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280(5361):295-298.
109. De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C, & Iglewski BH (2001). Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 67(4):1865-1873.
110. Hammer BK & Bassler BL (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 50(1):101-104.
111. Ross P, *et al.* (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325(6101):279-281.
112. Bobrov AG, Kirillina O, & Perry RD (2005). The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol Lett* 247(2):123-130.
113. Boles BR & McCarter LL (2002). *Vibrio parahaemolyticus* *scrABC*, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J Bacteriol* 184(21):5946-5954.
114. Hickman JW, Tifrea DF, & Harwood CS (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(40):14422-14427.
115. Kazmierczak BI, Lebron MB, & Murray TS (2006). Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 60(4):1026-1043.
116. Simm R, Morr M, Kader A, Nimitz M, & Romling U (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53(4):1123-1134.
117. Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, & Jenal U (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* 280(35):30829-30837.
118. Malamud F, *et al.* (2011). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* Mar;157(Pt 3):819-29.
119. Rafael A. Homem MAM, Florencia Malamud, Juliana C. Baptista, Adrian A. Vojnov, Alexandre M. do Amaral (2011). Characterization of the Two Type II Secretion Systems in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and Their Effect on Pathogenicity, Enzyme Secretion, and Biofilm Formation.
120. Florencia Siciliano PT, Lorena Sendín, Carolina Bermejo, Paula Filippone, Gabriel Vellice, Jackie Ramallo, Atilio Castagnaro, Adrian Vojnov, María Rosa Marano (2006). Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in *Citrus limon*. *Electron. J. Biotechnol.* 9(3). 10.2225.

121. Stuurman N, *et al.* (2000). Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol Plant Microbe Interact* 13(11):1163-1169.
122. Katzen F, Becker A, Zorreguieta A, Puhler A, & Ielpi L (1996). Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *J Bacteriol* 178(14):4313-4318.
123. Prentki P & Krisch HM (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29(3):303-313.
124. Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N, & Napoli C (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* 169(12):5789-5794.
125. Vincent JM (1970). *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria* (Blackwell Scientific Publ.).
126. russell Sa (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) third Ed.
127. Machado AMdACPTJCBMA (2005). Transformação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* através de eletroporação. *Fitopatologia Brasileira* 30(3).
128. O'Toole GA, *et al.* (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* 310:91-109.
129. Mayfield CI & Inniss WE (1977). A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can J Microbiol* 23(9):1311-1313.
130. Niba ET, Naka Y, Nagase M, Mori H, & Kitakawa M (2007). A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. *DNA Res* 14(6):237-246.
131. Deziel E, Comeau Y, & Villemur R (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183(4):1195-1204.
132. Astua-Monge G, *et al.* (2005). Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 187(3):1201-1205.
133. Khater L, *et al.* (2007). Identification of the flagellar chaperone FlgN in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri* by its interaction with hook-associated FlgK. *Arch Microbiol* 188(3):243-250.
134. Terashima H, Kojima S, & Homma M (2008). Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:39-85.
135. Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. (2003). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol*. Jun;5(6):359-72.
136. Klausen M, *et al.* (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48(6):1511-1524.
137. Robleto EA, Lopez-Hernandez I, Silby MW, & Levy SB (2003). Genetic analysis of the AdnA regulon in *Pseudomonas fluorescens*: nonessential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *J Bacteriol* 185(2):453-460.
138. Rashid MH & Kornberg A (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4885-4890.
139. Henrichsen J (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36(4):478-503.
140. Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, & Pechere JC (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182(21):5990-5996.
141. Kaiser D (2007). Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr Biol* 17(14):R561-570.

