

Tesis Doctoral

# Factores de virulencia en Xanthomonas spp.: regulación y síntesis

Conforte, Valeria Paola

2016-03-21

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Conforte, Valeria Paola. (2016-03-21). Factores de virulencia en Xanthomonas spp.: regulación y síntesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Conforte, Valeria Paola. "Factores de virulencia en Xanthomonas spp.: regulación y síntesis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-21.

**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

**Factores de virulencia en *Xanthomonas* spp.: regulación y síntesis.**

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

Valeria Paola Conforte

Director: Dr. Adrián A. Vojnov

Consejero de estudios: Dra. Nancy López

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. César Milstein"-CONICET  
Fundación Pablo Cassará

Marzo 2016

## Resumen

### FACTORES DE VIRULENCIA EN *Xanthomonas* spp.: REGULACIÓN Y SÍNTESIS.

El género *Xanthomonas* está constituido por al menos 20 especies de bacterias fitopatógenas que afectan a unas 350 especies vegetales, la mayoría de ellas de gran interés económico. *X. citri* subsp. *citri* (*Xcc*) es el agente causante de la cancrrosis de los cítricos, una enfermedad endémica en nuestro país. En esta tesis se buscó comprender los distintos aspectos relacionados con las distintas estrategias que posee *Xcc* para colonizar el tejido vegetal y favorecer así el proceso de patogénesis. Ejemplos de estas estrategias son la producción de exopolisacáridos, enzimas extracelulares y toxinas. Como objetivo general se planteó el estudio de algunas proteínas implicadas en la regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican factores de virulencia en *Xanthomonas* spp., sobre todo aquellos relacionados en la formación de *biofilm*. Asimismo, se estudió la producción del glucano cíclico  $\beta$ -(1,2), uno de los factores más importantes para el desarrollo de la enfermedad.

En la primera sección de esta tesis se abordó la síntesis del glucano cíclico  $\beta$ -(1,2), principalmente en *Xcc*, comprobándose la implicancia de dos proteínas en este proceso: HrpM y NdvB *protein*. Además, se analizó la implicancia de esta molécula en la patogenicidad de la bacteria en plantas de cítricos.

En la segunda sección de la tesis se examinó el efecto que ejerce un regulador transcripcional de la familia NtrC sobre la virulencia de *Xcc*. En particular, se analizó cómo este regulador afecta la síntesis de los genes flagelares y su facultad de desarrollar *biofilm*, estableciendo un vínculo entre la actividad de éste y el segundo mensajero di-GMP cíclico.

Finalmente, se realizó un análisis del efecto del gen *hupB* de *Xcc*, con alta identidad de secuencia a una subunidad de la histona HU, sobre la producción de los factores de virulencia. La mutante de pérdida de función de este gen presentó una severa disminución de la síntesis del flagelo, traducándose en la ausencia del mismo, la reducción significativa de su movilidad y su capacidad de formar *biofilm*. Dicha mutante mostró menor capacidad infectiva que podría asociarse a la ausencia del flagelo conjuntamente con otras alteraciones fenotípicas observadas.

Los resultados de esta tesis aportan nuevos participantes en la compleja red de regulación de la producción de factores de virulencia.

Palabras claves: *Xanthomonas* spp., factores de virulencia, glucano cíclico  $\beta$ -(1,2), *biofilm*, expresión/regulación génica, di-GMP cíclico.

## Abstract

### VIRULENCE FACTORS OF *Xanthomonas* spp.: REGULATION AND SYNTHESIS.

The genus *Xanthomonas* is constituted by at least 20 species of plant pathogenic bacteria that affect about 350 plant species, most of them of great economical importance. *X. citri* subsp. *citri* (*Xcc*) is the causative agent of citrus canker, which is an endemic plant disease in our country. In this thesis, the focus was set on the different strategies used by *Xcc* to colonize the plant tissue and thus to promote the process of pathogenesis. Examples of these strategies include the production of exopolysaccharides, extracellular enzymes and toxins. The general objective is to study some proteins involved in transcriptional regulation of virulence factors genes in *Xanthomonas* spp., especially those related to biofilm formation. In addition, it was proposed to analyze cyclic  $\beta$ -(1,2) glucan production, which is one of most important factors in disease development.

The first section of this thesis addressed the synthesis of cyclic  $\beta$ -(1,2) glucan in *Xcc*, proving the implication of two proteins in this process: HrpM and NdvB protein. Furthermore, we analyzed the implication of this molecule in the pathogenicity of the bacteria in citrus plants.

In the second section of the thesis, the effect of one transcription regulator factor belonging to NtrC family in *Xcc* was studied. In particular, we found how this protein affected the synthesis of flagellar genes and the biofilm formation process, establishing a close relationship between its activity and the second messenger cyclic di-GMP.

Finally, we studied the effect on virulence factors production of the *Xcc hupB* gene, which is highly similar to the beta subunit of histone HU. The loss of function mutant of this gene showed a severe reduction in flagellar synthesis, resulting in the lack of flagella, a significant reduction of its motility and impairment in biofilm formation. The fact that this mutant was less virulent than the wild type strain could be associated with the absence of flagella together with other observed phenotypic alterations.

Taken together, the results of this thesis provide new determinants into the complex regulation network of virulence factor production and biofilm formation.

Key words: *Xanthomonas* spp., virulence factors, cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucan, biofilm, gene expression/regulation, cyclic di-GMP.

## Agradecimientos

Al Dr. Adrián Vojnov, por permitirme realizar la tesis en su laboratorio, por su generosidad, por la libertad que nos brinda para trabajar y por su calidad humana.

A Florencia Malamud, por su capacidad de guía, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por motivarme y por convertirse en mi amiga.

A Pablo Yaryura, por compartir conmigo los largos días de trabajo, por aprender juntos y por ayudarme a levantar de los tropiezos científicos.

A Pablo Torres, por orientarme y ser generoso conmigo, desde el primer momento.

A Luciano Rigano, el gurú científico, por transmitirme sus conocimientos y por su confianza y apoyo.

A Laila Toum, la capitana, por contagiarme su entusiasmo, su alegría y por estar siempre dispuesta a darme una mano.

A Eleonora Mengoni, por escucharme hasta el cansancio y compartir conmigo los más gratos momentos.

A Verónica De Pino y Cristian Chazarreta, mis compañeros de *Xanthomonas*, por brindarme su ayuda y por hacer más divertidos los días en el laboratorio.

A Isabel Blanco, Natalia Mielnichuk, Luciana Larroca, Laura Fracca, Fabiana Stolowicz y Darío "El Chino", por compartir conmigo muy gratos momentos de trabajo y esparcimiento.

A toda la gente de GenMed y de FPC... En especial a Julia Ouset, Nadia Cortese, Cintia Smus, Francisco Zurvarra, Sabrina Del Priore, Gabriela Kusinsky, Alejandro Parola, Daniel Baleani, Juan Manuel Rodríguez, Lía Castellanos... por todos estos años de buenos momentos, por las charlas y por las innumerables veces que no sólo me ayudaron sino que me salvaron.

A Susana González, Virginia Cornejo y Vanesa Peralta, por preparar mi material de trabajo y sus múltiples detalles conmigo.

A las chicas de recepción, Cristina y Sandra.

Al ICTMilstein-Fundación Pablo Cassará.

A María Rosa Marano y su grupo.

A mis amigos del IIB-UNSAM: Cintia Sánchez, Claudia Herrmann, Gastón Arocena y Peter Döhmer... Por brindarme su apoyo y afecto.

A mis tíos y primos, por su apoyo.

A todos mis amigos... En especial a Romina, gracias por su aguante.

A mi ahijada hermosa, Mía.

A mis bichos, por resistir mis desatenciones en el período de escritura.

A mis suegros, Marcos y María, por ser tan buenas personas conmigo.

A Santiago, por su cariño, apoyo y ayuda.

A mis abuelitos, infinitamente agradecida de tenerlos.

A mis viejos, Eduardo y Graciela, y a mi hermano Diego... porque son mi equipo, mis incondicionales... No encuentro forma de describir mi agradecimiento.

Al CONICET y a la APNCyT, por brindarme los medios económicos para posibilitar el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A esta facultad...a la que le tengo un profundo aprecio.



Los resultados de la presente tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Malamud, F. <sup>(\*)</sup>, Conforte, V. P.<sup>(\*)</sup>, Rigano, L. A., Castagnaro, A. P., Marano, M. R., Morais do Amaral, A., and Vojnov, A. A. (2012). HrpM is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol Plant Pathol* **13**(9), 1010-8.

<sup>(\*)</sup>Estos autores contribuyeron en igual medida con el trabajo.

Malamud, F., Homem, R. A., Conforte, V. P., Yaryura, P. M., Castagnaro, A. P., Marano, M. R., do Amaral, A. M., and Vojnov, A. A. (2013). Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Microbiology* **159**(Pt 9), 1911-9.

Yaryura, P. M., Conforte, V. P., Malamud, F., Roeschlin, R., de Pino, V., Castagnaro, A. P., McCarthy, Y., Dow, J. M., Marano, M. R., and Vojnov, A. A. (2015). XbmR, a new transcription factor involved in the regulation of chemotaxis, biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Environ Microbiol* **17**(11), 4164–4176.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Género <i>Xanthomonas</i> spp.	1
1.1. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	1
1.2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	3
2. Bacterias fitopatógenas	4
2.1. Fitotoxinas	5
2.1.1. Lipopolisacárido	5
2.2. Sistema de secreción tipo III	7
2.2.1. Regulación de los genes <i>hrp</i>	8
2.3. Adhesinas	9
2.4. Flagelo	9
2.4.1. Síntesis de los genes flagelares	11
2.5. Exopolisacáridos	12
2.5.1. Xantano	13
2.5.2. Glucanos periplasmáticos	14
2.6. Enzimas extracelulares y sistema de secreción tipo III	18
2.7. <i>Biofilm</i>	18
2.7.1. <i>Biofilm</i> en <i>Xanthomonas</i> spp.	21
3. Sistema de <i>Quorum sensing</i> y su rol en la regulación de los factores de virulencia en <i>Xanthomonas</i> spp.	23
4. Regulación mediada por di-GMP cíclico	26
5. Proteínas tipo histonas y regulación génica	28
<b>OBJETIVOS</b>	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Condiciones y medios de cultivo	31
2. Cepas y plásmidos utilizados	31
3. Técnicas de biología molecular	33
3.1. Extracción de ácidos nucleicos	33
3.1.1. Extracción de ADN genómico	33
3.1.2. Extracción de ADN genómico	33
3.1.3. Extracción de ARN	33
3.2. Síntesis de ADN copia	33
3.3. qRT-PCR	34
3.4. Generación de las cepas utilizadas en esta tesis	37
3.4.1. Construcción de las cepas mutadas	37
3.4.1.1. Construcción de la mutante <i>Xcc ndvB</i>	37
3.4.1.2. Construcción de la mutante <i>X. campestris hrpM</i>	37
3.4.2. Construcción de las cepas complementadas	38
3.4.2.1. Complementación de <i>Xcc hrpM</i>	38
3.4.2.2. Complementación de <i>Xcc ndvB</i>	38
3.4.2.3. Complementación de <i>X. campestris hrpM</i>	38
3.4.2.4. Complementación de <i>Xcc ntrC</i>	38
3.4.2.5. Complementación de <i>Xcc hupB</i>	39
3.4.3. Expresión del dominio HD-GYP de XAC0350 en la mutante <i>X. campestris rpfG</i>	39
4. Herramientas bioinformáticas	39

5.	Estudios de hidratos de carbono	40
5.1.	Extracción de azúcares totales y purificación de glucanos	40
5.2.	Cromatografías	40
5.2.1.	Cromatografía en capa delgada	41
5.2.2.	Filtración por gel	41
5.3.	Cuantificación de los hidratos de carbono	41
5.4.	Determinación de la producción de xantano	41
5.4.1.	Producción de xantano en placa	41
5.4.2.	Extracción etanólica de xantano	41
6.	Estudios de <i>biofilm</i>	42
6.1.	Estudio de la adhesión a sustrato abiótico	42
6.2.	Estudio de <i>biofilm</i> por microscopía confocal	42
7.	Ensayos de movilidad	43
7.1.	Quimiotaxis	43
7.2.	<i>Swimming</i>	43
8.	Ensayo de determinación de la actividad de enzimas extracelulares	44
8.1.	Endoglucanasa	44
8.2.	Amilasa	44
8.3.	Proteasa	44
9.	Ensayo de determinación de la producción de DSF	45
10.	Estudio del lipopolisacárido: extracción y análisis	45
10.1.	Extracción de LPS	45
10.2.	Análisis de LPS	45
11.	Ensayo de tolerancia a tratamiento con peróxido de hidrógeno	46
12.	Observación de la estructura flagelar	46
12.1.	Tinción del flagelo y observación mediante microscopía óptica	46
12.2.	Tinción del flagelo y observación mediante microscopía electrónica (MET)	46
13.	Observación de la membrana plasmática por MET	47
14.	Determinación de la concentración de di-GMP cíclico	47
15.	Plantas utilizadas, mantenimiento de las mismas e infecciones	48
15.1.	Cítricos	48
15.2.	<i>Nicotiana benthamina</i>	48
16.	Ensayo de reapertura estomática	49
<b>RESULTADOS</b>		
	<b>CAPÍTULO I: Síntesis de glucano cíclico <math>\beta</math>-(1,2) e importancia de los mismos en la patogénesis de la bacteria</b>	50
1.	Identificación de las proteínas involucradas en la síntesis de glucanos cíclicos $\beta$ -1,2	54
2.	Identificación de una mutante de <i>hrpM</i> a partir de un <i>screening</i> : <i>hrpM</i> está involucrado en la formación de	56

	estructuras de tipo <i>biofilm</i> en <i>Xcc</i>	
3.	Construcción de la mutante <i>Xcc ndvB</i>	56
4.	Los genes <i>hrpM</i> y <i>ndvB</i> están implicados en la producción de glucanos	57
5.	La virulencia está afectada en las mutantes <i>hrpM</i> y <i>ndvB</i>	59
6.	La movilidad dependiente del flagelo y la quimiotaxis se ven afectada en ambas mutantes no productoras de glucanos cíclicos $\beta$ -(1,2)	62
7.	Observación de la estructura flagelar en la mutante <i>hrpM</i>	64
8.	La mutante <i>hrpM</i> es más sensible al tratamiento con peróxido de hidrógeno	65
9.	Observación de la membrana plasmática en la mutante <i>hrpM</i>	66
10.	Síntesis de glucanos cíclicos en <i>X. campestris</i> y su rol en la virulencia	67
	<b>CAPÍTULO II:</b> Regulación de la síntesis de factores de virulencia por NtrC	
1.	Obtención, identificación y caracterización de la mutante <i>ntrC</i>	71
1.1.	Estudios <i>in silico</i> de la proteína NtrC	73
2.	Efecto de la mutación en <i>ntrC</i> en la quimiotaxis y movilidad	76
3.	Implicancia de NtrC en la regulación de la síntesis del flagelo	77
4.	Vinculación de la regulación vía NtrC con el metabolismo del di-GMP cíclico	77
5.	Probable mecanismo de regulación de la concentración de di-GMP-cíclico a través de NtrC	81
6.	Efecto de NtrC en la virulencia de <i>Xcc</i>	84
	<b>CAPÍTULO III:</b> Caracterización fenotípica de la mutante <i>hupB</i> de <i>Xcc</i> e implicancia del gen en la producción de factores de virulencia.	
1.	Identificación de una mutante <i>hupB</i> a partir de un <i>screening</i> en búsqueda de cepas defectivas en la formación de <i>biofilm</i>	86
2.	Impacto de la mutación en el gen <i>hupB</i> en el proceso de formación de <i>biofilm</i>	88
3.	Efecto de la mutación en <i>hupB</i> en la virulencia de la bacteria	90
4.	Efecto del producto de <i>hupB</i> sobre la modulación de la apertura estomática	91
5.	Análisis de la producción de DSF la mutante <i>hupB</i>	92
6.	Influencia de <i>hupB</i> en la síntesis de polisacáridos	93
7.	Producción de enzimas extracelulares en la mutante <i>hupB</i>	96

8.	Estudio de la movilidad dependiente de flagelo en la mutante <i>hupB</i>	97
9.	Efecto de la mutación en <i>hupB</i> en la tolerancia al estrés oxidativo	99
	<b>DISCUSIÓN</b>	102
	<b>REFERENCIAS</b>	113

# INTRODUCCIÓN

## 1. Género *Xanthomonas* spp.

El género *Xanthomonas* es uno de los más ubicuos entre las bacterias patógenas de plantas, con incidencia en todo el mundo, que causa pérdidas económicas significativas (Bradbury, 1984; Leyns, 1984). Los miembros de este grupo infectan al menos 124 especies de plantas monocotiledóneas y 268 dicotiledóneas (Chan and Goodwin, 1999; Leyns, 1984).

Las bacterias del género son bacilos Gram negativos, aerobios obligados, pertenecientes a la subdivisión  $\gamma$ -proteobacterias (Bradbury, 1984). Dentro de este género se diferencian veinte especies entre las que se hallan ochenta patovares. El rango de hospedadores de cada patovar está limitado a una o pocas especies o géneros dentro de una familia vegetal y éstos dan el nombre al patógeno. Cada especie posee especificidad por distintos tejidos (Starr *et al.*, 1981).

Las colonias de las especies de *Xanthomonas* spp. presentan un aspecto mucoso debido a la producción de un exopolisacárido (EPS), el xantano (ver sección Introducción 2.5.1). Las *xanthomonas*, en general, son móviles y poseen un único flagelo polar que le permite introducirse dentro de la planta hospedadora. Muchas de las especies que componen el género pueden sobrevivir y multiplicarse epifíticamente (Starr *et al.*, 1981). Dentro del tejido vegetal, *Xanthomonas* spp. se multiplican en el apoplasto o colonizan el xilema para luego diseminarse sistemáticamente en la planta huésped. Estas bacterias son patógenos hemibiótrofos que inicialmente se alimentan del tejido vivo pero en los estadios avanzados de la infección causan la muerte de las células de la planta huésped (Buttner and Bonas, 2009).

Producen un pigmento característico de color amarillo asociado a la membrana plasmática e insoluble en agua, al cual debe su nombre este género: xanthomonadina (Starr *et al.*, 1981). Este pigmento tendría un rol protegiendo a la bacteria frente al daño fotobiológico (Jenkins and Starr, 1982; Rajagopal *et al.*, 1997).

### 1.1. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

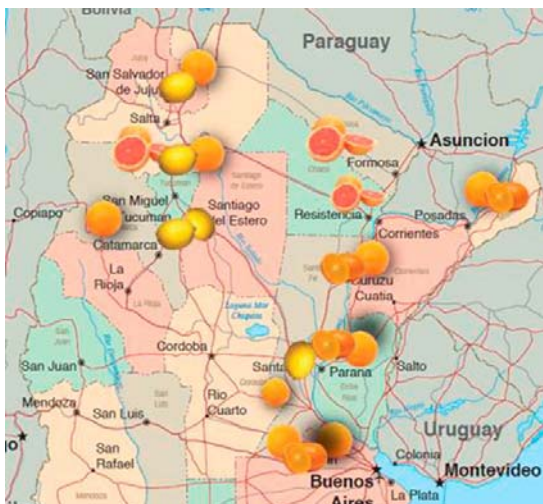
*X. citri* subsp. *citri* (*Xcc*) es un bacilo con un único flagelo polar. La temperatura de crecimiento óptima es de 28°-30°C (Goto, 2012). La bacteria (cepa *Xcc* 306) posee además de un cromosoma circular de 5,17 Kb, dos plásmidos, pXac64 (de 0,64Kb) y pXac33 (de 0,33Kb) (da Silva *et al.*, 2002), todos ellos secuenciados. Esto ha facilitado el estudio de su fisiología y del desarrollo de la enfermedad que produce. Aproximadamente un 6% de los genes de *Xcc* conocidos están implicados en la patogénesis, virulencia y adaptación, incluyendo genes del sistema de secreción tipo III -T3SS (del inglés: *type III secretion system*), los efectores de T3SS, enzimas hidrolíticas

de pared, toxinas, adhesinas y elementos estructurales de superficie y genes del sistema de señalización célula-célula (operón *rpf*) (da Silva *et al.*, 2002).

*Xcc* es una de las especies más importantes del género dado que es el agente causante de la cancrrosis de los cítricos, enfermedad que ocasiona grandes pérdidas económicas (Brunings and Gabriel, 2003; Schaad *et al.*, 2005). Esta enfermedad se introdujo en nuestro país en 1928 y es considerada endémica desde 1990 (Canteros, 2001). En primera instancia, afectó el litoral argentino expandiéndose luego al noroeste, donde actualmente se concentra el 61% de la producción de cítricos (Fuente: Federcitrus – SENASA 2012) (Fig. 1.1). La primera infección de principio de siglo tuvo lugar por una cepa poco virulenta (*Xcc* tipo B), que afectó únicamente plantas de limón y se mantuvo confinada a una zona determinada del Noroeste. Luego, durante los años 50, apareció una cepa muy virulenta (*Xcc* tipo A), cuyo origen data en Asia con presencia en países limítrofes como Brasil y Paraguay (Canteros, 2001).

En comparación con otras plagas, la pérdida de productividad debido a la cancrrosis es baja y el costo de las pulverizaciones adicionales de control no es significativo. La pérdida real radica en las restricciones cuarentenarias impuestas por países libres de la enfermedad a los frutos provenientes de áreas infectadas (Coletta-Filho *et al.*, 2006).

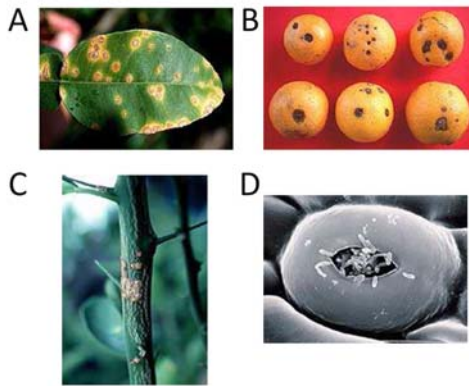
Todos los cultivares de cítricos no son igualmente susceptibles a la infección por *Xcc*; la susceptibilidad depende también del órgano. El pomelo, la lima y el limón son más susceptibles que la naranja y la mandarina (Brunings and Gabriel, 2003).



**Figura 1.1.** Distribución de la producción cítrica más importante en el país. La producción de limón se concentra en el noroeste; la de pomelo, en Corrientes, Formosa y Chaco; la de naranja, en la región de la Mesopotamia. (Fuente: Federcitrus, 2013).

*Xcc* provoca lesiones en hojas, tallos, brotes y frutos (Fig. 1.2). A esas lesiones se las denomina *cancro*. Las lesiones en la hoja se observan como una región necrótica central de aspecto corchoso, rodeadas de una zona amarilla clorótica. En frutos y en tallos también pueden observarse los cancros (Gottwald *et al.*, 2002).





**Figura 1.2.** Lesiones producidas por *Xcc* en (A) hoja, (B) frutos y (C) tallos, en naranja. (D) Micrografía que muestra a *Xcc* penetrando a través de un estoma. Tomado de Gottwald y colaboradores (2002).

La propagación es provocada por la lluvia y el viento; en caso de existir riego artificial, también contribuye. *Xcc* es capaz de ingresar a tejidos de hojas jóvenes, frutos y tallos a través de aperturas naturales (como estomas) o por heridas (Fig. 1.2D). En el interior del tejido vegetal, *Xcc* se multiplica localmente en el espacio apoplástico. La temperatura óptima de infección se da en el rango de 20 a 30°C (Graham *et al.*, 2004). Las lesiones producidas por *Xcc* son en un principio de una tonalidad marrón claro, que con el correr del tiempo se tornan más oscuras, a su vez aparece un margen húmedo y un halo clorótico rodeándolas. Con la edad de las lesiones, el margen húmedo puede desaparecer. El centro de la lesión se abulta tornándose más esponjoso o con el aspecto “corchoso” característico; el centro puede volverse un cráter. A medida que la enfermedad se intensifica, la defoliación de la planta se torna un problema (Gottwald, 1988; Graham *et al.*, 2004).

### 1.2. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*X. campestris*) es un pequeño bacilo, aerobio, Gram negativo e incapaz de esporular (Onsando, 1992). Se trata de el patógeno vascular causante de la putrefacción negra de las crucíferas, la enfermedad más importante en este grupo de plantas, que afecta alrededor de 90 países en los cinco continentes (Williams, 1980). Las plantas huésped más destacadas son el coliflor, el brócoli, el repollo de Bruselas, la col rizada y el rábano.

Las condiciones óptimas para el crecimiento son temperaturas en el rango de los 25° a 35°C y alta humedad (80 a 100%), volviendo a las áreas de cultivo tropicales sean seriamente afectadas, especialmente en temporada de lluvias (Schaad, 1993).

Las bacterias infectan la planta huésped a través de los hidátodos (especie de estomas inmóviles que se hallan en los márgenes de las hojas) (Hugouvieux, 1998), causando lesiones en forma de V (Fig. 1.3), o a través de estomas, causando lesiones circulares. Una vez dentro de la planta, coloniza e invade el sistema vascular,

predominantemente el xilema, donde produce xantano, que puede obstruirlo, causando una necrosis severa y el marchitamiento de la hojas (Onsando, 1992; Williams, 1980).



**Figura 1.3.** Lesiones en forma de “V” generadas por *X. campestris* en hojas de planta de repollo. Fuente: David B. Langston, Universidad de Georgia.

El genoma de la cepa utilizada en esta tesis, *X. campestris* 8004, se ha secuenciado (Qian *et al.*, 2005).

## 2. Bacterias fitopatógenas y factores de virulencia

Las bacterias fitopatógenas pueden vivir en la filósfera y la rizósfera sin causar daños a su planta huésped y para llevar a ser completamente virulentas, deben penetrar el tejido vegetal. En algunos casos, la penetración del tejido es un proceso pasivo en el que la bacteria aprovecha las heridas o las aperturas naturales o son depositadas por insectos vectores. Una vez penetrado el tejido vegetal, dependiendo de la especie que se trate puede habitar el floema o el xilema. Sin embargo, la mayoría de las especies fitopatógenas invaden el apoplasto (Beattie and Lindow, 1994).

Las bacterias fitopatógenas han desarrollado una variedad de estrategias para facilitar la colonización del tejido vegetal. Estas contribuyen a la virulencia de la bacteria y resultan primordiales para que ésta colonice y alcance una población significativa dentro de la planta. Estos factores ayudan a que la bacteria logre: adherirse al tejido del huésped y colonizarlo, evadir su respuesta inmune e inhibirla, entrar y salir de sus células, y además poder nutrirse del huésped.

Los factores de virulencia abarcan una amplia variedad de estrategias:

- a) fitotoxinas de bajo peso molecular.
- b) proteínas efectoras, que son secretadas directamente al citosol de la célula huésped a través del sistema de secreción tipo III;
- c) proteínas/estructuras que favorecen la adhesión y la movilidad;
- d) exopolisacáridos a los que se les ha comprobado un rol en la virulencia: xantano y glucano cíclico  $\beta$ -(1,2);

- e) Enzimas hidrolíticas extracelulares;
- f) Estructuras de tipo *biofilm*;

## 2.1. Fitotoxinas

Las toxinas producidas por bacterias fitopatógenas resultan nocivas para la planta que infectan. No son esenciales para la patogénesis pero contribuyen a la virulencia de la bacteria e incrementan a los síntomas de la enfermedad, como la clorosis o necrosis. Pueden clasificarse en endotoxinas y exotoxinas.

Las endotoxinas, no necesitan ser liberadas al medio externo; ejemplo del tipo es el lipopolisacárido (LPS).

Por el contrario, las exotoxinas son secretadas. Pueden actuar ejerciendo un daño directo a la célula huésped o modulando el metabolismo de la misma para promover el desarrollo de los síntomas (Alfano and Collmer, 1996; Bender *et al.*, 1999; Birch, 2001).

Un grupo de exotoxinas son las de la familia de las siringomicinas generadas por *P. syringae* pv. *syringae*. Estas toxinas inducen la necrosis en el tejido de la planta, formando poros en la membrana plasmática de las células (Bender and Scholz-Schoeder, 2004). La presencia de estos poros en la membrana aumentan el flujo de iones al interior de la célula, causando trastornos en el establecimiento del potencial de membrana y la eventual muerte celular (Hutchison, 1997).

Otro grupo de exotoxinas son oligopéptidos también producidas por el género *Pseudomonas* (Melotto, 2013). Estas toxinas interfieren en el metabolismo del nitrógeno del huésped inhibiendo, entre otras cosas, la síntesis de aminoácidos (Arrebola *et al.*, 2011; Snoeijsers, 2000).

Otro ejemplo es la exotoxina coronatina es sintetizada por varias cepas de *P. syringae* y favorece su virulencia a través de distintas vías (Bender *et al.*, 1999). Juega un rol importante en los estadios tanto tempranos como tardíos del desarrollo de la enfermedad, que incluyen la supresión de la inmunidad estomática, favoreciendo la entrada de la bacteria a la planta; además, promueve su crecimiento dentro del apoplasto, acentuando los síntomas de la enfermedad (Brooks *et al.*, 2005; Melotto *et al.*, 2006; Melotto, 2008).

### 2.1.1. Lipopolisacárido (LPS)

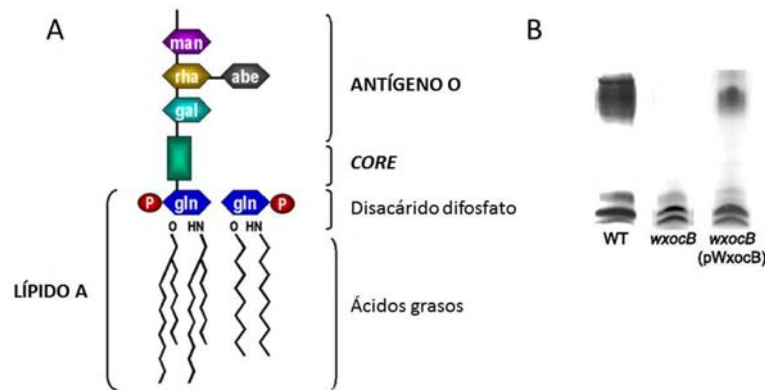
El lipopolisacárido (LPS) es el componente mayoritario de la membrana plasmática de las bacterias Gram negativas. Es una molécula compleja compuesta por tres dominios fundamentales: el **lípidio A** (asociado a la membrana plasmática), un **núcleo o**

**core** y la parte más externa a la bacteria, el **antígeno O** (Fig. 1.4A). El antígeno O está formado por una cadena de unidades sacarídicas repetidas que, generalmente, poseen un grado de polimerización de 20 a 50 unidades. Se conecta con el **core**, un oligosacárido que se puede dividir en una región interna, compuesta por ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep), y una externa formada por hexosas (glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina). El lípido A es típicamente, un esqueleto de glucosamina fosfato con uniones de tipo éster y amidas con ácidos grasos (Holst, 1992).

El LPS es una endotoxina que provoca una fuerte respuesta inmune en animales. En plantas, es el PAMP (del inglés: *Pathogen-associated Molecular Patterns*) disparador más importante de la respuesta de defensa basal, que incluye el *burst* oxidativo, la producción de especies reactivas de nitrógeno, la producción de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas, el engrosamiento de la pared celular y la expresión de genes relacionados con la patogénesis (Newman *et al.*, 2007).

El LPS, tanto para *Xcc* como para *X. campestris*, se halla caracterizado (Braun *et al.*, 2005; Casabuono *et al.*, 2011). El *cluster* de genes implicados en la síntesis de LPS en *Xanthomonas* spp. varía en número y similitud de secuencia (Lu *et al.*, 2008). Para el caso particular de *Xcc* 306, estos genes se localizan en dos regiones. En la primer región, se encuentran los que codifican para transferasas, epimerasas, translocasas y transportadores de derivados de azúcares; mientras que *xanAB*, *rmlDABC*, 18 genes codificantes de nucleótido-azúcares y los implicados en la síntesis de dTDP-L-ramnosa se localizan en una segunda región (da Silva *et al.*, 2002).

El LPS contribuye a la integridad estructural de la membrana plasmática de la bacteria y además, sirve como una barrera protectora frente al ataque de químicos tóxicos en ambientes hostiles. En *Xcc*, se observó que mutaciones en los genes que codifican para el LPS derivan en defectos en la formación del *biofilm* maduro, aumento la sensibilidad a diferentes tipos de estrés ambientales y reducción de la virulencia (Casabuono *et al.*, 2011; Li and Wang, 2011b). En *X. oryzae* pv. *oryzicola*, la mutante en el gen responsable de la síntesis del antígeno O (*wxocB*) (Fig. 1.4B), mostró respecto de la cepa silvestre, disminución de la producción de exopolisacárido y de la virulencia asociada con la disfuncionalidad del sistema de secreción tipo III (Wang *et al.*, 2013).



**Figura 1.4.** (A) Esquema de la estructura del LPS. Referencias, **gln**: glucosa, **gal**: galactosa, **rha**: ramnosa, **abe**: abecosa, **man**: manosa, **P**: grupo fosfato. (Fuente: [http://www.microbiologybook.org/fox/cell\\_envelope.htm](http://www.microbiologybook.org/fox/cell_envelope.htm)). (B) SDS-PAGE donde se visualiza por tinción con plata el LPS de la cepa silvestre (WT), de la mutante *wxocB* de *X. oryzae* pv. *oryzicola*, y de la cepa complementada con el gen silvestre. Las bandas de alto peso molecular representan al antígeno O y las bandas de bajo peso molecular representan la parte del antígeno O y el lípido A (Wang *et al.*, 2013).

## 2.2. Sistema de secreción tipo III (T3SS)

Muchas bacterias Gram negativas que infectan plantas y animales emplean el sistema de secreción tipo III -T3SS (del inglés, *Type Three Secretion System*) para colonizar las células de su huésped (Blocker *et al.*, 2003; Büttner and He, 2009; He *et al.*, 2004). El T3SS inyecta directamente proteínas efectoras en las células eucariotas y así logra manipular la actividad de éstas en su propio beneficio (Büttner and He, 2009).

En las bacterias fitopatógenas, los genes *hrp* son los que codifican para el T3SS y fueron denominados así porque son requeridos por las bacterias para causar la enfermedad en plantas susceptibles, pero además, para provocar la respuesta hipersensible en plantas resistentes (Lindgren *et al.*, 1986). La respuesta hipersensible es un proceso de muerte celular rápida que se desencadena en el sitio de infección restringiendo la multiplicación del patógeno y activando la respuesta de defensa de la planta (Dangl and Jones, 2001). Los genes *hrp* fueron encontrados en la mayoría de las bacterias fitopatógenas Gram negativas, como *P. syringae*, *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanasearum* y *Erwinia* spp. (Alfano and Collmer, 2004; Büttner and Bonas, 2006; He *et al.*, 2004). Consecuentemente, el T3SS tiene un rol central en la mediación la interacción entre la bacteria y la planta (Büttner and He, 2009).

El locus *hrp* de *Xcc* 306 consta de un grupo de 25 genes. Algunos de los productos de estos genes están conservados en todos los T3SS, incluyendo a los componentes secretorios del core flagelar, mientras que otros son proteínas de función desconocida pero cuyos homólogos son esenciales para el funcionamiento del T3SS de otras especies de *Xanthomonas* (Alegria *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2002; Dunger *et al.*, 2005).

Estructuralmente, el T3SS es un complejo proteico en forma de “jeringa” (Pallen *et al.*, 2006). Se compone de proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas estructurales forman el aparato de “aguja”, que consiste en una estructura embebida en la membrana basal, una aguja externa que sobresale de la superficie bacteriana, y un complejo protector (*tip*) en su punta. Al entrar en contacto con la célula huésped, el translocón se ensambla entre el complejo del *tip* de la aguja y la célula huésped, sirviendo como puerta de entrada para la translocación de las proteínas efectoras mediante la creación de un poro en la membrana de la célula huésped. Después del *delivery* de proteínas efectoras en el citoplasma del huésped, estas inician y mantienen la infección mediante la manipulación de la biología de la célula invadida tales como la señalización celular y el tráfico vesicular. Por último, proteínas no estructurales como las chaperonas sirven de reguladores de la secreción dado que secuestran efectores y algunas proteínas estructurales en el citoplasma de la planta (Chatterjee *et al.*, 2013).

El T3SS de cada cepa de *Xanthomonas* transfiere a la célula eucariota una mezcla de diferentes proteínas efectoras, que varían dependiendo de la cepa (Buttner and Bonas, 2009). La inactivación individual de cada uno de estos genes no afecta significativamente la virulencia de la bacteria, presumiblemente debido a la redundancia funcional ellos (Noël *et al.*, 2003; Roden *et al.*, 2004; Vivian and Arnold, 2000).

### 2.2.1 Regulación de los genes *hrp*

Los genes *hrp* no se expresan constitutivamente, sino que son activados cuando las bacterias entran en contacto con la planta o cuando son cultivadas en determinados medios mínimos que simulan esta situación (Jiang *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2006). La expresión de estos genes está controlada por dos reguladores: HrpG (un regulador de la familia OmpR) y HrpX (un regulador transcripcional de tipo Ara-C) (Astua-Monge *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2009; Wengelnik and Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996).

HrpG es un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes, que recibe señales ambientales a través de un sensor kinasa, aún no definido; en *X. campestris* se propone que HpaS podría tener ese rol (Li *et al.*, 2014). HrpG y HrpX forman una cascada de regulación, en la que HrpG regula la expresión de *hrpX*, y luego, HrpX regula la expresión de los genes *hrp* y algunos genes que codifican para proteínas efectoras del T3SS (Huang *et al.*, 2009; Wengelnik and Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996).

Guo y colaboradores (2011) realizaron un análisis del regulón de HrpG/HrpX mediante microarray en *Xcc*. Determinaron que, cuando la bacteria toma contacto con su planta huésped, la influencia de estos reguladores no se restringe solamente al

clúster de genes *hrp* y a los genes que codifican para proteínas efectoras (como *pthA*). Además, estos reguladores afectan la expresión de genes involucrados en la respuesta al ambiente dentro del huésped como la síntesis de aminoácidos, transporte de iones y azúcar, el catabolismo fenólico, entre otros procesos. Como consecuencia, los autores sugieren que HrpG y HrpX interactúan con una red de señalización global y coordinan la expresión de múltiples factores de virulencia tanto como para modificar como para adaptarse al huésped durante el proceso de infección.

### 2.3. Adhesinas

La adhesión de la bacteria es un paso fundamental en el proceso de colonización del huésped. Este proceso depende de estructuras específicas de tipo proteico que se anclan a la membrana externa. Estas últimas se clasifican en fimbriales o no fimbriales. Las primeras son estructuras multiproteicas mientras que las segundas se componen de una única proteína (Girard and Mourez, 2006).

En trabajos realizados con bacterias fitopatógenas, las adhesinas se relacionan con la virulencia de las mismas. Por ejemplo, en *Xylella fastidiosa* se observó que mutantes de pérdida de función de adhesinas son menos infectivos. Asimismo, se propone un modelo en el que las adhesinas fimbriales estarían involucradas en la adhesión célula-célula mientras que las no fimbriales intervendrían de la adhesión inicial al sustrato (en este caso la hoja de la planta huésped) (Feil, 2007).

Un análisis comparativo del genoma de *Xcc* revela que la bacteria tiene múltiples genes que codifican para adhesinas no fimbriales, tales como *xadA* y *xadB* y los que codifican para hemaglutininas filamentosas *XACFhaB* and *XACFhaC*. Mutaciones en el gen *XACFhaB* hacen que la bacteria se torne incapaz de adherirse a superficies abióticas y bióticas, que no pueda desarrollar *biofilms* maduros y como consecuencia su capacidad infectiva se vea reducida (Gottig *et al.*, 2009).

En *Xcc* aún no se reportaron estudios específicos de adhesinas no fimbriales, pero dada la información reportada en otras especies del género, se puede presumir que algunas de ellas también estarían implicadas en la infección. En *X. oryzae* pv. *oryzae*, los genes *xadA* y *xadB* se relacionan con la colonización de las hojas de arroz a través de los hidatodos (Das, 2009).

### 2.4. Flagelo

La movilidad es una propiedad fundamental de las bacterias, estrechamente vinculada a la quimiotaxis, que es la habilidad de estos organismos de dirigirse a lo largo de determinados gradientes químicos. La combinación de la movilidad y la

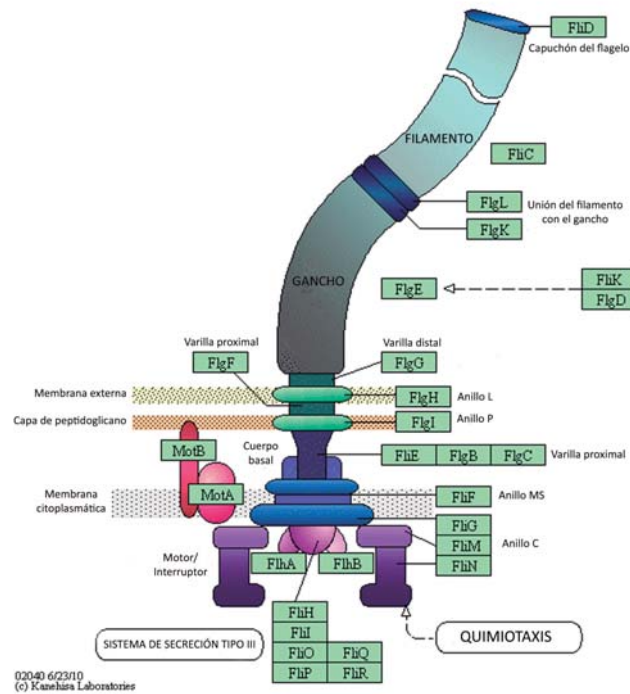
quimiotaxis permiten a las bacterias detectar los nutrientes y llegar a ellos. El mecanismo de movilidad más conocido es aquel vinculado con el flagelo. Esta organela no es más que una proyección en forma de “cola” que actualmente es considerada, además, como un sistema de secreción tipo III específico (F-T3SS). Está compuesta por: un motor molecular situado en la membrana interna bacteriana, un complejo del cuerpo basal que forma un canal de exportación anclado a la membrana, los elementos de unión, el gancho y el filamento rotatorio (Josenhans and Suerbaum, 2002). El filamento se ensambla a medida que las subunidades de flagelina pasan a través del F-T3SS, esto se produce desde la cavidad flagelar hacia el medio externo (Jarrell and McBride, 2008). El flagelo funciona por rotación, que es dirigida por fuerza protón motriz; en muchas bacterias la dirección de la rotación es controlada por un sistema de transducción de señales que responde a un estímulo quimiotáctico del ambiente (Jarrell and McBride, 2008).

Uno de los movimientos que la bacteria es capaz de llevar a cabo mediante la utilización del flagelo es el *swimming* (del inglés: nado), que les permite trasladarse en medio líquido (Chaban *et al.*, 2015). Otro de los movimientos dependientes del flagelo es el *swarming* (del inglés: enjambrar); las bacteria que forman una colonia en crecimiento, se esparcen sobre el sustrato sólido. En general, este tipo de movimiento es llevado a cabo por múltiples flagelos y es dependiente del sistema de *quorum* (Jarrell and McBride, 2008).