142. Murray TS & Kazmierczak BI (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol* 190(8):2700-2708.
143. Cao H, Baldini RL, & Rahme LG (2001). Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol* 39:259-284.
144. Matthyse AG & McMahan S (1998). Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in cel, attB, attD, and attR mutants. *Appl Environ Microbiol* 64(7):2341-2345.
145. Barnhart MM & Chapman MR (2006). Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60:131-147.
146. Hultgren SJ, et al. (1993). Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73(5):887-901.
147. Craig L, Pique ME, & Tainer JA (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2(5):363-378.
148. Merz AJ, So M, & Sheetz MP (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407(6800):98-102.
149. Gerlach RG & Hensel M (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297(6):401-415.
150. Cotter SE, Surana NK, & St Geme JW, 3rd (2005). Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 13(5):199-205.
151. Mazar J & Cotter PA (2006). Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* 62(3):641-654.
152. Lee BM, et al. (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res* 33(2):577-586.
153. Thieme F, et al. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* 187(21):7254-7266.
154. Cianciotto NP (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* 13(12):581-588.
155. Chen LY, Chen DY, Miaw J, & Hu NT (1996). XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a multimer. *J Biol Chem* 271(5):2703-2708.
156. Guo Y, Sagaram US, Kim JS, & Wang N (2010). Requirement of the galU gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth in *Planta* of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Appl Environ Microbiol* 76(7):2234-2242.
157. Dunger G, et al. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch Microbiol* 188(2):127-135.
158. Cabiscol E, Tamarit J, & Ros J (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3(1):3-8.
159. Tondo ML, Petrocelli S, Ottado J, & Orellano EG (2010). The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. *PLoS One* 5(5):e10803.
160. Jyot J, Sonawane A, Wu W, & Ramphal R (2007). Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Mol Microbiol* 63(4):1026-1038.
161. Deflaun MF, Marshall BM, Kulle EP, & Levy SB (1994). Tn5 Insertion Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Defective in Adhesion to Soil and Seeds. *Appl Environ Microbiol* 60(7):2637-2642.
162. Molina MA, Ramos JL, & Espinosa-Urgel M (2006). A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 8(4):639-647.

163. Capdevila S, Martinez-Granero FM, Sanchez-Contreras M, Rivilla R, & Martin M (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* 150(Pt 11):3889-3897.
164. Lugtenberg BJ, Kravchenko LV, & Simons M (1999). Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ Microbiol* 1(5):439-446.
165. Guilhabert MR & Kirkpatrick BC (2005). Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 18(8):856-868.
166. Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, & Collmer A (2002). HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):13142-13147.
167. Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, & Ottado J (2009). A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4(2):e4358.
168. Johnson TL, Abendroth J, Hol WG, & Sandkvist M (2006). Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* 255(2):175-186.
169. Hu NT, Hung MN, Liao CT, & Lin MH (1995). Subcellular location of XpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology* 141 (Pt 6):1395-1406.
170. Hu NT, *et al.* (2002). XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem J* 365(Pt 1):205-211.
171. de Lima Pimenta A, Di Martino P, Le Boudier E, Hulen C, & Blight MA (2003). In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect* 5(13):1177-1187.
172. Penalzoza-Vazquez A, Sreedharan A, & Bender CL (2010). Transcriptional studies of the *hrpM/opgH* gene in *Pseudomonas syringae* during biofilm formation and in response to different environmental challenges. *Environ Microbiol* 12(6):1452-1467.
173. Dalai B, *et al.* (2009). Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* 46(3):128-134.
174. Shi X, Bi J, Morse JG, Toscano NC, & Cooksey DA (2010). Differential expression of genes of *Xylella fastidiosa* in xylem fluid of citrus and grapevine. *FEMS Microbiol Lett* 304(1):82-88.
175. Ielpi L, Couso RO, & Dankert MA (1993). Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol* 175(9):2490-2500.
176. Feng JX, *et al.* (2009). The *xrvA* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, encoding an H-NS-like protein, regulates virulence in rice. *Microbiology* 155(Pt 9):3033-3044.
177. Alegria MC, *et al.* (2005). Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 187(7):2315-2325.
178. Fiedler W & Rotering H (1988). Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* 263(29):14684-14689.

179. Ebel W, Vaughn GJ, Peters HK, 3rd, & Trempy JE (1997). Inactivation of mdoH leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179(21):6858-6861.
180. Castro OA, Zorreguieta A, Ielmini V, Vega G, & Ielpi L (1996). Cyclic beta-(1,2)-glucan synthesis in Rhizobiaceae: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *J Bacteriol* 178(20):6043-6048.
181. Lequette Y, Rollet E, Delangle A, Greenberg EP, & Bohin JP (2007). Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the opgGH locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153:3255-3263.
182. Page F, *et al.* (2001). Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J Bacteriol* 183(10):3134-3141.