El flagelo está implicado en múltiples y fundamentales procesos como la adhesión a la superficies, formación de *biofilm* y la entrada al huésped en muchas bacteria patógenas (como por ejemplo en: *Helicobacter pylori*, *H. muslelae*, *Campilobacter jejuni* y *Vibrio cholera* y muchas especies fitopatógenas). Mutantes que han perdido el flagelo muestran capacidad reducida de invadir al huésped (Josenhans and Suerbaum, 2002). El flagelo es además un PAMP que induce la respuesta de defensa en plantas o la respuesta inmune en algunos animales (Schreiber and Desveaux, 2011).

Tal como se ha descrito anteriormente, *Xanthomonas* spp. posee un único flagelo polar. Hasta el momento hay un único reporte de una bacteria del género *Xanthomonas* no flagelada (*X. fuscans* subsp. *fuscans* 4834-R), que es perfectamente capaz de infectar su planta huésped (Darrasse *et al.*, 2013). *Xcc* 306 tiene un completo set de genes de síntesis de flagelo (Fig. 1.5), con alta similitud con los de *X. campestris* (Yang *et al.*, 2009), sugiriendo que éste es un factor importante en su ciclo de vida. Hemos demostrado en nuestro laboratorio que mutaciones en dos genes que codifican para proteínas estructurales del flagelo como son FliC (flagelina) y FlgE (gancho) en *Xcc*, conllevan a una disminución en el *swimming*, a un anormal desarrollo del *biofilm* y en consecuencia a una reducción de la virulencia (Malamud *et al.*, 2011)





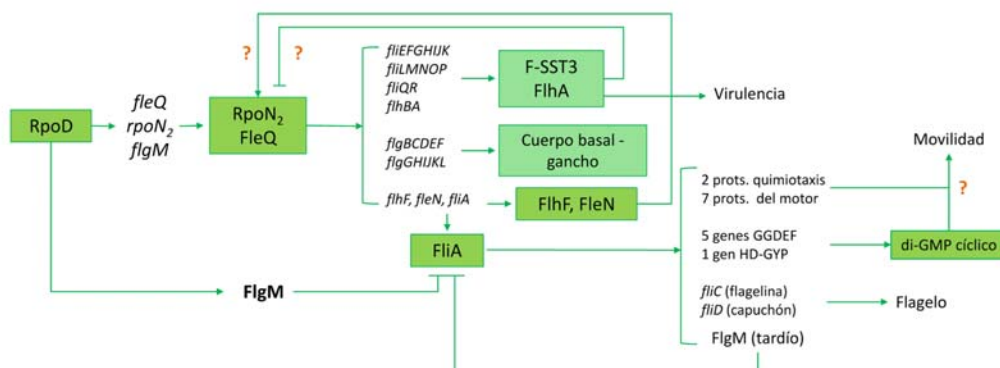
**Figura 1.5.** Estructura flagelar y proteínas del flagelo. Fuente: *Kegg genes database* (<http://www.genome.jp/>)

Existen otros tipos de movilidad que son independientes del flagelo, como el *twitching* (Henrichsen, 1972b; Henrichsen, 1983). Este tipo de movilidad tiene lugar a través de la extensión, inmovilización y luego retracción del *pili* tipo IV polar. Es un proceso muy importante en la colonización del huésped para patógenos, así como para la formación de *biofilm* (Comolli *et al.*, 1999; Li and Wang, 2011a; Merz, *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2008). El *twitching* es influenciado por las condiciones nutricionales, la densidad poblacional y diversas señales celulares (Huang, *et al.*, 2003; Mattick, 2002). Fue descrito para varias especies de bacterias Gram negativas, como *P. aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae*; en *Xyella* spp., es necesaria para la migración hacia los vasos de la planta huésped (Meng *et al.*, 2005). En *Xcc*, mutantes en el *pilus* tipo IV no fueron capaces de realizar *twitching* y tampoco de formar *biofilm* (Dunger *et al.*, 2014).

El *sliding* es otro tipo de movilidad independiente de la presencia o funcionalidad del flagelo (Henrichsen, 1972a). Henrichsen (1972a) lo describe como un tipo de translocación sobre la superficie producida por fuerzas expansivas en colonias en fase de crecimiento, en combinación con propiedades particulares de la superficie celular, que resultan en una reducción de la fricción entre las células y el sustrato. *Xcc* es capaz de realizar *sliding* (Malamud *et al.*, 2011).

#### 2.4.1. Síntesis de los genes flagelares

Yang y colaboradores (2009) describen cómo es la vía de la síntesis del flagelo en *X. campestris*. La expresión de los genes del flagelo está regulada de manera jerárquica, como en otras bacterias flageladas.



**Figura 1.6.** Modelo de la cascada transcripcional de los genes flagelares en *X. campestris* (tomado de Yang y colaboradores, 2009).

Según lo descrito en la Fig. 1.6, los genes flagelares se pueden agrupar en tres clases temporales, de acuerdo al tipo de factor sigma que reconozca su promotor. Las proteínas de clase I,  $RpoN_2$  ( $\sigma^{54}$ ) y FleQ, son los reguladores maestros de la vía de señalización y dirigen la expresión de los genes de clase II. FlgM se transcribe tempranamente en el proceso, por actividad de su promotor clase I. Este regulador inhibe la transcripción del factor FliA ( $\sigma^{28}$ ) hasta que finalice la de todos los genes de clase II y se complete el ensamblaje del cuerpo basal y el gancho del flagelo. Los genes de clase III son aquellos cuya transcripción está controlada por FliA y codifican para proteínas relacionadas con: el filamento flagelar, el tapón y reguladores de la movilidad. FlgM, cuando se transcribe de manera tardía, actúa como freno de todo el proceso (Yang *et al.*, 2009).

Como puede observarse también en la figura 1.6, el segundo mensajero di-GMP-cíclico está involucrado en la regulación de la síntesis de los genes flagelares, de esta manera su concentración influye en la regulación de la movilidad. Dependiendo de la bacteria, se ha descrito que este segundo mensajero puede actuar en varios niveles; por ejemplo, ejerciendo su influencia sobre la transcripción de genes flagelares de distintas clases, sobre el ensamblaje, sobre el tipo de movimiento que realiza este apéndice y sobre su expulsión (Wolfe and Visick, 2008).

## 2.5. Exopolisacáridos

*Xanthomonas* spp. produce al menos dos tipos de polisacáridos extracelulares: el xantano (Jansson, *et al.*, 1975; Sutherland, 1993; Vojnov *et al.*, 2001a) y el glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) (Amemura and Cabrera-Crespo, 1986; Talaga *et al.*, 1996; Vojnov *et al.*, 2001b; York, 1995).

### 2.5.1. Xantano

*Xanthomonas* spp. produce un exopolisacárido característico: el xantano; responsable de la apariencia mucosa de las colonias. Este polisacárido consiste en un polímero formado por unidades repetidas de un pentasacárido de manosa  $\beta$ -(1,4)-ácido glucurónico  $\beta$ -(1,2)- manosa  $\beta$ -(1,3)- celobiosa (Jansson, *et al.*, 1975; Sutherland, 1993). Esta molécula es importante en la industria ya que es utilizada como espesante en el área alimenticia y farmacéutica (Becker *et al.*, 1998).

Los genes responsables de su síntesis en *Xanthomonas* spp. se encuentran en el operón *gum*, compuesto por 12 genes (*gumB-gumM*). El mismo está altamente conservado entre las bacterias del género (Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 1998). Mutaciones dentro del operón derivan no sólo en la pérdida de la capacidad de producir xantano sino que además, reducen la supervivencia epifítica, el crecimiento de la bacteria en la planta y además reducen la aparición de los síntomas característicos de esta enfermedad en el huésped (Chou *et al.*, 1997; Dharmapuri and Sonti, 1999; Dunger *et al.*, 2007; Katzen *et al.*, 1998; Kemp *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Rigano *et al.*, 2007b). Hay estudios que sugieren que el efecto del xantano en la virulencia de la bacteria depende de la planta huésped y las condiciones ambientales. Por ejemplo, el operón *gum* en *Xcc* no es esencial para el crecimiento de la bacteria en la planta y el consecuente desarrollo de síntomas en *Citrus sinensis* (naranja dulce) pero en *C. limón* es fundamental para la virulencia de la bacteria (Dunger *et al.*, 2007; Rigano *et al.*, 2007b). Trabajos más recientes en *C. sinensis* confirman que el xantano es elemental para los primeros estadios de la infección por *Xcc* (Facincani *et al.*, 2014).

Las peculiaridades estructurales del xantano (de consistencia hidratada y naturaleza aniónica) contribuyen a que la bacteria pueda sobrevivir a estreses ambientales, en particular la deshidratación y acción de compuestos tóxicos. Es por esto último que resulta lógico que el xantano sea el mayor componente de las estructuras de *biofilm* que desarrollan las *xanthomonas*. La formación de *biofilm* provee de protección contra los antibióticos y la respuesta de defensa de la planta contribuyendo a la supervivencia epifítica, antes de que la bacteria colonice el espacio intercelular o se adhiera al sistema vascular de la planta (Stoodley *et al.*, 2002). En *X. campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* y en *Xcc*, ha sido demostrado que el rol del xantano está implicado en la formación de estas estructuras (Dow *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Rigano *et al.*, 2007b;

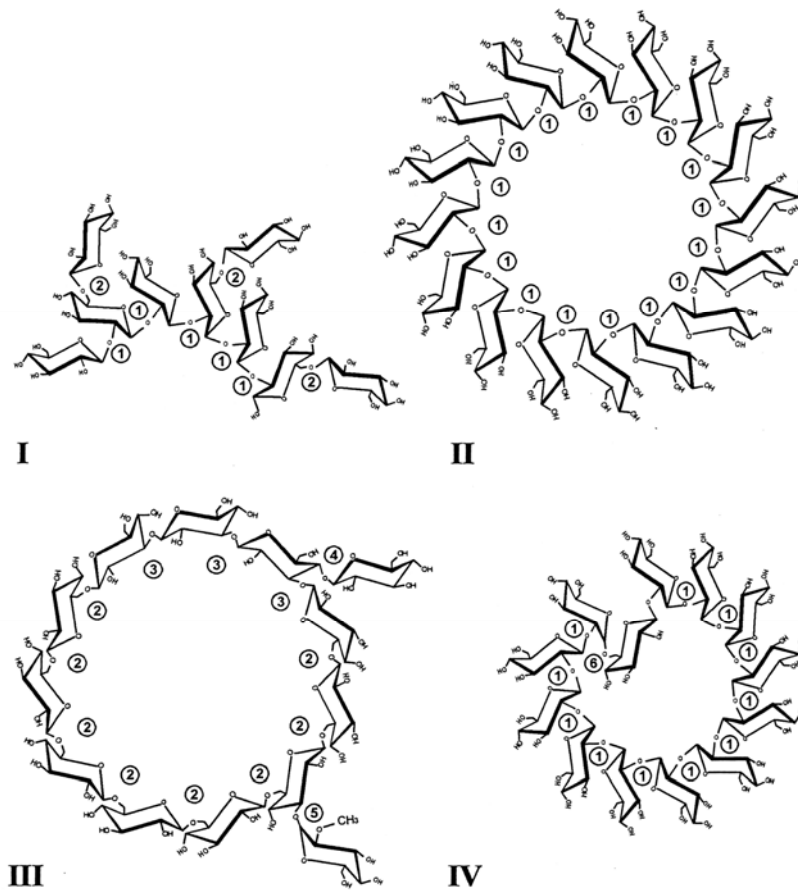
Torres *et al.*, 2007). Asimismo, existen estudios que muestran al xantano como supresor de la respuesta basal de defensa de la planta, en particular su presencia disminuye la deposición de calosa en la pared celular, posiblemente mediante el “quelado” de los iones calcio que están presentes en el apoplasto y que son necesarios para la activación de esta respuesta (Aslam *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2006).

#### 2.5.2. Glucanos periplasmáticos

El periplasma de las bacterias Gram negativas forma una matriz gelificada que contiene mureína, una variedad de proteínas particulares de este compartimento y los glucanos periplasmáticos (GPs) (Bohin, 2000). A pesar de que los GPs varían su estructura según la especie, comparten características comunes: tienen como componente principal y común a la D-glucosa en su esqueleto y posee a estas glucosas unidas por uniones glucosídicas de tipo  $\beta$  (Bohin, 2000). La concentración de estas moléculas en el periplasma aumenta en respuesta a la baja osmolaridad del ambiente, salvo algunas especies como *Brucella abortus* (Bohin, 2000; Briones *et al.*, 1997). Este incremento de concentración evita que el agua ingrese al interior de la célula, de manera que se conserva la concentración de iones interna en un umbral mínimo para garantizar el funcionamiento celular.

Los primeros reportes de la presencia de glucanos derivaron del análisis del sobrenadante de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* (McIntire, 1942). Posteriormente, en 1973, se “redescubrieron” a partir de un estudio del *turnover* de fosfolípidos de membrana en *E. coli* (Van Golde, 1973).

Los GPs fueron descritos en casi todas las especies de las subdivisiones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de las proteobacterias (Bontemps-Gallo and Lacroix, 2015). Presentan una interesante diversidad estructural; de acuerdo a cómo se organizan sus esqueletos glucosídicos se clasificaron en cuatro familias (Bohin, 2000) (Fig. 1.7).



**Figura 1.7.** Las cuatro familias de estructuras de GPs encontradas en las Proteobacterias. 1) Uniones  $\beta$ -(1,2); 2)  $\beta$ -(1,6); 3)  $\beta$ -(1,3); 4)  $\beta$ -(1,4); 5)  $\alpha$ -(1,3); 6)  $\alpha$ -(1,6). Tomado de Bohin (2000).

La familia que ha sido más estudiada es la primera, que agrupa a los GPs sintetizados por una variedad de especies como *E. coli* (Kennedy, 1982), *P. syringae* (Talaga, et al., 1994) y *Erwinia chrysanthemii* (actualmente *Dickeya dadantii*) (Cogez et al., 2001). Se trata de glucanos lineales de 5 a 12 unidades de glucosa unidas por uniones glucosídicas de tipo  $\beta$ -(1,2) con ramificaciones que se unen al esqueleto lineal por uniones  $\beta$ -(1,6).

La familia II abarca a los glucanos cíclicos de tamaño heterogéneo producidos por la familia *Rhizobiaceae* (*Agrobacterium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Brucella* spp.). Las uniones entre las glucosas de estas moléculas son  $\beta$ -(1,2) y la cantidad de monómeros ronda entre las 17 y 25 glucosas. En el caso particular de *Sinorhizobium meliloti* el ciclo es de 40 unidades (Breedveld et al., 1994a).

Los GPs de la familia III también son cíclicos y los producen bacterias pertenecientes a los géneros de *Bradyrhizobium* spp. y *Azospirillum* spp. Presentan distintas uniones de tipo  $\beta$  entre los 10 a 13 residuos que los conforman (Breedveld et al., 1994a; Rolin et al., 1992).

*Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* spp., *Rhodobacter sphaeroides* sintetizan GPs cíclicos de la familia IV, con un único grado de polimerización 13, 16, 18 unidades, respectivamente (Talaga *et al.*, 1996; York, 1995). Las uniones son  $\beta$ -(1,2), salvo una de ellas que es  $\alpha$ -(1,6) que le otorga rigidez a la estructura (Wieruszeski *et al.*, 2001). En particular, *Xanthomonas* spp. produce un glucano cíclico con un grado de polimerización de 16 residuos de glucosa, conteniendo 15 uniones  $\beta$ -(1,2) cíclicos y una unión glicosídica  $\alpha$ -(1,6) (Amemura and Cabrera-Crespo, 1986; Talaga *et al.*, 1996; York, 1995).

El esqueleto de glucosas de los GPs puede estar, dependiendo de la especie de bacteria, sustituidos por varios tipos de moléculas, como fosfoglicerol, fosfoetanolaminas, fosfocolinas, entre otras. Los residuos *O*-succinil son los que más ampliamente se distribuyen entre las Proteobacterias (Bohin, 2000; Lee *et al.*, 2009). En lo respectivo al género *Xanthomonas* spp., *X. campestris* produce un glucano cíclico con sustituciones de grupos de fosfoglicerol (Jung *et al.*, 2005).

En general, la síntesis del esqueleto de glucosa depende del operón *opgGH* (en el caso de las familias I y IV) (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013a) o *ndvAB/chvAB/cgs* (en el caso de las familias II y III) (Bontemps-Gallo and Lacroix, 2015). La inactivación del operón deriva en la pérdida total de los GPs (Bohin, 2000). En el caso particular del género *Xanthomonas* spp., no está totalmente caracterizado el mecanismo de síntesis. Hasta el momento, Rigano y colaboradores (2007) hallaron que el gen XC\_4168 codifica para una proteína *ndvB* funcional que está involucrado en la síntesis de este polisacárido en *X. campestris*.

Las mutantes que no producen GPs muestran, en general, fenotipos pleiotrópicos (ver algunos ejemplos en **Tabla 1.1**). En todos los casos se observa la pérdida de virulencia asociada a la pérdida de los GPs, tanto en patógenos de plantas como de animales (Bontemps-Gallo and Lacroix, 2015).

Los GPs son fundamentales en la interacción entre la bacteria y la planta huésped, tanto en interacciones simbióticas, como la de *B. japonicum* (Bhagwat *et al.*, 1999) y *S. meliloti* (Geremia *et al.*, 1987), y las patógenas, como *A. tumefaciens* (Iñón de Iannino N., 1998) y *P. syringae* (Loubens *et al.*, 1993). Asimismo, a los glucanos cíclicos se le han adjudicado nuevos roles en el desarrollo de la enfermedad generada por bacterias fitopatógenas, relacionados con la supresión de la respuesta inmune de la planta. Se demostró que el glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) producido por *X. campestris* induce susceptibilidad en *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* a través de la supresión de la deposición de calosa en la pared celular de la célula vegetal (Rigano *et al.*, 2007a).

Tabla 1.1: Fenotipos producidos por la pérdida de los GPs. Adaptado de Bontemps-Gallo y Lacroix (2015).

Fenotipo	Especie	Observación	Referencia
Colonia mucosa	<i>E. coli</i>	Sobreproducción de exopolisacárido	Ebel et al., 1997
	<i>E. chrysanthemi</i>	Sobreproducción de exopolisacárido	Page et al., 2001
	<i>Rhizobaceae</i>	Sobreproducción de exopolisacárido	Breedveld et al., 1994b
Movilidad	<i>E. coli</i>	Pérdida de movilidad debido a la pérdida del flagelo	Fiedler et al., 1988
	<i>E. chrysanthemi</i>	(por represión del operón <i>flhDC</i> por el sistema Rcs)	Page et al., 2001
	<i>Salmonella enterica</i> sv. <i>typhimorium</i>		Bhagwat et al., 2009
División celular	<i>E. coli</i>	Secuestro de FtsZ	Hill et al., 2013
Crecimiento en medio hiposmótico	<i>S. melliloti</i>	Baja tasa de crecimiento en medio de baja osmolaridad	Breedveld et al., 1994
	<i>A. tumefaciens</i>	Baja tasa de crecimiento en medio de baja osmolaridad	Miller et al., 1986
	<i>S. enterica</i> sv. <i>typhimorium</i>	Baja tasa de crecimiento en medio de baja osmolaridad	Bhagwat et al., 2009
	<i>Shigella flexneri</i>	Baja tasa de crecimiento en medio de baja osmolaridad	Liu et al., 2010
	<i>S. melliloti</i>	Antibióticos	Dylan et al., 1990
Sensibilidad	<i>P. aeruginosa</i>	Antibióticos	Mah et al., 2003
	<i>E. coli</i>	SDS	Rejagopal et al., 2003
	<i>E. chrysanthemi</i>	Salas biliares	Page et al., 2001
	<i>E. chrysanthemi</i>	Pérdida de la capacidad de formación de <i>biofilm</i>	Bouchard, 2006
<i>Biofilm</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Entorcimiento del proceso de formación de <i>biofilm</i>	Lequette et al., 2007
Virulencia	<i>B. abortus</i>	Dificultades para invadir la célula huésped	Briones et al., 2001; Roset et al., 2004
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	OpgH es necesaria para los primeros estadios de la infección	Young and Miller, 1997
	<i>P. aeruginosa</i>	Pérdida de virulencia en ratón, <i>A. thaliana</i> y <i>Caenorhabditis elegans</i>	Mahajan-Miklos et al., 1999
	<i>S. enterica</i> sv. <i>typhimorium</i>	Pérdida de virulencia en ratón	Bhagwat et al., 2009
	<i>S. flexneri</i>	Pérdida de la capacidad infectiva en macrófagos y células HeLa	Liu et al., 2010
	<i>P. syringae</i>	Pérdida de virulencia	Loubens et al., 1993
	<i>E. chrysanthemi</i>	Pérdida de virulencia en hojas de chicoria, en papa y zanahoria	Page et al., 2001
	<i>A. tumefaciens</i>	Pérdida de virulencia	Puvanesarajah et al., 1985
	<i>X. campestris</i>	Pérdida de virulencia en hojas de tomate, <i>N. benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i>	Minsavage et al., 2004; Rigano et al. 2007 (a)
	Simbiosis	<i>S. melliloti</i>	Desarrollo de nódulos de raíz alterado
<i>B. japonicus</i>		Desarrollo de nódulos de raíz alterado	Dunlap et al., 1996

## 2.6. Enzimas extracelulares y sistema de secreción tipo II

La secreción de una variedad de enzimas capaces de degradar componentes de la pared celular de plantas vasculares y otros componentes celulares tiene un papel crucial en enfermedades bacterianas. Mutantes que no las producen/secretan o tienen disminuida su producción/secreción se encuentran afectados en su capacidad de producir síntomas en las plantas (von Bodman *et al.*, 2003).

El sistema de secreción tipo II, T2SS (del inglés: *Type Two Secretion System*), secreta toxinas y enzimas extracelulares como lipasas y enzimas que degradan la pared celular. El aparato del T2SS consta de 12 a 15 componentes, la mayoría de los cuales está asociado a la membrana interna de la bacteria (Sandkvist, 2001). Los T2SS fueron identificados como factores de virulencia en muchas bacterias fitopatógenas como *R. solanacearum*, *Erwinia* spp. y *Xanthomonas* spp. (Cianciotto, 2005; Jha *et al.*, 2005). El análisis de las secuencias de los genomas de las *Xanthomonas* revelan que poseen un T2SS (*X. oryzae* pv. *oryzae* y *X. oryzae* pv. *oryzicola*) o hasta incluso dos T2SS (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* y *Xcc*), que son codificados por los clústeres de genes *xcs* y *xps*. Mutaciones que afectan la virulencia fueron mapeadas en el clúster *xps* (Dow *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2005; Rajeshwari *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2000; Sole *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2005; Szczesny *et al.*, 2010). Las proteínas secretadas por el Xps-T2SS de *X. campestris*, *Xcc* y *X. oryzae* pv. *oryzae* incluyen enzimas degradativas como celulasas, celobiosidasas, xilanasas, endoglucanasas, proteasas y lipasas (Dow *et al.*, 1987; Furutani *et al.*, 2004; Jha *et al.*, 2005; Laia *et al.*, 2009; Rajeshwari *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2000; Schroter *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 2008).

## 2.7. Biofilms

La percepción general de la bacteria como una forma de vida unicelular aislada y planctónica no es lo que frecuentemente ocurre en la naturaleza. En el ambiente natural, los microorganismos viven adheridos a una superficie abiótica (inerte) o una biótica (un ser vivo), formando estructuras complejas a las que llamamos *biofilm* (Costerton *et al.*, 1987). Estas comunidades metabólicamente integradas se constituyen por una agrupación de microorganismos embebida en una matriz de exopolisacárido, en la cual también hay ADN y proteínas (Costerton *et al.*, 1995). La formación del *biofilm* se desencadena segundos después de que las células bacterianas detectan señales ambientales como cambios en los nutrientes o en la concentración de los nutrientes (glucosa, indol, poliaminas, etc.) cambios en iones inorgánicos (hierro, fósforo), pH, temperatura, concentración de oxígeno, osmolaridad, presencia de

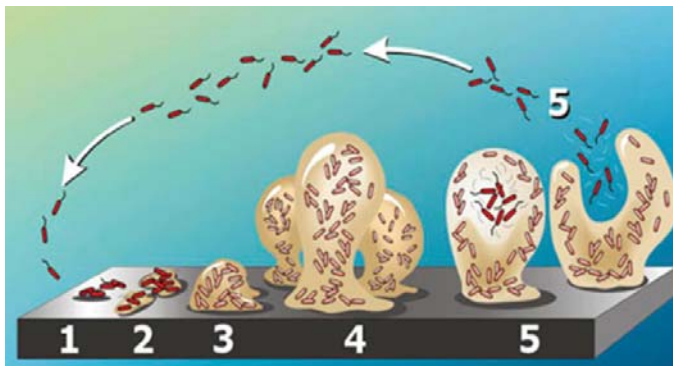


antimicrobianos o señales del huésped (Aparna and Yadav, 2008; Karatan and Watnick, 2009; O'Toole and Kolter, 1998a).

La vida en el *biofilm* le resulta a la bacteria favorable por diversos motivos. La formación de estas estructuras es un modo de mantener una masa crítica en determinados sitios específicos que permitirán, para el caso de las bacterias fitopatógenas, iniciar la infección. Por otra parte, los *biofilms* confieren resistencia a determinados estreses ambientales como tolerancia a agentes antimicrobianos, protección contra la predación de protozoos, metabolismo de consorcio o la oportunidad de hacer transferencia horizontal de genes. Asimismo, el gran número de individuos posibilita llevar a cabo determinados procesos que las células individuales no podrían lograr eficientemente (Danhorn and Fuqua, 2007).

En general, en la naturaleza, estas estructuras contienen varias especies microbianas, proporcionándole así mayor estabilidad a este sistema (Paster *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los trabajos, sobre todo aquellos sobre la biología molecular de la formación del *biofilm* se han realizado en estructuras de especie única que resultan más afables al análisis genético.

El proceso de formación de *biofilm* es dinámico y complejo pero los estadios de desarrollo parecen estar conservados entre muchos procariontes (Fig. 1.8). Las diferencias subyacen en, por ejemplo, el tipo de sustrato de adhesión, los requerimientos nutricionales, el tiempo de maduración del *biofilm*, la composición de la matriz, etc. (Monds and O'Toole, 2009).



**Figura 1.8.** Esquema de las etapas en la formación de *biofilm* (Sauer, 2003). (1) Adhesión al sustrato; (2) formación de microcolonias; (3) formación de la matriz de EPS; (4) desarrollo de macrocolonias; (5) establecimiento del *biofilm* maduro y desprendimiento de células del mismo.

El proceso implica varias etapas: la adhesión a una superficie de las bacterias, replicación, adhesión entre las células que deriva en la formación de microcolonias, maduración y liberación (Martínez and Vadyvaloo, 2014). La etapa inicial del proceso es la adherencia sobre la superficie. Cuando las bacterias son transportadas a una superficie por sedimentación, por el flujo de líquido, o por movimiento activo (*swimming*), éstas se adhieren de modo débil. Este es un proceso que depende en gran

medida de las interacciones físico-químicas y electroestáticas entre la envoltura celular y el sustrato. En bacterias Gram negativas (como *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli*, *S. entérica*) se ha visto que estructuras de membrana como los flagelos, las fimbrias y los *pili* son importantes para la adherencia primaria (O'Toole *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2004). Del mismo modo, moléculas de la membrana celular son también importantes (como LPS, lipoproteínas, proteínas de membrana, adhesinas, etc.) (Kiersek-Pearson *et al.*, 2005). En *Vibrio* spp. se propuso que el flagelo sirve para vencer las fuerzas electroestáticas repulsivas entre el sustrato y la superficie celular bacteriana, dando como resultado una reducción de la energía requerida para la adhesión (Lejeune, 2003; Pratt, 1998). Las bacterias usan fimbrias y *pili* para adherirse tanto a la superficie como entre ellas (Watnick and Kolter, 1999). La próxima fase, la adhesión irreversible, depende tanto de las propiedades de la superficie a colonizar como de las de la superficie de la bacteria. Si las condiciones fisicoquímicas (por ejemplo, la hidrofobicidad o hidrofiliidad de la superficie y la naturaleza de las sustancias depositadas en el sustrato) son favorables, la adhesión irreversible se concreta. Durante este proceso, una monocapa de células se forma sobre el sustrato (Kiersek-Pearson and Karatan, 2005).

Una vez que las bacterias se han adherido a la superficie, se redistribuyen mediante movimientos de corta distancia, comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de cultivo. Además, van reclutándose bacterias sueltas a estas microcolonias. Las bacterias pueden comunicarse entre sí mediante la producción de moléculas de *quorum sensing* (QS), siendo este un evento clave (Camilli and Bassler, 2006). Es entonces cuando los microorganismos comienzan a secretar polisacárido, el componente mayoritario de la matriz del *biofilm*. Se va organizando así lo que llamamos el *biofilm* maduro, estructura similar al aspecto de una “seta de hongo”, entre la que se observa la presencia de canales de agua y de poros (Kiersek-Pearson and Karatan, 2005). Un *biofilm* maduro posee una arquitectura y estructura complejas que pueden verse afectadas por varios parámetros, especialmente por la disponibilidad de nutrientes (Kiersek-Pearson and Karatan, 2005).

La matriz de un *biofilm* maduro consiste, en general, en un 95% de agua, 2-5% de células microbianas, 3-6% de EPS e iones (Sutherland, 2001). El EPS aporta del 50 al 90% de la materia orgánica de la estructura pero también la aportan las proteínas y los ácidos nucleicos (ADN y ARN), que constituyen al menos el 2% de la matriz (Donlan, 2002; Flemming *et al.*, 2007; Flemming and Wingender, 2001; Sutherland, 2001). Además de permitir la unión estable entre células (Cramton *et al.*, 1999; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011; Watnick and Kolter, 1999; Yildiz and Schoolnik, 1999), el exopolisacárido

promueve también la adhesión a la superficie de estas bacterias (Moorthy and Watnick, 2004). Asimismo, el EPS puede generar hidratación en el *biofilm*, dependiendo de sus características estructurales.

Finalmente, si las condiciones se tornan no favorables, algunas bacterias de la matriz del *biofilm* se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del mismo. La disponibilidad de nutrientes, la presencia de oxígeno, los subproductos del metabolismo anaerobio, las señales del QS, los niveles del segundo mensajero di-GMP cíclico, son los factores más significativos en la dispersión del *biofilm* (Martínez and Vadyvaloo, 2014). La dispersión de las células puede tener lugar por el “derrame” de pequeñas porciones de *biofilm* (*sloughing* o derrame) o por la liberación de células libres por *swimming* (erosión) (Stoodley *et al.*, 2001). La muerte y la lisis celular que ocurren dentro del *biofilm* pueden también tener un papel importante en su dispersión (Webb *et al.*, 2003). Aún no se han dilucidado los detalles mecánicos de esta disgregación.

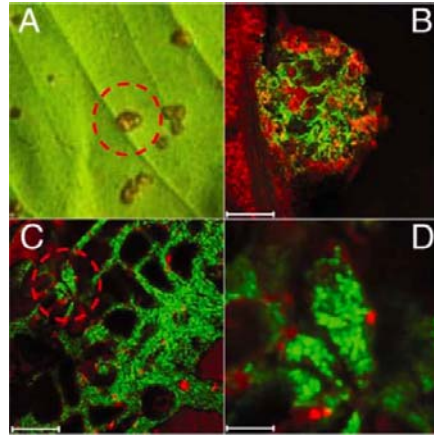
El *biofilm* puede ser visualizado por una variedad de técnicas microscópicas como microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido láser (SCLM). En particular, ésta última es un método no invasivo que permite la visualización del *biofilm* en desarrollo, maduro e hidratado (Lawrence *et al.*, 1991).

### 2.7.1. *Biofilms* en *Xanthomonas* spp.

Las primeras observaciones de estructuras multicelulares tipo agregado en *Xanthomonas* spp., similares a *biofilm*, fueron observadas por Dow y colaboradores (Dow *et al.*, 2003). Mutantes defectivas de *X. campestris* en el sistema de QS (ver sección Introducción 3) son capaces de formar agregados en medio rico L (con contenido de glucosa y cloruro de sodio), a diferencia de las cepa silvestre. Las bacterias se encontraban integradas dentro de una matriz cuya formación era dependiente de xantano. Estos agregados sólo se dispersaban en la mutante *rpfF* -gen que codifica para una proteína responsable de la síntesis de DSF (molécula señal de QS)- con el agregado de la molécula señal, DSF. El DSF no tenía efecto alguno en los agregados formados por las mutantes *rpfC* y *rpfG* (sistema de detección de DSF). Con el agregado de DSF la cepa silvestre se mantenía dispersa. A partir de estos resultados, ellos postularon que durante la enfermedad, una endo- $\beta$ -1,4-mananasa (cuya expresión es dependiente de DFS) era la responsable de promover la transición de un estado de agregado/*biofilm* a la vida planctónica en respuesta a una señal de DSF. Como conclusión, entonces, el DSF promovía la dispersión del *biofilm*. Un trabajo posterior de Torres y colaboradores (Torres *et al.*, 2007) estudió la formación de *biofilm* en *X.*

*campestris* en un medio mínimo. El mismo se asemeja más a la composición del medio extracelular de una hoja, condición más cercana a la que experimenta la bacteria en la planta. Además, demostraron que tanto la sobreproducción como la baja producción de DSF, afectan negativamente la formación y estructuración del *biofilm*.

Utilizando el mismo método de análisis por SCLM que Torres y colaboradores (2007), Rigano y colaboradores (2007b) estudiaron la formación de *biofilm* en *Xcc*. Mostrando que en esta bacteria, el xantano también es fundamental para el desarrollo del proceso tanto *in vivo* como *in vitro*. (Fig. 1.9).



**Figura 1.9.** Imágenes tomadas por SCLM del biofilm formado en el cancro de *Xcc* (expresando la proteína verde fluorescente). Tomado de Rigano y colaboradores (2007b). (A) Sin aumento, (B) 100X, (C) 1000X, (D) 4000X.

Como ha sido descrito, el flagelo es clave en los eventos iniciales de la formación de *biofilm* en muchas de las especies Gram negativas. Estudios de SCLM de cultivos estáticos en *Xcc* demostraron que el flagelo también está involucrado en la formación de estructuras tipo “seta de hongo”, de canales de agua, y además juega un rol en la dispersión del *biofilm*. También es requerido en el desarrollo de estas comunidades sobre la superficie de hojas de limón (Malamud *et al.*, 2011). Otro de los filamentos similares al flagelo en *Xcc*, es el *pilus* tipo IV siendo que éste último está implicado en la adhesión de la bacteria al sustrato y en el desarrollo del *biofilm* maduro (Dunger *et al.*, 2014).

En general, este proceso es complejo y en él participan muchos factores, tanto en la formación en sí misma como en la regulación. El esclarecimiento de cuáles son los determinantes genéticos y los regulatorios subyacentes son prerequisites para poder entender el mecanismo en su integridad. En consecuencia, se han realizado *screenings* de bibliotecas de mutantes en búsqueda de aquellas incapaces de formar *biofilm*. Li y Wang (Li and Wang, 2011a) realizando un *screening* de este estilo, hallaron 33 genes novedosos; entre ellos, dieciséis de estos genes implicados en la síntesis de EPS y/o de LPS, siete que se relacionan con vías regulatorias y de señalización, cinco cuya función nunca había sido asociada al *biofilm* previamente, una proteína con función fosfatasa y una proteína sensora de un sistema de dos componentes no descrito en *Xcc* hasta ese

momento (*rbf5*). En nuestro laboratorio se llevó a cabo un análisis similar, del cual derivan algunas de las mutantes estudiadas en esta tesis (Malamud *et al.*, 2013). Se realizó un screening de 6000 mutantes de *Xcc* generadas por inserción de Tn5 en búsqueda de aquellas con capacidad de adhesión a sustrato reducida respecto de la cepa silvestre. Se obtuvieron 23 nuevos genes que no habían sido involucrados previamente con la formación de *biofilm*.

### 3. Sistema de *Quorum sensing* (QS) y su rol en la regulación de factores de virulencia en *Xanthomonas* spp.

Las bacterias no son organismos aislados y solitarios sino que se “comunican” activamente entre ellas, utilizando pequeñas moléculas. El *quorum sensing* (QS) es un sofisticado mecanismo que permite la comunicación célula-célula. La bacteria utiliza este mecanismo para contabilizar el número de individuos a través de la producción, detección y respuesta a la acumulación de las moléculas señal que ellas exportan al medio externo (Bassler and Losick, 2006; Williams *et al.*, 2007). El QS se observó por primera vez en *Vibrio fischeri* como un mecanismo de control de la producción de bioluminiscencia basada en la densidad poblacional (Nealson and Hastings, 1979). A partir de este hallazgo, el QS fue descrito en numerosas especies Gram negativas y Gram positivas (Waters and Bassler, 2005).

Existe evidencia consistente de que el sistema de QS tiene un rol vital en la coordinación de varios procesos fisiológicos bacterianos que incluyen la producción de factores de virulencia y la formación de *biofilm* (Bassler and Losick, 2006; Williams *et al.*, 2007; Zhang and Dong, 2004). *Xanthomonas* spp. también posee un sistema de QS evolucionado para la regulación genética a nivel comunidad (Crossman and Dow, 2004b). Las bacterias del género sintetizan moléculas señal del tipo DSF (del inglés: *Diffusile Signal Factor*). En el caso de *X. campestris*, esta molécula fue caracterizada como un ácido graso saturado: ácido cis-11-metil-dodecanoico (Wang *et al.*, 2004a). *X. oryzae* pv. *oryzae*, cuando es cultivada en medio rico, sintetiza tres tipos de moléculas de la familia DSF: DSF (como el generado por *X. campestris*), BDSF (ácido cis-2-decanoico) y CDSF (ácido cis, cis-11-mitildodeca-2,5-dienoico) (He *et al.*, 2010). El DSF se sintetiza dentro de la célula bacteriana pero es libre, por su naturaleza lipídica, de difundir hacia el exterior celular. En este ambiente, los niveles de DSF están influenciados por una variedad de factores externos (Barber *et al.*, 1997; Fouhy *et al.*, 2006).

El sistema de señalización vía DSF fue descubierto a través de un análisis por mutagénesis de los genes involucrados en la regulación de enzimas extracelulares en *X. campestris* (Barber *et al.*, 1997). Efectivamente, la síntesis de la mayoría de los factores

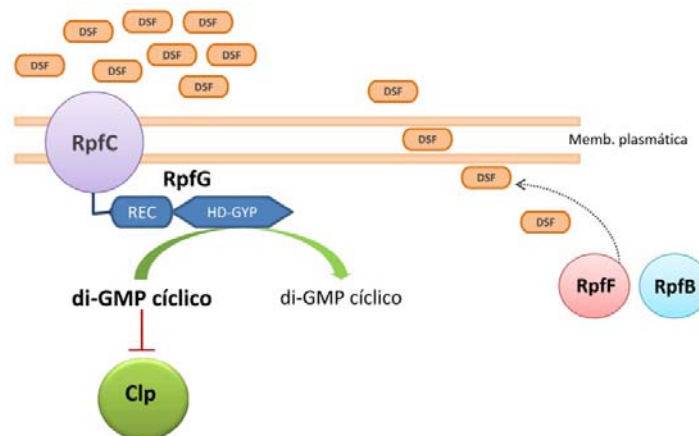
de virulencia en *Xanthomonas* spp. está controlada por los genes del *cluster rpf* (del inglés: *for regulation of pathogenicity factors*) (Barber *et al.*, 1997; Crossman and Dow, 2004a; Dow *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2006; Slater *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 1991; Torres *et al.*, 2007). Toda la información que deriva de los análisis genéticos y fenotípicos proponen que el sistema de señalización desencadenado por DSF no es sólo clave en la coordinación de la expresión de los genes de virulencia sino que, además, parece ser crítico en la supervivencia de las bacterias en “comunidades” (He and Zhang, 2008).

En *X. campestris*, los genes *rpfF* y *rpfB* codifican para proteínas que dirigen la producción de la molécula señal DSF. RpfF es una enzima clave en la síntesis de DSF y funcionaría como una probable enoil-CoA hidratasa (He *et al.*, 2006). La síntesis de DSF es completamente dependiente de RpfF, pero parcialmente de RpfB (Barber *et al.*, 1997).

El gen *rpfC* codifica una proteína reguladora de un sistema de dos componentes integrado por RpfC y RpfG. RpfC funciona como sensor compuesto por cinco dominios transmembrana, un dominio quinasa de histidina, un dominio receptor y un dominio fosfotransferasa de histidina. Una mutación en este gen da como resultado la atenuación de la virulencia y conduce a un aumento en el nivel de DSF de hasta 100 veces sobre el nivel de la cepa silvestre (Slater *et al.*, 2000). RpfG es la proteína reguladora que contiene un dominio receptor (REC) y un dominio HD-GYP implicado en la señalización y la regulación en bacterias. HD-GYP es un dominio proteico cuya función bioquímica es la degradación de di-GMP cíclico (fosfodiesterasa de di-GMP cíclico) (Dow *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006). El modelo para el mecanismo de modulación de la producción de la virulencia vía DSF sugiere que RpfC participa en un proceso de retroalimentación negativa que sirve para regular los niveles de DSF. El mecanismo por el cual esto ocurre no está totalmente esclarecido en la actualidad (Fig. 1.10), pero al parecer RpfG no intervendría en esta regulación. RpfC/RpfG usan un mecanismo conservado de fosforilación para transducir la señal de DSF. La detección de DSF (por RpfC) conduce a una reducción de los niveles de di-GMP-cíclico (por acción de RpfG), que actuaría como segundo mensajero, afectando directamente la producción de factores de virulencia de la bacteria (Ryan *et al.*, 2006).

La implicancia del di-GMP cíclico en el proceso de señalización vía DSF y la acción de degradación del mismo por RpfG, generando GMP, da indicios de la existencia de un receptor para este nucleótido río abajo de esta vía. Estudios llevados a cabo en *Xcc* y en *X. campestris* sugieren a la proteína Clp (del inglés: *CAP-like protein*) como un potencial candidato para esta función (He *et al.*, 2007; Leduc and Roberts, 2009). El gen *clp* codifica para un regulador transcripcional con dos dominios, uno de ellos que une nucleótidos y el otro que une ADN. Asimismo, la expresión del *clp* es dependiente

de DSF y la mutante en este gen posee un fenotipo similar a las cepas que no producen DSF (He *et al.*, 2007). Altas concentraciones de di-GMP cíclico inhiben la unión de Clp al DNA. Por el contrario, bajos niveles permite a Clp poder activar la transcripción de los genes que regula (He and Zhang, 2008). Un análisis por *microarray* en *X. campestris* determinó que Clp afecta la expresión de 299 genes, de los cuales 86 pueden concentrarse en cuatro grandes grupos funcionales: enzimas extracelulares, biosíntesis de exopolisacárido, metabolismo proteico y proteínas de membrana y transportadores (He *et al.*, 2007b).



**Figura 1.10.** Modelo de activación de la síntesis de los factores de virulencia en *X. campestris* por DSF. Cuando la densidad celular es baja, RpfC forma un complejo con RpfF, esto impide la síntesis de DSF. Cuando la densidad celular aumenta, el DSF extracelular acumulado interactúa con RpfC. Se induce un cambio conformacional en el sensor de modo tal que se libera RpfF y además se transduce esta señal vía RpfG que degrada di-GMP cíclico produciendo GMP. Altas concentraciones de di-GMP cíclico inhibirían la actividad de Clp que se activa luego de que el mensajero disminuye su concentración. Esto último permite la transcripción de los genes implicados en la virulencia de la bacteria. Adaptado de Fouhy (2006) y de He (2008).

Los otros genes del operón *rpf* (*rpfADEI*) no tienen una participación aparente en el sistema de regulación de DSF. RpfA es una aconitasa que puede desempeñar un papel en la homeostasis del hierro. RpfD se caracteriza por su dominio de unión a ADN: LytTR. A las proteínas hipotéticas conservadas RpfE y RpfI, no se les conoce función. En *X. campestris*, la proteína RpfH tiene mucha similitud de secuencia con el dominio sensor de RpfG, pero no tiene una función aparente (Fouhy *et al.*, 2006).

El *cluster* de genes *rpf* varía su composición en las especies de *Xanthomonas* spp. Sin embargo, los genes *rpfF*, *rpfC* y *rpfG* se encuentran en todas las *Xanthomonas* spp. descritas (Guo *et al.*, 2012). En el caso de *X. campestris*, comprende 9 genes, *rpfA-I* (Barber *et al.*, 1997; Dow *et al.*, 2000). En *Xcc*, no se encuentra al gen *rpfH* y difiere la organización del *cluster*. Aun así, la similitud de secuencia entre los genes de ambas especies es muy alta (da Silva *et al.*, 2002; Fouhy *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2005).

El análisis comparativo de genomas junto con evidencia experimental sugiere que *Xcc* utiliza un mecanismo de regulación por DSF análogo al de *X. campestris*. Mutaciones en los genes *rpfF* y *rpfC* en *Xcc* reducen la producción de enzimas extracelulares y disminuyen la virulencia en plantas de limón, generando fenotipos similares a aquellos obtenidos para *X. campestris* (Siciliano *et al.*, 2006). Como para *X. campestris*, la mutante *Xcc rpfF* no genera DSF mientras que *Xcc rpfC* es una cepa hiperproductora de esta molécula (Siciliano *et al.*, 2006). Por otra parte, se comprobó por ensayos de doble híbrido y bioquímicos la interacción física entre RpfF y RpfC (Andrade *et al.*, 2006).

El sistema de DSF no es el único sistema de QS conservado en el género *Xanthomas*. En *X. campestris* se halló otro sistema de QS distinto al anteriormente descrito cuya molécula señal es un factor difusible (DF) y es producido por la mayoría de las xanthomonas (Poplawsky and Chun, 1997; Poplawsky and Chun, 1998). DF está implicado en la regulación de la producción de xanthomonadina y el exopolisacárido (Poplawsky and Chun, 1998). DF y DSF son claramente señales distintas porque difieren en actividad biológica, comportamiento cromatográfico, estructura química y en los genes responsables de su síntesis (Barber *et al.*, 1997; Poplawsky and Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004b). El hecho de que la síntesis del EPS esté influenciada por ambos sistemas sugiere que ambos podrían interactuar en determinados contextos. Poseer dos sistemas de QS que regulen distintos sets de genes de virulencia, otorga plasticidad en la respuesta de las bacterias en diferentes ambientes.

#### 4. Regulación mediada por di-GMP cíclico.

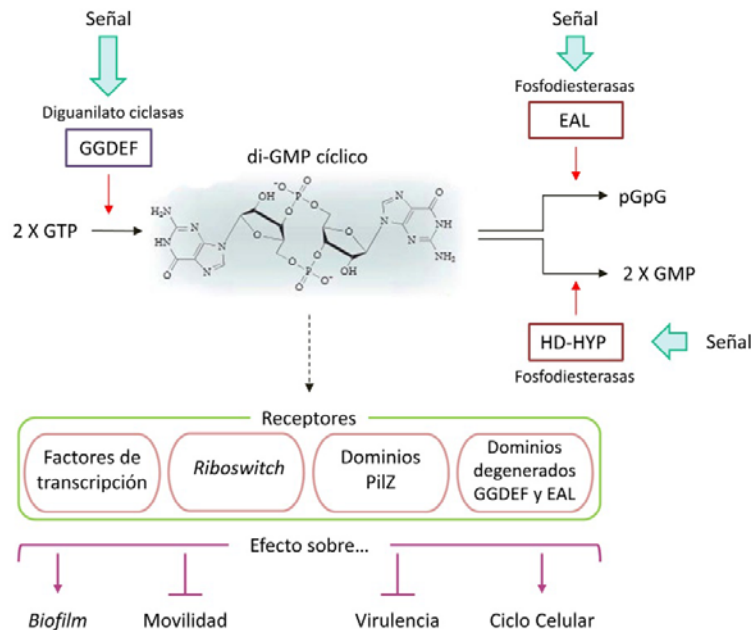
Un regulador clave en la fisiología bacteriana es el segundo mensajero di-GMP cíclico, que controla procesos múltiples como virulencia, ciclo celular, movilidad y formación de *biofilm*, entre otros. Esta molécula fue descrita en primera instancia como un activador de la síntesis de celulosa en *Gluconacetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1987).

Las diguanilato ciclasas (DGCs) son las encargadas de la síntesis de esta pequeña molécula y éstas contienen el dominio específico GGDEF. El di-GMP cíclico es degradado a través de la acción de las fosodiesterasas (Paul *et al.*, 2004; Ryjenkov *et al.*, 2005) portando dominios característicos: EAL (Christen *et al.*, 2005; Schmidt, 2005) o HD-GYP (Ryan *et al.*, 2006) (Fig. 1.11).

Muchas proteínas poseen dominios GGDEF y EAL pero en general sólo exhiben actividad de DGC o de PDE. Los dominios GGDEF y EAL con frecuencia se encuentran en proteínas multidominio en combinación con otros dominios regulatorios de



naturaleza diversa que son comunes de proteínas de señalización en bacterias (Galperin, 2005; Galperin *et al.*, 2001). Estos dominios regulatorios, en respuesta al ambiente y a señales ambientales, pueden inducir la síntesis o degradación del segundo mensajero en respuesta a señales como la luz (Barends *et al.*, 2009; Tarutina *et al.*, 2006) y el oxígeno (Chang *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2009; Sawai *et al.*; Tuckerman *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2009), o a través de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Paul *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2009) o la proteólisis (Tarutina *et al.*, 2006).



**Figura 1.11.** El di-GMP cíclico es un segundo mensajero común en bacterias que controla varios procesos fisiológicos múltiples. Es producido por las proteínas con función diguanilato ciclasas (DGCs) que contienen dominios GGDEF y degradado por las fosfodiesterasas con dominios EAL o HD-GYP. El di-GMP cíclico es sentido por las proteínas receptoras con dominios PilZ, factores de transcripción, proteínas con dominios GGDEF o EAL degenerados o familias de *riboswitch*. En general, primero interactúa con el receptor para luego interactuar con un target río abajo y de esta manera alterar una función particular. Adaptado de Sondermann y colaboradores (2012) y de Boyd y colaboradores (2012). Abreviaciones: GMP, monofosfato de guanosina; pGpG, 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina.

Las redes que involucran al di-GMP cíclico deben tener mecanismos para generar esta señal y a la vez, responder a los cambios en sus niveles. Por lo tanto, como complemento a aquellas enzimas implicadas en la síntesis y degradación de este mensajero, un sistema de efectores permite a la bacteria responder a los cambios en los niveles del mismo. Los receptores o efectores de di-GMP cíclico son proteínas o ARN que unen di-GMP cíclico; cuando este mensajero se une al efector, cambia su estructura y genera una función de respuesta (Hengge, 2009).

Las primeras proteínas identificadas como efectoras de di-GMP cíclico fueron halladas computacionalmente: las proteínas con dominios PilZ (Schmidt, 2005). En

general, las proteínas PilZ estudiadas hasta el momento se activan al unirse con di-GMP cíclico y la mayoría de ellas funcionan a nivel post-traducciona l vía interacción proteína-proteína. Uno de los ejemplos más estudiados es el de YcgR en *E. coli*, que se une a di-GMP cíclico e interactúa con varios componentes del motor del flagelo afectando el cambio de dirección y posiblemente la velocidad (Boehm *et al.*, 2010; Fang and Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010).

El di-GMP cíclico también regula la expresión de genes mediante un grupo de efectores específicos. Un ejemplo es FleQ, que activa la expresión de los genes flagelares y reprime la transcripción de los genes responsables de la síntesis de exopolisacárido en *P. aeruginosa* (Hickman and Harwood, 2008). FleQ es una proteína con dominio AAA (con función ATPasa) que ha sido clasificado como un activador transcripcional de tipo  $\sigma^{54}$ . Cuando el di-GMP cíclico se une a FleQ, desensambla el complejo que éste forma con el ADN (Hickman and Harwood, 2008). El mecanismo por el cual el di-GMP cíclico altera el funcionamiento de FleQ aún no ha sido establecido (Sondermann *et al.*, 2012).

El di-GMP cíclico también puede regular la expresión genética mediante la unión a segmentos de ARN mensajero específicos: *riboswitches* (Lee *et al.*, 2010; Sudarsan *et al.*, 2008).

## 5. Proteínas tipo histonas y regulación génica.

Las proteínas tipo histonas tienen la capacidad de unirse al DNA y se sabe que contribuyen con la organización de un “nucleoide” bacteriano. Generalmente, se asocia a estas proteínas en procesos relacionados con replicación, recombinación y reparación del ADN y control de la transcripción (Dorman, 2003).

Hay cuatro grandes grupos de proteínas tipo histona, que fueron distinguidos sobre la base del grado de homología de su secuencia aminoacídica: HU (del inglés: *Heat Unstable*) (histona tipo *E. coli* U93), H-NS (histona tipo estructurante del nucleoide), IHF (factor de integración al huésped) y FIS (factor de estimulación de la inversión). Hay además, otras proteínas tipo histonas que no tienen homología con ninguno de los cuatro grupos anteriores (Anuchin *et al.*, 2010).

Entre las más caracterizadas se encuentran HU y H-NS. La primera no reconoce una secuencia específica al unirse al ADN, sino que suele unirse con baja afinidad a regiones de ADN con estructuras distorsionadas o superenrolladas (Dorman, 2003). En *E. coli* está formada por dos subunidades *hupA* y *hupB*, actuando como homodímero *hupA-hupA* o heterodímero *hupA-hupB*, dependiendo de la fase de crecimiento de la bacteria (Balandina *et al.*, 2001; Grove, 2011). En la mayoría de las bacterias, HU es un homodímero (Grove, 2011). La mutantes deficientes en HU en *E. coli* tienen un

fenotipo leve, mientras que HU parece ser esencial en bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis* (Grove, 2011). HU participa de la regulación de genes implicados en procesos relacionados con la virulencia (producción de exopolisacáridos, movilidad, expresión de reguladores de genes de virulencia) y con la tolerancia a distintos tipos de estrés (anaerobiosis, acidificación del medio, aumento de la osmolaridad, UV) (Balandina *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 1997; Oberto *et al.*, 2009). Con referencia a esta proteína tipo histona, no han sido publicados hasta el momento, trabajos realizados en *Xanthomonas* spp.

Las histonas del tipo H-NS se unen al ADN en regiones muy curvadas del mismo, con una o más repeticiones de una secuencia consenso de 10 pares de bases (Lang *et al.*, 2007). Pueden dimerizar a bajas concentraciones, hasta formar oligómeros (Lang *et al.*, 2007). En *Xanthomonas* spp., más específicamente en *X. oryzae* pv. *oryzae* se demostró que *xrvA* (proteína con dominio homólogo a H-NS) es un regulador positivo de la virulencia, regulando la expresión de los genes *gumB*, del clúster *rpf*, y reguladores del sistema de secreción tipo III (T3SS) (Feng *et al.*, 2009). *xrvB* es el segundo de los tres genes en el genoma de *X. oryzae* pv. *oryzae* con dominio H-NS; se observó su influencia negativa sobre la expresión del T3SS (Kametani-Ikawa *et al.*, 2011).

## **Objetivos**

El objetivo general de esta tesis fue estudiar algunas de las proteínas implicadas en la regulación transcripcional de genes que codifican factores de virulencia en *Xanthomonas* spp.; sobre todo los involucrados en la formación de estructuras tipo *biofilm*. Como objetivos específicos planteamos:

- Buscar los genes implicados en la síntesis de glucano cíclico  $\beta$ -(1,2), comprobar su participación en el proceso y determinar su papel en la virulencia de la bacteria.
- Estudiar el rol de dos reguladores transcripcionales en la síntesis de los factores de virulencia y su impacto en la formación de *biofilm*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Condiciones y medios de cultivo.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en los ensayos fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5g/l) líquido, a 37°C con agitación (200 rpm), o sólido con la adición de agar 1.6%(p/v), en placa de Petri a 37°C por 16 horas. Los antibióticos y la concentración final utilizada fueron: ampicilina (Amp) 100µg/ml, kanamicina (Km) 50µg/ml, tetraciclina (Tc) 20µg/ml, espectinomicina (Sp) 100µg/ml, gentamicina (Gm) 20µg/ml y cloranfenicol (Cm) 35µg/ml.

Los medios utilizados para el cultivo de las cepas de *Xanthomonas* spp. fueron cultivadas en medio rico PYM (glucosa 10g/l, extracto de levadura 3g/l, peptona 5g/l, maltosa 3g/l) (Cadmus et al., 1976), medio mínimo Y (MMY) (\*) y medio NYGB (peptona 5g/l, extracto de levadura 3g/l, glicerol 16ml/l) (Daniels et al., 1984), según los requerimientos de cada ensayo. Las condiciones de crecimiento fueron a 28°C con agitación (200 rpm) por 24 horas o en placas de Petri por 24 horas. Los antibióticos fueron utilizados en las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Amp) 200µg/ml, kanamicina (Km) 50µg/ml, gentamicina (Gm) 50µg/ml, espectinomicina (Sp) 100 µg/ml, tetraciclina (Tc) 5µg/ml y cloranfenicol (Cm) 35µg/ml.

El crecimiento de los cultivos líquidos bacterianos fue estimado a partir de la densidad óptica (absorbancia) a 600nm con un espectrofotómetro *Spectronic 20 Genesys* (Thermo Electron Corp.).

(\*) Preparación del medio MMY: Diluir a volumen final de 1 litro con de agua destilada: 1 ml de cada solución stock estéril, una solución de glucosa a concentración final 1% (v/v) estéril, 10ml una solución de glutamato de sodio 11% (esterilizada por filtración). Las soluciones stock son: MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10g/l, CaCl<sub>2</sub> 5H<sub>2</sub>O 22g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 22g/l y FeCl<sub>3</sub> diluido en una solución de HCl 0,1M.

## 2. Cepas y plásmidos utilizados.

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados y generados en esta tesis se listan y describen en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1.** Cepas y plásmidos utilizados en esta tesis.

Cepas	Características relevantes	Fuente
<i>Escherichia coli</i> DH5α	SupE44 Δ <i>lacU169</i> (Ψ 80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> 2073	DH5α portando pRK2073	(Better and Helinski, 1983)

<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 ( <i>Xcc</i> 306)	Cepa silvestre; Amp <sup>r</sup>	(da Silva et al., 2002)
<i>Xcc hrpM</i>	<i>Xcc</i> 306 portando inserción de Tn5 en XAC0618; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Malamud et al., 2013)
<i>Xcc ntrC</i>	<i>Xcc</i> 306 portando inserción de Tn5 en XAC3733; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Malamud et al., 2013)
<i>Xcc ndvB</i>	<i>Xcc</i> 306 portando inserción de <i>cassette</i> Ω; Amp <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc hupB</i>	<i>Xcc</i> 306 portando inserción de Tn5 en XAC1081; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Malamud et al., 2013)
<i>Xcc c-hrpM</i>	<i>Xcc hrpM</i> portando pBBR1: <i>hrpM</i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc c-ntrC</i>	<i>Xcc ntrC</i> portando pBBR1: <i>ntrC</i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc c-ndvB</i>	<i>Xcc ndvB</i> portando pBBR2: <i>ndvB</i> ; Amp <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc c-hupB</i>	<i>Xcc hupB</i> portando pLAFR3: <i>hupB</i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc</i> PA2567	<i>Xcc</i> 306 portando pLAFR6:PA2567; Amp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc</i> Wspr19	<i>Xcc</i> 306 portando pME6032; Amp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc ntrC</i> PL2567	<i>Xcc ntrC</i> portando pLAFR6:PA2567; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>Xcc ntrC</i> Wspr19	<i>Xcc ntrC</i> portando pME6032: <i>wspR19</i> ; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8004 ( <i>X. campestris</i> )	Cepa silvestre; Rf <sup>r</sup>	Dr. Max Dow
<i>X. campestris</i> <i>rpfG</i>	<i>X. campestris</i> 8004 portando mutación en el gen XC_2335;	Dr. Max Dow
<i>X. campestris</i> <i>hrpM</i>	<i>X. campestris</i> 8004 portando mutación en el gen XC_0645.	Esta tesis
<i>X. campestris</i> <i>ndvB</i>	<i>X. campestris</i> 8004 portando mutación en el gen XC_4168.	(Rigano et al., 2007)
<i>X. campestris</i> 8523	<i>X. campestris</i> 8004 <i>rpfF</i> :Tn5 <i>lac</i> Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	(Tang et al., 1991)
<i>X. campestris</i> <i>c-hrpM</i>	<i>X. campestris</i> <i>hrpM</i> portando pBBR1: <i>hrpM</i> ; Rf <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>Plásmidos</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Fuente</b>
pSac- <i>ndvB</i>	<i>ndvB</i> ::Sp <sup>r</sup> clonado en el vector suicida pJQ200 KS	(Rigano et al., 2007a)
pJQ200 KS	Vector suicida portando el gen <i>sacB</i>	(Quandt and Hynes, 1993)
pGEMT	Vector de clonado Amp <sup>r</sup>	Promega
pGEMT-easy	Vector de clonado Amp <sup>r</sup>	Promega
pBBR1-MS	Vector de clonado Cm <sup>r</sup>	(Kovach et al., 1994)
pRK2073	Plásmido <i>helper</i> para conjugar	(Better and Helinski, 1983)
pRU1319-GFP	Vector pRU1319::GFPuv	(Allaway et al., 2001)
pUC19	Vector de clonado	New England Biolabs

pLARF3	Vector de expresión en <i>Xanthomonas</i> spp.; Tc <sup>r</sup>	(Staskawicz et al., 1987)
TOPO	Plásmido de clonado; Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pLAFR6:PA2567	pLAFR6 portando el gen PA2567	(Ryan et al., 2006)
pME6032:wspR19	pME6032 portando el gen <i>wspR19</i>	(Ryan et al., 2006)

Sp<sup>r</sup> (resistente a espectinomicina); Cm<sup>r</sup> (resistente a cloranfenicol); Amp<sup>r</sup> (resistente a ampicilina); Km<sup>r</sup> (resistente a kanamicina); Tc<sup>r</sup> (resistente a tetraciclina).

### 3. Técnicas de biología molecular.

Las técnicas de biología molecular se realizaron según lo descrito en el “*Molecular Cloning: a laboratory manual*” (Sambrock et al., 1989) y los protocolos de los productos según fabricante.

#### 3.1. Extracción de ácidos nucleicos.

##### 3.1.1. Extracción de ADN genómico.

A partir de 1ml de cultivo de bacterias crecidas durante una noche, a 28°C, en medio PYM, se procedió a la extracción de DNA genómico. Para ello, se utilizó el *Wizard Genomic DNA Purification kit* (Promega).

##### 3.1.2. Extracción de ADN plasmídico.

A partir de 3ml de cultivo de bacterias crecidas durante una noche a 37°C, en medio LB, se procedió a la extracción de DNA plasmídico. Para la obtención de plásmidos de menos de 10kb totales, se utilizó el *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega). Para plásmidos de mayor tamaño se utilizó el *QIAGEN Plasmid Midi Kit*, partiéndose de cultivos de mayor volumen (100ml).

##### 3.1.3. Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó con TRIzol (Invitrogen), siguiéndose el protocolo sugerido por el fabricante.

#### 3.2. Síntesis de ADN copia.

La transcripción reversa fue realizada utilizando *random primers* y la retrotranscriptasa M-MLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.



### 3.3. qRT-PCR.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo utilizando la *mix* de reactivos *SybrGreen* (Roche) en un termociclador *Step One* (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 2 minutos a 50°C, una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C.

El ADN copia obtenido a partir de ARN de muestras de cultivos de las cepas en estudio cultivadas en fase exponencial media se usó como templado. Los *primers* utilizados en esta técnica se diseñaron a través del *software* que provee el fabricante del equipo (*Applied Biosystems*) (**Tabla II**).

El análisis de los datos se llevó a cabo por el método **delta-delta C<sub>t</sub>**, como lo indicó el fabricante del termociclador (*Applied Biosystems*). Los niveles de expresión obtenidos se normalizaron teniendo como referencia la expresión del gen del 16S ribosomal. Los datos presentados representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error equivalen a los desvíos estándar de las muestras.

**Tabla 2.2.** Primers utilizados en esta tesis.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	
BamHI- <i>hupB</i> -rv	ATGGATCCGGGAGACGCTCTACCGC	Clonado
BamHI- <i>hupB</i> -fw	ATGAATTCTCAAGCACTAACGAGGGC	Clonado
HrpMsense	TGACCAGCAGGGCGATATAG	Clonado
HrpMantisense	GCACCAACCGATCTACCTCC	Clonado
<i>ntnC</i> -compl foward	GGTACCTGGTGGCGTCGGCTTACGTC	Clonado
<i>ntnC</i> -compl reverse	GGATCC GTGCAGCAACTCGCGCCG	Clonado
<i>16s</i> foward	CTGGAAGTTCCGTGGATGTC	qRT-PCR
<i>16s</i> reverse	TGGTAGTCCACGCCCTAAACG	qRT-PCR
<i>gumB</i> foward	CAGAACGGTCACATCTCATTGC	RT-PCR
<i>gumB</i> reverse	AATCTGCGGCTGCTGAAGG	RT-PCR
<i>fliC</i> foward	CAGCTTGGTGCCGTTGAAGTTG	qRT-PCR
<i>fliC</i> reverse	TGAACGCTCAGCGGAACCTCA	qRT-PCR
<i>fliA</i> foward	CCGCATCGCCACCATCTG	qRT-PCR
<i>fliA</i> reverse	GCCCTGTTCCGGAGTCGTAGC	qRT-PCR
<i>flgM</i> foward	CGACCGACAGCGTCAAGTTG	qRT-PCR
<i>flgM</i> reverse	GCCGAGGACTGCGAAAGC	qRT-PCR
<i>rpoN2</i> forward	GAGACCGCCACCAACAAC	qRT-PCR
<i>rpoN2</i> reverse	GTCCCACATCGTGCTTTCC	qRT-PCR
<i>fleQ</i> forward	TGCTGCTGGACGAAATTG	qRT-PCR
<i>fleQ</i> reverse	ACACATTGAGGCGATAGAAC	qRT-PCR
<i>flhF</i> forward	CCAGCAATTACGACGAAGAG	qRT-PCR
<i>flhF</i> reverse	GGCAGACGGTTGAGCAG	qRT-PCR
<i>flhA</i> forward	GCTGTTGATGACCACGATGC	qRT-PCR
<i>flhA</i> reverse	TGATGACCACGAAGTTGATGATG	qRT-PCR
<i>fleN</i> foward	AAGGGCGGCGTGGGGAAAAC	qRT-PCR
<i>fleN</i> reverse	GAGGTCGGCGTCAAGCAGCAG	qRT-PCR

<i>katE</i> -forward	TCTACACCAAGGAAGGCAACTG	qRT-PCR
<i>katE</i> -reverse	AGCGAGATGAAATCCCAGAACG	qRT-PCR
XAC 0350 forward	CCGCCGACGACTACACCTATC	qRT-PCR
XAC0350 reverse	CGCCGCTTCCACCACCTG	qRT-PCR
XAC0424 forward	ACGCTGGCATCGGCACTG	qRT-PCR
XAC0424 reverse	TGTTGTTGCTGCATCTTGG	qRT-PCR
XAC1486 forward	GCCGCCTTGTTGTTCTTGCC	qRT-PCR
XAC1486 reverse	AGCGTCACCAGCGTCACC	qRT-PCR
XAC1795 forward	GCTGGACCCGACGACCCTTC	qRT-PCR
XAC1795 reverse	TGAACGCCTTGAGACCTTGG	qRT-PCR
XAC0614 forward	CTGGCATCGTGGACATCG	qRT-PCR
XAC0614 reverse	CAGCAGCAGCACCTCGTC	qRT-PCR
XAC0593 forward	AAGCCCTGCCGTTGATGC	qRT-PCR
XAC0593 reverse	CGTCCAGACCCTCAGCCTTC	qRT-PCR
XAC2493 forward	GCTTGTGAGCGATGCGATTG	qRT-PCR
XAC2493 reverse	GCGTCCTCCACCGTCCAC	qRT-PCR
XAC1877 forward	GGATGCCTGGACGATGGATG	qRT-PCR
XAC1877 reverse	ATGCGGTAGAGAACTGGTTGC	qRT-PCR
XAC1940 forward	TGCCCTTCATCTGCGTCAC	qRT-PCR
XAC1940 reverse	CGTCCCACAACAGCCCTTCC	qRT-PCR
XAC1993 forward	GGATCGTCGTGAGGGCTTGC	qRT-PCR
XAC1993 reverse	CGGTCAGGCGGTGTAATGG	qRT-PCR
XAC1184 forward	CGATCAACTTCATGCCCAACGC	qRT-PCR
XAC1184 reverse	AGATGTTCTGCTCGCTGACTTC	qRT-PCR
XAC0350 F2	AATGTCGGTGCTCCGGCATCC	Clonado
XAC0350 R	AAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGGGGCA GCCAGAGCCCAGAGC	Clonado

### 3.4. Generación de las cepas utilizadas en esta tesis.

#### 3.4.1. Construcción de las cepas mutadas.

##### 3.4.1.1. Construcción de la mutante *Xcc ndvB*.

La mutante de pérdida de función del gen XAC4195 de *Xcc* 306 se realizó interrumpiéndose el mismo con la inserción de un *cassette* de resistencia al antibiótico espectinomicina. Se utilizó el constructo que se usó en el laboratorio para mutar el gen XC\_4168 de *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (Rigano et al., 2007a) (*ndvB*::Sp<sup>r</sup> clonado en el vector suicida pJQ200 KS), dada la similitud significativa entre las secuencias de ambos genes.

La construcción se introdujo en *Xcc* 306 por electroporación. Se seleccionaron las colonias resistentes a espectinomicina. Posteriormente, se seleccionaron las dobles recombinantes en medio PYM agar con espectinomicina y sacarosa 5%.

La mutación del gen *ndvB* fue confirmada por PCR y secuenciación.

##### 3.4.1.2. Construcción de la mutante *X.campestris hrpM*.

La mutante por pérdida de función en el gen XC\_0645 se realizó interrumpiéndose el mismo con la inserción de un *cassette* de resistencia al antibiótico espectinomicina. Un fragmento del gen XC\_0645 de 1441 pares de bases se amplificó por PCR utilizando los plásmidos HrpMSense y HrpMantisense (**Tabla 2.2.**) y ADN genómico de *X. campestris* pv. *campestris* 8004 como templado. El amplicón resultante se clonó en el vector pGEMT (Promega). Posteriormente, esta construcción se digirió con Sall y se ligó al vector pUC19 (New England Biolabs) también digerido con la misma enzima.

El *cassette* de 2000 pares de bases que confiere resistencia a espectinomicina fue obtenido de pHP45Ω (Fellay et al., 1989) a partir de la digestión con la enzima NotI.

La construcción pUC19:*hrpM* fue digerido con NotI y como resultado el vector se linealizó y se escindió a 873 pares de bases río abajo del codón de inicio de la transcripción. A este vector se ligó el *cassette* de espectinomicina digerido también con NotI. Finalmente, *hrpM*::Sp<sup>R</sup> fue liberado con la enzima SacI y clonado en el vector pJQ200 KS (Quandt and Hynes, 1993).

La construcción resultante fue introducida por electroporación en *X. campestris* 8004. En primera instancia, se seleccionaron las bacterias con resistencia a espectinomicina. Posteriormente, se seleccionaron las dobles recombinantes en medio PYM agar con espectinomicina y sacarosa 5%.

La mutación del gen *hrpM* fue confirmada por PCR y secuenciación.

### 3.4.2. Construcción de las cepas complementadas.

#### 3.4.2.1. Complementación de la mutante *Xcc hrpM*.

Un fragmento de ADN de 2500 pares de bases conteniendo el marco de lectura de XAC0618 y 560 pares de bases río arriba de codón de inicio de la transcripción fue amplificado por PCR utilizando los *primers* HrpM-comp forward y HrpM-comp reverse (**Tabla 2.2.**) y ADN genómico de *Xcc* 306 como templado. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEMT-easy (Promega) y digerido con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Luego, fue ligado al plásmido pBBR1-MSC (Kovach et al., 1994) que previamente sufrió una digestión parcial. La construcción resultante fue utilizada para transformar la mutante *Xcc hrpM* a través del método de electroporación, como lo descrito previamente por Malamud (2011).

#### 3.4.2.2. Complementación de la mutante *Xcc ndvB*.

La cepa *Xcc ndvB* se complementó con la introducción del plásmido pBBR2-*ndvB* (Rigano et al., 2007) mediante el método de electroporación descrito por Malamud (2011).

#### 3.4.2.3. Complementación de la mutante *X. campestris hrpM*.

La complementación de *X. campestris hrpM* se logró con la introducción del plásmido pBBR1-*hrpM* (**Tabla 2.1.**) mediante el método de electroporación descrito por Malamud (2011).

#### 3.4.2.4. Complementación de la mutante *Xcc ntrC*.

Para complementar esta mutante, un fragmento de ADN de 1702 pares de bases conteniendo el gen XAC3733 y su región promotora (350 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción, fue amplificado por PCR utilizando los *primers* *ntrC*-comp forward y *ntrC*-compl reverse (**Tabla 2.2.**) y ADN genómico de *Xcc* 306 como templado. El producto de la PCR fue clonado en el vector pGEMT-easy (Promega) y posteriormente digerido con las enzimas de restricción BamHI y KpnI. Este fragmento se ligó al plásmido pBBR1-MCS (Kovach et al., 1994). La construcción resultante fue utilizada para transformar la mutante *Xcc ntrC* a través del método de electroporación, como lo descrito previamente por Malamud (2011).

#### 3.4.2.5. Complementación de la mutante *Xcc hupB*.

La mutante *hupB* se complementó por introducción del plásmido pLAFR3 (Staskawicz et al., 1987) portando una copia del gen endógeno XAC1081 bajo la acción de su propia región promotora.

Se amplificó por PCR el gen XAC1081 más su región promotor, utilizando los *primers* BamHI-*hupB*-rv y EcoRI-*hupB*-fw (**Tabla 2.2.**). El amplicón resultante, de unas 539pb, fue clonado en el vector pGEMT-easy. Luego, esta construcción fue digerida con EcoRI. El fragmente liberado fue clonado en el vector pLAFR3 previamente digerido con la misma enzima. La construcción resultante fue utilizada para para transformar la mutante *Xcc hupB* a través del método de electroporación, como lo descrito previamente por Malamud (2011).

#### 3.4.3. Expresión del dominio HD-GYP de XAC0305 en la mutante *X. campestris rpfG*.

A través de una reacción de PCR se amplificó el fragmento de ADN que codifica para el dominio HD-GYP del gen XAC0305 usando como templado ADN genómico de *Xcc* 306 y los *primers* XAC0305F2 y XAC0305R (**Tabla 2.2.**). El fragmento fue clonado en el vector TOPO (Invitrogen), liberándose luego con las enzimas EcoRI y HindIII y finalmente ligándose a pLARF3 (Staskawicz et al., 1987). El pLARF3 fue previamente digerido con las mismas enzimas que el fragmento de manera que se consiguió que el fragmento quedara bajo el control del promotor *lac* del vector. El constructo fue introducido en *X. campestris rpfG* a través de una conjugación triparental usando el plásmido “*helper*” pRK2073 (Better and Helinski, 1983).

#### 4. Herramientas bioinformáticas.

La información relativa a secuencias genómicas y proteicas fue obtenida de la base de datos KEGG *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa, 2000).

Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa *ClustalW2* (Larkin et al., 2007), disponible de forma gratuita en la versión online del *European Bioinformatics Institute* (EBI; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2> ).

Las proteínas fueron analizadas utilizando: Pfam 23.0 (Finn et al., 2008) en <http://pfam.janelia.org/> ; TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001), en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> ; SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*, <http://smart.embl-heidelberg.de/> ) y *Phobius* (Kall et al., 2004) en <http://phobius.sbc.su.se/>.

Para el análisis de la ubicación de los promotores se utilizó el *software online* BPROM

(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) (Solovyev and Salamov, 2011).

El análisis de promotores dependientes de FlIA fue realizado con el software RSAT (<http://rsat.scmbb.ulb.ac.be/rsat/>) con las matrices provistas en Yang et al. (2009).

## 5. Estudio de hidratos de carbono.

### 5.1. Extracción de azúcares totales y purificación de glucanos.

El protocolo utilizado fue una adaptación del publicado por Talaga y colaboradores (1996). Las bacterias se cultivaron durante 48 horas en medio PYM, a 28°C con agitación. Los cultivos fueron centrifugados por 15 minutos a 8000xg. Los pellets obtenidos fueron lavados con un buffer 30mM Tris-HCl pH8. Posteriormente, esos pellets se resuspendieron en una solución de ácido tricloroacético (TCA) 5% y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego del período de incubación, para extraer los azúcares totales, los extractos se centrifugaron durante 1 hora a 10000xg. El sobrenadante obtenido se neutralizó con hidróxido de amonio y fue liofilizado.

Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 300µl de ácido acético 5% para luego ser sometido al pasaje por una columna Biogel P-4 (Bio-Rad), también equilibrada con el ácido.

Los distintos picos de exclusión obtenidos de la columna se sometieron a una reacción de antrona-ácido sulfúrico para detectar la presencia de azúcares. La fracción correspondiente a los glucanos cíclicos se purificó y cuantificó.

Para obtener las muestras sometidas a cromatografía en capa delgada, para la identificación de aquellas productoras de glucanos cíclicos, la extracción se realizó con etanol siguiendo un protocolo similar al descrito por Briones y colaboradores (2001). Las bacterias crecieron durante 24 horas a 28°C, en medio PYM. Tres mililitros de cultivo fueron cosechados y centrifugados durante 10 minutos a 8000xg. La extracción se realizó de los pellets con etanol 70%, incubándolos durante 1 hora a 37°C. Se centrifugaron los extractos etanólicos por 10 minutos a 10000xg y los sobrenadantes se llevaron a sequedad en vacío. Luego, se resuspendieron las muestras en 10µl de etanol 70% y se utilizaron para sembrar en las placas de sílica.

### 5.2. Cromatografías.

### 5.2.1. Cromatografía en capa delgada.

Se utilizaron placas de Sílica Gel 60 (MERCK). Estas se sembraron y las muestras fueron desarrolladas tres veces siendo la fase móvil una mezcla de solventes: butanol/etanol/agua (5:5:4). Las placas se revelaron con ácido sulfúrico 5% en etanol con el posterior tratamiento de calor (160°C) durante 5 minutos.

### 5.2.2. Filtración por gel.

Las muestras extraídas con TCA 5% fueron sometidas a una cromatografía por exclusión molecular. Para ello, fueron utilizadas matrices Bio-Gel P-4, de partícula fina (BioRad) en una columna de 50cm de altura por 1cm de diámetro, que fue previamente equilibrada con ácido acético 5%. El volumen muerto y el volumen de exclusión total fueron determinados mediante el uso de soluciones marcadoras: azul de dextrano y cloruro de cobalto 200µM, respectivamente. El flujo de la columna fue ajustado a 20ml/hora, colectándose fracciones de 0,75ml. Estas fracciones se colectaron para su posterior lectura.

### 5.3. Cuantificación de hidratos de carbono.

La cuantificación de hidratos de carbonos presentes en las muestras eluidas de la Bio-Gel fue realizada utilizando el método del reactivo de antrona (Loewus, 1952). El reactivo de antrona fue preparado disolviendo 0,4g de antrona (Sigma) en acetato de etilo concentrado. De cada una de las fracciones obtenidas de la columna, se tomaron 200µl de muestra a los que se le agregaron 50µl del reactivo de antrona y 500µl de ácido sulfúrico concentrado. Luego de 10 minutos, se determinó la absorbancia a 620nm de 100µl de las reacciones.

### 5.4. Determinación de la producción del xantano.

#### 5.4.1. Producción de xantano en placa.

Las estimaciones de la producción de xantano en placa se realizaron en placas de medio NYGB agar suplementado con glucosa 2% (p/v). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 48hs.

#### 5.4.2. Extracción etanólica de xantano.



Las cepas en estudios fueron cultivadas en 100ml de medio PYM líquido en frascos tipo Erlenmeyer de 500ml, a 200rpm, durante 24hs. Los cultivos fueron centrifugados a 10000xg durante 1h y los sobrenadantes recuperados. A estos últimos se les agregó KCl hasta concentración final 1% (p/v) y 2 volúmenes de etanol. El precipitado resultante fue colectado, liofilizado y pesado. Los pellets de bacterias fueron liofilizados y pesados.

## 6. Estudio de *Biofilm*.

### 6.1. Estudio de adhesión a sustrato abiótico.

La técnica utilizada para determinación la adhesión de las distintas cepas en estudio a una superficie abiótica fue la de cristal violeta (O'Toole and Kolter, 1998b). Las cepas bacterianas se cultivaron durante la noche en medio rico PYM. Alícuotas de estos cultivos se usaron como inóculo para diluciones en medio MMY ajustadas a  $DO_{600}$  de 0,1. De estas últimas diluciones, se tomaron 150 $\mu$ l y se colocaron en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Orange). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas, sin agitación.

Previamente a realizar el ensayo de adhesión, la  $DO_{600}$  de cada pocillo fue determinada. El medio de cultivo se removió suavemente con la micropipeta, de manera de no tocar la placa. Los pocillos se lavaron 2 veces con una solución de cloruro de sodio 0,9% (p/v) y seguidamente, se incubó la placa durante 30 minutos con cristal violeta 0,1% (p/v). Se retiró el cristal violeta y los pocillos se lavaron 2 veces con agua destilada. El cristal violeta unido de cada pocillo se disolvió en 150 $\mu$ l de etanol 70% (v/v). Se midió con un lector de microplacas, la absorbancia a 570nm de cada pocillo. Se determinó la adhesión de cada cepa como la relación entre la absorbancia a 570nm y la  $DO_{600}$ .

### 6.2 Estudio de *biofilm* por microscopía confocal.

El protocolo utilizado fue previamente descrito por Malamud y colaboradores (2011). Las cepas fueron cultivadas en medio PYM complementado con el antibiótico adecuado a 28°C. Estos cultivos se diluyeron 1:1000 en medio MMY y alícuotas de 500 $\mu$ l se transfirieron a cámaras especiales de vidrio borosilicato (no. 155411; *Lab-Tek*, Nunc). Estas cámaras se incubaron a 28°C durante 4 días hasta que fueron visualizadas. Las cepas que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) fueron visualizadas directamente, sin tinción previa. Las cepas que no expresaban GFP debieron ser teñidas con *BacLight LIVE/DEAD viability kit* (Invitrogen). Éste último consta de dos

colorantes fluorescentes: *Syto-9t* (S-9) y yoduro de propidio (PI). El primero, tiñe las bacterias vivas mientras que el segundo las muertas. La formación de *biofilm* se observó con el microscopio confocal de barrido láser Nikon Eclipse TE 2000-E2 (Nikon). Las imágenes tridimensionales fueron generadas mediante el software *Image J* 1.49 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). El análisis con el software COMSTAT para determinar biomasa y demás características del *biofilm*, se realizó tal se describe en (Heydorn et al., 2000).

## 7. Ensayos de movilidad.

### 7.1. Quimiotaxis.

Con el fin de evaluar la capacidad de realizar quimiotaxis de las cepas de *Xcc*, nosotros estimamos su migración hacia un gradiente químico generado por extractos acuosos de hojas de pomelo.

A fin de realizar los extractos tomamos 20g de hojas frescas de pomelo lavadas tres veces con agua destilada. Estos 20g fueron homogenizados en 40ml de agua destilada. Este homogenato se sometió a 60°C para luego ser esterilizado con un filtro de 0,2µm.

La quimiotaxis se testeó siguiendo el protocolo descrito por de Weert y colaboradores (2002). En resumen, las cepas de *Xcc* se crecieron en medio rico y se cosecharon cuando alcanzaron su fase de crecimiento logarítmica. Se lavaron dos veces con medio mínimo mínimo MMY y los pellets se resuspendieron en 12ml de este medio a una DO<sub>600</sub> final de 0,6. La DO<sub>600</sub> se ajustó a 0,4 mediante el agregado de una solución 1% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulosa (Hipromelosa) (Sigma-Aldrich). La solución resultante se colocó en placas de Petri de 6cm de diámetro de manera de formar una capa pareja. Inmediatamente, se colocan 10µl de extracto acuoso de hojas de pomelo en el centro de la cada placa. Pasado un período de 30 minutos a 1 hora, se analizó la aparición de un halo de turbidez formado alrededor del extracto en cada una de las placas. Esta formación del halo turbio fue considerada como una respuesta quimiotáctica positiva (de Weert et al., 2002). Cada cepa fue testeada por triplicado y cada ensayo se repitió un mínimo de tres veces.

### 7.2. *Swimming*

El *swimming* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Malamud y colaboradores (2011). Las bacterias crecieron durante una noche en medio PYM. Se estimó la DO<sub>600</sub> y ésta se normalizó en las cepas a comparar. Luego, estos cultivos de DO<sub>600</sub> normalizada fueron utilizados para inocular placas de medio NYGB 0.25% agar

(p/v). Tres microlitros de cultivo se colocaron en el centro de las placas. Pasadas las 72 horas de incubación a 28°C, se analizó el halo de crecimiento de las bacterias en cada placa. Los ensayos fueron realizados por triplicado, repitiéndose un mínimo de tres veces.

#### 8. Ensayo de determinación de actividad de las enzimas extracelulares.

La determinación de la actividad de las enzimas extracelulares fue realizada a partir de sobrenadantes obtenidos de cultivos crecidos en medio PYM hasta una  $DO_{600}$  aproximada de 1.5-2. Para ello, se normalizaron las  $DO_{600}$  de los cultivos de las cepas a comparar y fueron tomados 1,5ml de cada uno. Se centrifugó la alícuota a 8000xg durante 10 minutos y se separó el sobrenadante de cada muestra. Veinte microlitros de esto último se utilizaron para la determinación.

##### 8.1. Endoglucanasa.

Los sobrenadantes fueron sembrados en pocillos de 0,5cm de diámetro en placas con 20ml de una solución de carboximetilcelulosa (CMC, Sigma-Aldrich) -0,125% (p/v) CMC, 50mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , pH 6,0- agar 1,6 % (p/v). Luego de 24-48 horas de incubación a 28°C las placas fueron coloreadas con una Rojo Congo 1% (p/v) durante 30 minutos, lavadas con agua destilada y desteñidas mediante 3 lavados con una solución 1M NaCl. Se estimó la actividad endoglucanasa mediante la medición del diámetro de los halos de degradación de la CMC, alrededor de los pocillos de siembra de los sobrenadantes.

##### 8.2. Amilasa.

Se colocó el sobrenadante de cada cepa en un pocillo de 0,5cm de diámetro en placas con 20ml de almidón (Sigma-Aldrich) 1% (p/v) agar 1,6% (p/v). Las placas se incubaron 24-48 horas a 28°C y luego de la incubación, se trataron con una solución de Yodo. La actividad amilasa se estimó mediante la determinación del diámetro halo de degradación generado alrededor de los pocillos de siembra de los sobrenadantes en estudio. Los halos de degradación fueron reconocibles gracias a que éstos no tiñen con Yodo.

##### 8.3. Proteasa.

Se colocó el sobrenadante de cada cepa en un pocillo de 0,5cm de diámetro en placas con 20ml de leche descremada 1% (p/v) agar 1,6% (p/v). Las placas se incubaron 24-48 horas a 28°C. La actividad proteasa se estimó mediante la determinación del área halo de degradación generado alrededor de los pocillos de siembra de los sobrenadantes en estudio.

#### 9. Ensayo de determinación de producción de DSF.

El DSF fue extraído de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria en medio rico PYM (Barber et al., 1997). Los extractos de acetato de etilo fueron evaporados a sequedad y resuspendidos en metanol puro. La mutante *X. campestris rpfF* (8523), incapaz de producir DSF y como consecuencia no tiene actividad endoglucanasa, fue inoculada en medio NYGB con los extractos y cultivada durante toda una noche. Se estimó la actividad de estos cultivos, siguiendo el protocolo descrito en el punto 8.1 de esta sección.

#### 10. Estudio de lipopolisacárido (LPS): extracción y análisis.

##### 10.1. Extracción de LPS.

El protocolo de extracción fue adaptado de (Li and Wang, 2011). Las cepas fueron crecidas durante una noche en medio PYM a 28°C. Cinco mililitros de cultivo de cada cepa fueron centrifugados a 5000xg. El sobrenadante fue descartado mientras que el pellet obtenido para cada cepa se resuspendió en 1ml de buffer TNE (10mM Tris pH8, 10mM NaCl, 10mM EDTA). Luego, las suspensiones volvieron a centrifugarse a 5000xg. Las células se resuspendieron en 540µl de buffer TNEX (buffer TNE, Tritón X-100 1%). Las soluciones obtenidas se trataron con 60µl de lisozima (5mg/ml) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se agregaron 30µl de Proteinasa K (20mg/ml) y se incubó por 2 horas a 65°C. El último paso de extracción se realizó con fenol y se separó la fase acuosa conteniendo el LPS.

##### 10.2. Análisis del LPS.

El LPS obtenido de cada una de las cepas en estudio fue analizado en un gel de poliacrilamida 15% (v/v). La visualización del gel se logró mediante la tinción con nitrato de plata 20% (p/v), siguiendo el protocolo descrito por (Tsai and Frasch, 1982).

## 11. Ensayo de tolerancia a tratamiento con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Las diferentes cepas fueron crecidas en medio PYM durante 16 horas. Se estimó la DO<sub>600</sub> de los cultivos y se normalizó. Se tomaron 100µl de cada cultivo y, con un hisopo estéril, se sembró la alícuota de cada cultivo en una placa PYM agar (sin antibióticos). Posteriormente, se colocó un disco de papel absorbente *Whatman* estéril en el centro de cada placa, embebido en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100mM. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24-48hs. Se estimó el área de inhibición de crecimiento de cada cepa con el *software* ImageJ 1.49. 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 de tres experimentos independientes.

## 12. Observación de la estructura flagelar.

### 12.1. Tinción del flagelo y observación mediante microscopía óptica.

La tinción de la estructura flagelar y su posterior observación, se basaron en el protocolo descrito por Kodaka y colaboradores (1982). Se tomó una colonia fresca de una placa de medio PYM agar, se disolvió en una gota de agua destilada, se colocó sobre un portaobjetos y se secó al aire. A esta preparación se la tiñó con 10ml de una solución de tinción. Esta última se preparó mezclando diez partes de la solución "mordiente" -2g de ácido tánico, 10ml de fenol 5%(p/v), 10ml de una solución acuosa saturada de AlK<sub>8</sub>S<sub>2</sub>12H<sub>2</sub>O- con una parte de una solución de cristal violeta -cristal violeta en etanol 12% (p/v)-. El microscopio óptico utilizado fue un Nikon ECLIPSE E600. Las imágenes se tomaron con un aumento de 1000X.

### 12.2. Tinción del flagelo y observación mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Las bacterias en estudio crecieron en medio líquido PYM sin la adición de glucosa. Las muestras se prepararon colocando una gota de la suspensión de cultivo de cada cepa en una grilla de cobre (400 *mesh*) cubierta por colodion durante 5 minutos. Posteriormente, se quitó el excedente apoyando la grilla sobre un papel de filtro. Las bacterias adheridas a la rejilla fueron contrastadas con ácido fosfotúngstico al 2% (p/v) durante 40 segundos. Finalmente, las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA)

del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

### 13. Observación de la membrana plasmática por MET.

La observación de la membrana plasmática se realizó sobre cortes ultrafinos. Para la obtención de los mismos, pellets de las distintas cepas fueron fijados con glutaraldehído al 2% en *buffer* fosfato, posfijados en tetróxido de osmio al 1%, deshidratados en escala creciente de alcoholes e incluidos en resinas sintéticas (Epon 812, SPI-Pon). Los bloques de resina obtenidos son sometidos a la acción de un micrótopo. Los cortes ultrafinos resultantes de ultramicrotomía son montados sobre grillas de 3 mm de diámetro, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (Jurado, 2005). Los microcortes fueron analizados por MET, utilizándose el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109T equipado con cámara digital Gatan ES1000W, del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica, del Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof. E. De Robertis, UBA-CONICET.

### 14. Determinación de la concentración de di-GMP cíclico.

La cuantificación de di-GMP cíclico fue realizada según una adaptación de lo previamente descrito por Ryan y colaboradores (2009), partiéndose de cultivos líquidos de las distintas cepas en estudio, en el medio MMY a una  $DO_{600}$  de 0,8.

Se cultivaron las distintas cepas en estudio en medio 40ml de MMY durante 16 horas. Estos cultivos se centrifugaron y los *pellets* se lavaron con agua destilada fría, dos veces. Estos *pellets* se resuspendieron en 300µl en una solución de acetonitrilo:metanol:agua (4:4:2) frío; fueron incubados durante 15 minutos a 4°C para luego someterlos a un tratamiento de alta temperatura: 10 minutos a 95°C. El preparado se deja enfriar para posteriormente centrifugarlo a 20000xg durante 5 minutos. Se repitió dos veces la incubación a 4°C por 15 minutos de los *pellets* con 200 µl la mezcla de solventes y la centrifugación a 20000xg por 5 minutos. Se recolectan los tres sobrenadantes obtenidos en un tubo limpio.

Las muestras fueron sometidas a una cromatografía líquida de alta resolución en un equipo Agilent 1200. La columna empleada fue una C18 (250mm x 4,6 mm x 5µm), sometida a 30°C. Los solventes utilizados fueron acetato de amonio 50mM (pH4) y metanol concentrado. El flujo de corrida fue 0,6ml/minuto. El método de corrida fue: de 0 a 5 minutos, 100% acetato de amonio; de 5 a 9 minutos, de 100 a 70% de acetato de amonio; de 9 a 13 minutos, de 70 a 100% de acetato de amonio; y finalmente, de

13 a 15 minutos a 100% de acetato de amonio. Los controles internos fueron di-GMP cíclico y GTP.

La cuantificación del di-GMP cíclico se realizó en relación a una curva realizada con diferentes concentraciones del patrón. Posteriormente, la masa obtenida se relativizó a la masa celular de la muestra. El experimento fue realizado por triplicado.

15. Plantas utilizadas, mantenimiento las mismas e infecciones.

#### 15.1. Cítricos

El cultivares de limón y pomelo utilizados como plantas huésped de las cepas de *Xcc* fueron *Citrus limon* cv. Eureka y *C. paradisi* cv. Macfadyen, respectivamente. Es las plantas se mantuvieron en una habitación a rango de temperatura (26°C-30°C) y humedad controlados, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

A fin de preparar las bacterias para la infección, las cepas se crecieron en medio rico suplementado con el antibiótico correspondiente, durante una noche. Luego, alícuotas de estos cultivos, centrifugadas y los *pellets*, diluidos en agua estéril a una concentración de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Estas suspensiones fueron infiltradas en hojas jóvenes o hisopadas en hojas jóvenes previamente sanas o previamente heridas. Los síntomas fueron observados a los 15 días post infección (dpi) en el primero de los casos y a los 30 dpi, en el segundo caso.

El crecimiento bacteriano *in planta* fue cuantificado como previamente lo describe Malamud y colaboradores (2011). Suspensiones de bacterias preparadas de modo similar a lo anteriormente descrito pero con una concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ml, fueron hisopadas en hojas jóvenes de limón previamente heridas con una aguja. Se tomaron muestras de cada cepa utilizada para infectar a los distintos tiempos (dependiendo del experimento). La cuantificación se realizó sobre poblaciones presentes en un macerado de un disco de hoja infectada de  $1 \text{cm}^2$  en 0,5ml de agua estéril. Este macerado sometido a diluciones seriadas y sembrado en placas de medio PYM suplementadas con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron a 28°C y las colonias presentes en cada una se contaron luego de 48-72 horas.

#### 15.2. *Nicotiana benthamiana*

Para obtener las plántulas, las semillas de *N. benthamiana* fueron sembradas en placas agar 0,8% en agua y expuestas a luz continua hasta obtener brotes de dos hojas. Estas plántulas fueron trasplantadas a sustrato vermiculita-perlita 3:1, crecidas en

invernáculo a 23°C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Se seleccionaron organismos de ocho semanas para los ensayos.

La infección de esta especie se realizó por infiltración con jeringa sin aguja (Rigano et al., 2007a). Los cultivos de las distintas cepas de *X. campestris* se crecieron durante 24 horas. Estos cultivos se centrifugaron y el pellet se resuspendió en una solución de 10mM MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Los síntomas se observaron a los 5dpi.

#### 16. Ensayo de reapertura estomática.

Plantas de *Vicia faba* fueron cultivadas en tierra en una cámara de cultivo a 22-23°C de temperatura con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Para los ensayos, se extrajeron epidermis de hojas de plantas de 2 a 4 semanas de desarrollo. Esas epidermis fueron incubadas en buffer 10:10 (10mM MES-KOH, pH 6,15) por dos horas en las mismas condiciones de intensidad lumínica que las plantas ( $90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Luego, estas epidermis fueron incubadas con ABA (control) y las suspensiones bacterianas ( $10^8$  UFC/ml en MgCl<sub>2</sub>). Las observaciones se realizaron pasadas 1 y 3 horas de la incubación con las suspensiones bacterianas. Se analizaron 40 estomas de cada una de 3 hojas. Para ello, las epidermis fueron colocadas en un portaobjeto y medidas con un microscopio *Carl Zeiss* (400X) con la ayuda de un micrómetro.



RESULTADOS

# CAPÍTULO I

## **Síntesis de glucano cíclico $\beta$ -(1,2) e importancia de los mismos en la patogénesis de la bacteria.**

### 1. Identificación de las proteínas involucradas en la síntesis de glucanos cíclicos $\beta$ -(1,2).

Como primer paso en la búsqueda de posibles genes candidatos que codifiquen proteínas con actividad glucano sintetasas, se utilizaron secuencias obtenidas de la base de datos KEGG -por sus siglas en inglés: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa, 2000)-. Posteriormente, los alineamientos de las secuencias se realizaron con el software ClustalX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) con el fin de estimar el grado de conservación entre ellas. El análisis para la identificación de los dominios conservados se realizó mediante la búsqueda en una base de datos de familias de proteínas, Pfam -por sus siglas en inglés: Protein Family Database (Finn *et al.*, 2003)- y el software de reconocimiento de dominios SMART -por sus siglas en inglés: *Simple Modular Architecture Research Tool* (Letunic *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 1998). La secuenciación del genoma de esta bacteria (da Silva *et al.*, 2002) fue de gran ayuda a la hora de iniciar la búsqueda de los posibles genes implicados en este proceso.

A partir de la exploración realizada, se hallaron dos genes cuyos productos fueron candidatos de estar parcialmente involucrados en la síntesis del glucano cíclico en *Xcc*, anotados como: *hrpM* y *ndvB protein*.

El gen *hrpM* (XAC0618) codifica para una proteína de 645 aminoácidos que presenta seis dominios transmembranas y un dominio glucosiltransferasa (Fig. 2.1A). La designación de los seis dominios transmembranas surgen como resultado obtenido luego del análisis de las secuencias con el *software* SMART. Sin embargo, cuando se utilizan otros *softwares* específicos para la detección de dominios transmembrana, como el TMHMM2 (Krogh *et al.*, 2001), éstos resultan ser siete (al igual que la homóloga en *X. campestris*). La proteína homóloga en *E. coli* (b1049); se encuentra en la membrana interna y su actividad glucosiltransferasa ha sido demostrada (Lacroix *et al.*, 1991). HrpM de *Xcc* 306 fue alineada con proteínas homólogas presentes en bacterias del mismo género, *X. campestris* (XC\_0645), *X. vesicatoria* (XCV0675) y *X. oryzae* (XOO4011), y con bacterias fitopatógenas de géneros emparentados como *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (PSPTO\_5161). Otros de los genes presentes en el alineamiento fue el correspondiente al que codifica para HrpM en *R. solanacearum* (rsc2909), bacteria que produce glucanos cíclicos de la misma familia que *Xcc* 306 (ver sección Introducción 2.5.2).

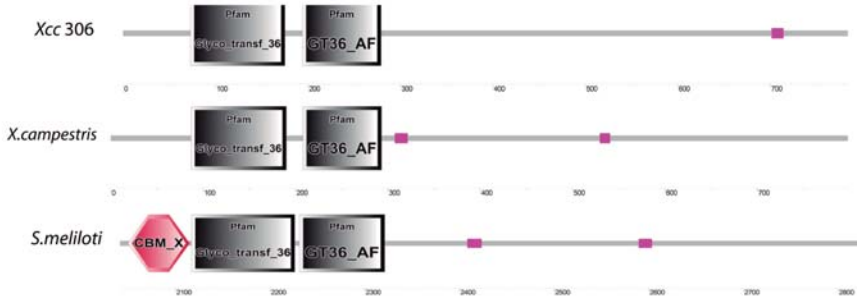
A partir de alineamientos de secuencias podemos decir que hay un alto porcentaje de similitud entre la secuencia de la proteína HrpM de *Xcc* y las de las homólogas dentro del mismo género (más del 95%). La similitud de la misma es más baja cuando

se las compara con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *E. coli* (alrededor del 40%); estas especies son productoras de glucanos lineales. En el caso de *R. solanacearum*, que produce un glucano cíclico cuya única diferencia con el de *Xcc* es el número de glucosas (13 en lugar de 16); su secuencia guarda más semejanza con las de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *E. coli* que con las de *Xanthomonas* spp. (Fig. 2.1.B).

El otro gen candidato es XAC4195, anotado como *ndvB protein*, codifica para una proteína de 784 aminoácidos, que posee dos dominios glucosiltransferasa; uno de ellos está descrito como específico para enlaces  $\beta$ -(1,2) (Fig. 2.2.A). A través del software *Phobius*, que permite predecir la topología transmembrana y los péptidos señal de la secuencia de aminoácidos de una proteína (Kall, Krogh, and Sonnhammer, 2004), determinamos con una alta probabilidad, que la NdvB protein de *Xcc* se localiza en el periplasma de la bacteria.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se comprobó que la *ndvB protein* de *X. campestris* (XC\_4168) está involucrada en la síntesis de glucano cíclico (ver sección Introducción). Esta última guarda casi un 90% de similitud con la secuencia aminoacídica de su homóloga en *Xcc*. Ambas son similares al extremo carboxi-terminal de la NdvB de *S. meliloti* (Castro *et al.*, 1996). En la figura 2.2.B se muestran los alineamientos entre las NdvB protein de *Xcc* y de *X. campestris* con el extremo carboxil-terminal de la NdvB de *S. meliloti* (SMc04382). Este rizobio produce un glucano cíclico de 17-40 glucosas con enlaces  $\beta$ -1,2 (Breedveld and Miller, 1994). Esta enzima además, consta de un dominio característico de enzimas que tienen a carbohidratos como sustratos: CBM\_X (*carbohydrate binding domain*).



**A****B**

```

.....10 .....20 .....30 .....40 .....50 .....60 .....70 .....80 .....90 .....100
XAC4195 -----MAPSAD GARYALYSPT AMPNASGFLW NRRMMVQLTC RGYATGQFMQ PEPSKYAHAP MLEARNFMMP EQPYAHHPG RFFYLKDEDT
XC_4168  MSAASAPADD LATLMASAD GMRYALYSPT AMPTAGGFLW NRRMMVQLTC RGYATAQFMQ FEPAKYAHAP LLEARNFMMP EQPYAHHPG RFFYLKDEDT
SMc04382 --LDGGDLDF WNGFGGFAED GREYAVLRG GEATPQPWIN -----VI SNEQFGFHV S AEGA AFSWSR NSRDYQLTPW TNDAVVNRPG EAIFVDMAS
Clustal Co  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....110 .....120 .....130 .....140 .....150 .....160 .....170 .....180 .....190 .....200
XAC4195 GALYVSPHEP VRAQPQAFEF SAGKHDVRWR VRHDDIVVEL CVSLPTDDAV ELWECRVHNG SGRTRRLSLY AYFPVGYMSW MHQSGGYEPA LGGIVCRSVA
XC_4168  GALYVSPHEP VRAPAEFEP SAGKHDVRWR VRHGDVVVEL CVSLPTDDAV ELWECRVHNG SGRTRRLSLY PYFPYGYMSW MHQSGGYEPA LGGIVCRSVA
SMc04382 GAVLTPYAAL SRRKSALEFET RHGLGYSRFL STQDELEIEIA MHTVHRTLPA KLVRLTIRNR SSAARKLRVY GYAEVWLGNN RSRTAFPVLS EMDESAKTLV
Clustal Co  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....210 .....220 .....230 .....240 .....250 .....260 .....270 .....280 .....290 .....300
XAC4195 PYQKVDYDFR QRDFKDCFTFL LHEQTPVAVD AQQMAFEGEG G--LHAPSAV QAEQLGNHDA HYETPAALQ YRLTLDADA SVYRFAGPFA KDAEIAALR
XC_4168  PYQKVDYDFR QRDFKDCFTFL LHEQTPVAVD AQQMAFEGEG G--LHAPSAV QAEQLGNHDA HYENPAALQ YRLSLAPDAA TVYRFAGPFA KDAEIAALR
SMc04382 ATNPYSIDYF GR----CAFF ASDGDIAGYT ASRREFLGRA GGILAPQAVI SGAELTGSTD VDGACAAAL TDTIVEAGVE RQVTFFFLGDA DNPPQVRAVL
Clustal Co  :  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....310 .....320 .....330 .....340 .....350 .....360 .....370 .....380 .....390 .....400
XAC4195 ARYLSEAGFA QAAAYADYL QAGRCVQIA TPDAALDNLV NHWLPQVQFY HGDVNRLLTDT PQT----RN YLQDHMGMY LQPATARAAL LHALSQEQPS
XC_4168  ARYLSEAGFA AAAQDYAYQL QAGRCVQIA TPDAALDNLV NHWLPQVQFY HGDVNRLLTDT PQT----RN YLQDHMGMY LQPATARAAL LHALSQEQPS
SMc04382 EELRADS-FG AALEAAKAFW GDFTVGVKVE TPDRANLMI NHWLPYQALG CRIMARSAPY QASGAFGFRD QLQDTLAFLI HRPALARAQI LNAAARQFVE
Clustal Co  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....410 .....420 .....430 .....440 .....450 .....460 .....470 .....480 .....490 .....500
XAC4195 GAMPDGLLLV EGAELKYINQ VPHTDHCVWL PIFLSAYLSE TGDTSILGAR VETHDQRLS -----VA ERLDAAMQWL LDARDARGLS
XC_4168  GAMPDGLLLV EGAELKYINQ VPHTDHCVWL PIFLDAYLAE TGDVAVLDAV VETHDQALS -----VA ARLDAAMQWL LDARDARGLS
SMc04382 GDVQHWLWPG TDAGVRTM-- --ISDDVVWL AHAVAHYCAV TGEEDILKEK VPFITGPALE EGQHDSFYKP DVADEVGDVY EHCARALDIA IHRTGANGLP
Clustal Co  *  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....510 .....520 .....530 .....540 .....550 .....560 .....570 .....580 .....590 .....600
XAC4195 FIAQGDCWDF MNMVGWRGKG VSGWLTVATA YAVRLWSEIC TAQRSVQVQV TFGAEVAVIN ADANRELWDG NWYARGITDD VRFVGIADVD EGRIYLNQPS
XC_4168  FIAQGDWDF MNMVGWRGKG VSGWLTVATA YALRLWSEIC AANGRSQAQT QFGQAVEEYN AAANRELWDG HWYARGITDD GVRFVGIADDE EGRIYLNQPS
SMc04382 LILGGDWNHG MNRVGEAGEG TSVNLGWFLA GTLRALPYA RARKDKPRVA LWERHLEALK DALEQAQWDG DYRRGYIDD DTPLGSAENG ECRIDSLAQPS
Clustal Co  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....610 .....620 .....630 .....640 .....650 .....660 .....670 .....680 .....690 .....700
XAC4195 FALLAGTADA QORAALEAV REQLHTPYG--PVMLAPAYT HMRDDVGLRT QKWPAAENG AVYNHAAAFY LYSLYQIGEA DRAWEILRAL LPGPTREDFV
XC_4168  WALLAGTADA EQRTALLAAV REQLHTPYG--PVMLAPAYT HMRDDVGLRT QKWPAAENG AVYNHAAAFY LYSLYQIGEA DRAWEILRAL LPGPTREDFV
SMc04382 WSTLSGEGDK ERSLRAMDAV MAELVDPEKR IVRLFTFPLE TTKQDFGYIK AYPGGVRENG QYTHAATWV VLAFAAQERA EEAWRTFRLM NPSVHLSQV
Clustal Co  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....710 .....720 .....730 .....740 .....750 .....760 .....770 .....780 .....790 .....800
XAC4195 QRGHLPVSLP NYYRGAWHQY PRTAGRSSL FNTGTVAWVY RCVLEGLFGL VEGDGLAIR PQLPSHWPQA RARRQFRGAD FDLTLTREPQ RTAMEVLVDG
XC_4168  QRGHLPVSLP NYYRGAWHQY PRTAGRSSL FNTGTVAWVY RCVLEGLFGL VEGDGLAIR PQLPSHWPQA QVTRQFRGAQ FEVALTREPQ RTQLEVLVDG
SMc04382 DAEHYRVEPY VVAADIYEGE -ALAGRGWY WYTGSAWLY RAGVEGLIGI RKRGDKLLIR PVLPSEWPGY SAEVVRNGTT HRISVSRDCK SGPVVSVVNN
Clustal Co  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....810 .....820 .....
XAC4195 ELCPEQRIGN IARGQVYRVE VRLPG
XC_4168  VVSPDRVHG IVAGRTRYLQ VRLPG
SMc04382 SVTKNAHEGV LL-----
Clustal Co  :  :  :  :

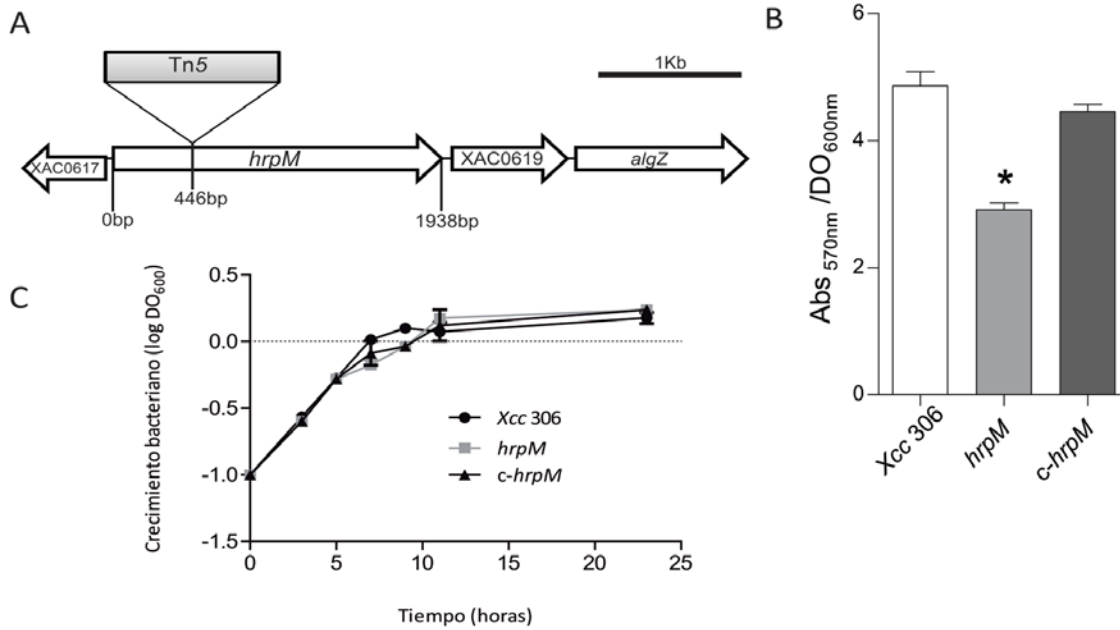
```

**Figura 2.2.** Alineamientos de la NdvB protein de *Xcc* y *X. campestris* junto con la región homóloga en *S. meliloti* (extremo carboxi terminal). (A) Esquemas de las estructuras secundarias de las proteínas obtenidas a partir de la base de datos SMART. Los rectángulos grises simbolizan los dominios glucosiltransferasa, siendo el GT36\_AF el específico de enlaces  $\beta$ (-1,2); los violetas, indican regiones de baja complejidad de secuencia; el hexágono rosado refiere al sitio de unión de carbohidratos. (B) Los alineamientos de secuencias proteicas fueron realizados con el software ClustalX 2.1. Los residuos idénticos se indican con asterisco (\*), los altamente conservados con dos puntos (:) y los menos conservados con un único punto (.). Las secuencias pueden obtenerse del *GenBank* a través de los siguientes códigos de acceso: *Xcc* 306 (XAC4195) NP\_644494.1; *X. campestris* 8004 (XC\_4168) YP\_245226.1; *S. meliloti* 1021 (SMc04382) NP\_387392.1.

2. Identificación de una mutante de *hrpM* a partir de un *screening*: *hrpM* está involucrado en la formación de estructuras de tipo *biofilm* en *Xcc*.

Con el fin de identificar nuevos genes implicados en el proceso de formación de biofilm en la cepa *Xcc* 306, en el laboratorio, se generó una biblioteca de mutantes por inserción del transposón Tn5. Sobre esta biblioteca, se realizó un *screening* basado en la búsqueda de mutantes con menor capacidad de adhesión que la cepa silvestre *Xcc* 306, en este caso a un sustrato abiótico. Los detalles de la metodología implementada para el *screening* se describen en Malamud (2011). Brevemente, alícuotas de cultivos de las distintas cepas en medio mínimo Y (Sherwood and Huisingsh, 1970) fueron colocadas en pocillos de placas de poliestireno. Luego de 16 horas de incubación a temperatura óptima se estimó la cantidad de bacterias adheridas al sustrato mediante la técnica de cristal violeta (O'Toole *et al.*, 1999). Todas aquellas mutantes que mostraron menor adhesión que la cepa silvestre fueron seleccionadas y los sitios de inserción del transposón en cada una de ellas se determinaron por PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*) inversa. Se extrajo el ADN genómico que fue sometido a digestión enzimática y los fragmentos resultantes se autoligaron. Fueron estos fragmentos resultantes de la autoligación los utilizados como templado para la reacción de determinación del sitio de inserción del Tn5.

Una de las mutantes identificadas en este *screening*, resultó poseer una única inserción del Tn5 en el gen *hrpM* (XAC0618) (Fig.2.3.A). Por medio del ensayo de cristal violeta, se evidenció que la capacidad de esta cepa mutada de adherirse a la superficie abiótica fue significativamente menor a la de la cepa silvestre (alrededor del 50%) (Fig.2.3.B). Se descartó que la posibilidad de que la mutación en el gen *hrpM* derivase en una menor tasa de crecimiento de la cepa mutada luego de evaluar el crecimiento de la misma en medio rico PYM (Cadmus *et al.*, 1976) (ver sección Materiales y Métodos). La mutante *hrpM* no mostró diferencias relevantes de crecimiento con la cepa silvestre *Xcc* 306 en medio rico (Fig.2.3.C).



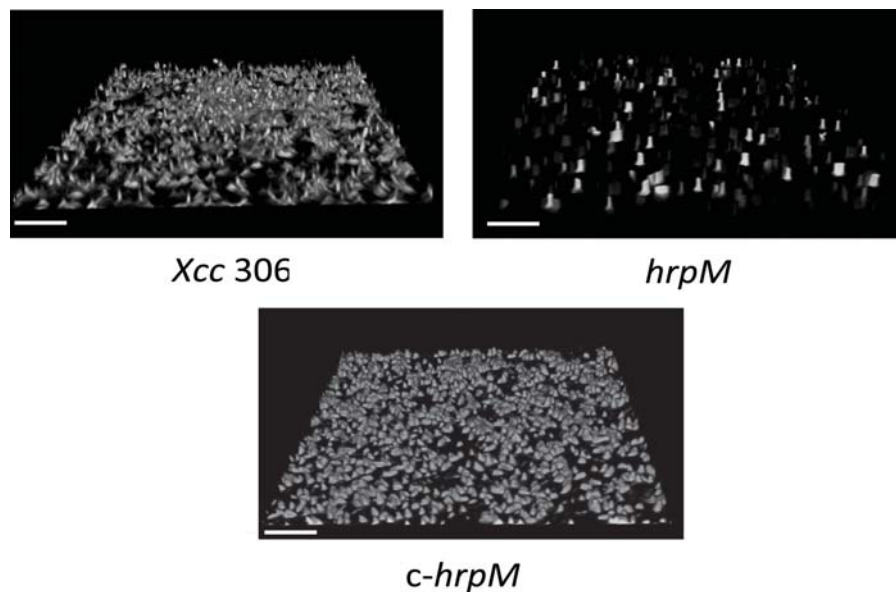
**Figura 2.3.** Identificación de la mutante *Xcc hrpM* a partir de un *screening*. (A) La mutante *hrpM* fue obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5. El sitio de inserción de este transposón, determinado por PCR inversa, se localiza alrededor de los 446 pares de bases río debajo del codón de inicio de la traducción. (B) Ensayo de adhesión celular en microplacas de 96 pocillos. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con seis réplicas cada uno. Las barras de error representan el error estándar de la media; el asterisco (\*) indica los datos que son significativamente diferentes del control (*Xcc 306*) ( $P < 0,001$ ). (C) Curva de crecimiento para la cepa silvestre (*Xcc 306*), mutante (*hrpM*) y la complementada (*c-hrpM*). Fue iniciada a una  $DO_{600}$  aproximada de 0.1 en medio PYM y se incubó a 28°C y 250 rpm el tiempo de duración del ensayo. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

El efecto de la mutación en el gen *hrpM* en el proceso de formación de estructuras de tipo *biofilm* de *Xcc* fue analizado en más detalle mediante el uso de microscopía confocal. La técnica de análisis de desarrollo de *biofilm in vitro* fue previamente puesta a punto en el laboratorio (Rigano *et al.*, 2007b). Para llevar a cabo la observación, en primer lugar, debió introducirse en las cepas en estudio la expresión constitutiva de la proteína verde fluorescente GFP (del inglés: *Green Fluorescent Protein*). Las cepas transformadas, que expresaban GFP, crecieron en medio rico PYM durante una noche. Luego, se diluyó a cada cepa a muy baja concentración en MMY y cada dilución fue colocada en cámaras especiales para microscopía con piso de poliestireno y paredes de borosilicato (ver sección Materiales y Métodos). Después de cuatro días de incubación (sin agitación) en condiciones de temperatura y humedad óptimas, se realizó la observación de las estructuras tridimensionales desarrolladas por estas bacterias mediante el uso de un microscopio confocal láser de escaneo. Las imágenes obtenidas pueden visualizarse en la figura 2.4. En contraste con lo advertido en la cepa silvestre, la mutante *hrpM* no logró formar estructuras de tipo *biofilm* maduras siendo incapaz



de ocupar la superficie de la cámara en su integridad, como sí lo hizo la primera. Esto último confirma el resultado obtenido para el ensayo de adhesión (Fig.2.3.B).

Los defectos asociados a la formación de biofilm de esta cepa fueron restaurados con la introducción del plásmido pBBR1-MCS (Kovach *et al.*, 1994) portando una copia intacta del gen XAC0618 bajo la actividad de su propia región promotora (*c-hrpM*) (Fig.2.4).



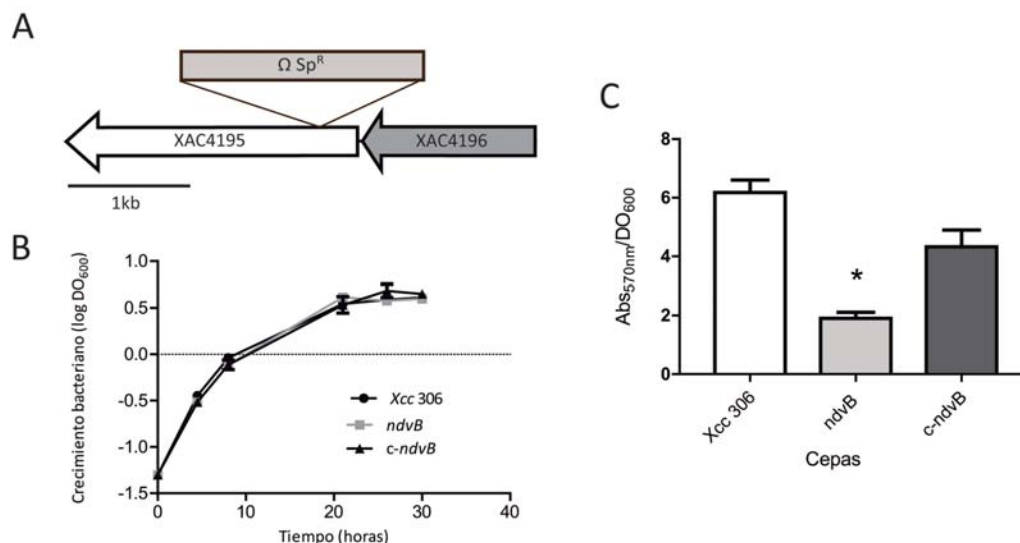
**Figura 2.4.** Observaciones mediante microscopía confocal láser de escaneo (SLCM) de estructuras de *biofilm* de la cepa *Xcc 306*, *hrpM* y *c-hrpM*. Las cepas, que expresaban la proteína GFP, fueron incubadas y observadas luego de los 4 días. Aumento, 1000X; barra de escala, 20  $\mu$ m.

### 3. Construcción de la mutante *Xcc ndvB*.

El segundo gen candidato involucrado en la síntesis de glucano cíclico  $\beta$ -1,2 es el gen XAC4195 que codifica la *NdvB protein*. Con el objetivo de corroborar esta hipótesis se decidió inactivarlo para luego estudiar el fenotipo resultante. La estrategia implementada consistió en la interrupción del gen mediante la inserción de un *cassette* de resistencia al antibiótico espectinomicina (Fig.5A); la metodología utilizada se detalla en el apartado de Materiales y Métodos.

Una vez obtenida la mutante *ndvB*, se estudió su crecimiento en medio rico PYM (Cadmus *et al.*, 1976). No se encontraron diferencias de crecimiento entre la cepa mutada *ndvB* y la cepa silvestre (Fig 2.5.B). Con el objetivo de determinar si la proteína *ndvB* participaba en el proceso de formación del biofilm se realizó con esta mutante el ensayo de adhesión y visualización por medio de la tinción con cristal violeta, como se describió anteriormente para la mutante *hrpM*. En la Fig.2.5.C se grafican los

resultados obtenidos, al igual que la cepa *hrpM*, la mutante *ndvB* también está disminuida en la adhesión con respecto a la cepa silvestre. La cepa expresando ectópicamente el gen *ndvB* bajo la actividad de su propio promotor, *c-ndvB*, complementó parcialmente el defecto de la cepa mutante.



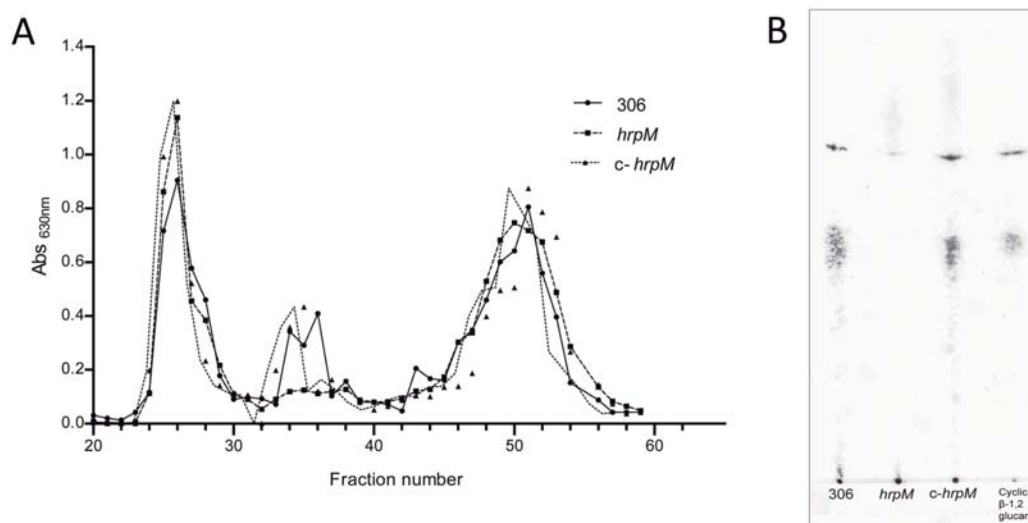
**Figura 2.5.** Caracterización de la mutante *ndvB*. (A) La mutante *ndvB* se obtuvo por la inserción de un *cassette* de resistencia a un antibiótico (Sp, espectinomina). (B) Curva de crecimiento para la cepa silvestre (*Xcc 306*), la mutante (*ndvB*) y la complementada (*c-ndvB*). Fue iniciada a una DO<sub>600</sub> aproximada de 0.05 en medio PYM y se incubó a 28°C y 250 rpm el tiempo de duración del ensayo. Las mediciones fueron realizadas por triplicado. (C) Ensayo de adhesión celular en microplacas de 96 pocillos. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con seis réplicas cada uno. Las barras de error representan el error estándar de la media; el asterisco (\*) indica los datos que son significativamente diferentes del control (*Xcc 306*) (P<0,005).

#### 4. Los genes *hrpM* y *ndvB* están implicados en la producción de glucanos.

Con el fin de evaluar la producción de glucanos cíclicos, estas moléculas fueron aisladas de cada una de las cepas en estudio. La extracción de los azúcares totales se realizó de pellets de cultivos crecidos durante 24 horas con una solución de ácido tricloroacético (TCA). Los extractos resultantes fueron sometidos a una cromatografía de exclusión molecular; los detalles del procedimiento se describen en el apartado Materiales y Métodos. Mediante el reactivo de antrona se determinaron los carbohidratos totales de las distintas fracciones obtenidas de la columna. Los perfiles de elución del material extraído de las cepas se presentan en las Figuras 2.6 y 2.7.

La figura 2.6 muestra los perfiles de exclusión de la *hrpM* junto a la cepa silvestre y a la cepa complementada. Se observan tres picos principales. El primer pico (casi eluido junto al volumen muerto) que abarca las fracciones 24 a la 30, probablemente se trate

de sacáridos de alto peso molecular (Talaga *et al.*, 1996); no hemos analizado esto último en detalle. Teniendo como referencia lo anteriormente descrito por Vojnov y colaboradores (2001), se consideró que los glucanos cíclicos se encuentran en el segundo pico de exclusión (fracciones 33 a 40). Las fracciones del último pico, de la 45 a la 55, representan moléculas de bajo peso molecular, tratándose probablemente de una mezcla de metabolitos secundarios (Vojnov *et al.*, 2001).



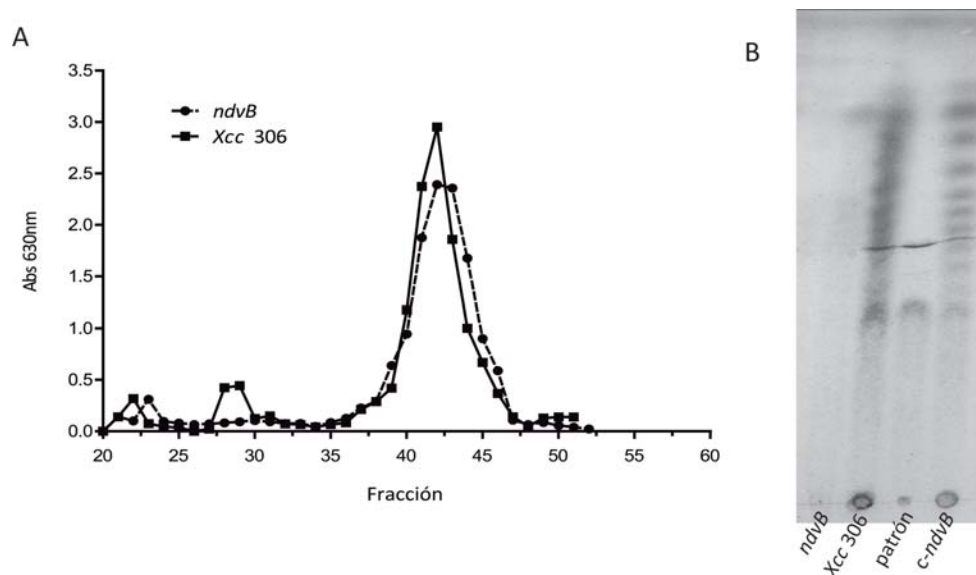
**Figura 2.6.** Análisis de la producción de glucanos cíclicos de la mutante *hrpM*. (A) Perfil cromatográfico (Biogel P4) de cada una de las cepas en estudio. (B) Análisis de la cromatografía en capa delgada (TLC) de las fracciones 33 a la 40 de cada cepa en estudio (de izquierda a derecha: *Xcc* 306, *hrpM*, *c-hrpM* y glucano cíclico  $\beta$ -1,2 purificado como control).

Para confirmar la identidad del segundo pico se armó un *pool* con todas esas fracciones y se sembró en una cromatografía en capa delgada. El resultado del análisis de este segundo pico para cada cepa se observa en la Fig. 2.6.B. El *spot* correspondiente a los glucanos cíclicos fue determinado mediante el uso de un estándar (Vojnov *et al.*, 2001). El glucano cíclico obtenido de las células es claramente evidente en la cepa silvestre, mientras que el *spot* correspondiente no es observado en la *hrpM*. Esto último confirma que la inserción del transposón Tn5 en el gen *hrpM* afecta la producción de glucano cíclico. La ausencia de este polisacárido fue restaurada con la complementación en *trans* de una copia intacta del gen *hrpM* en la mutante (Fig. 2.6).

En la figura 2.7 se muestra el análisis de la producción de glucanos cíclicos en la mutante *Xcc ndvB*. El perfil de exclusión obtenido para las muestras de azúcares totales extraídos con TCA y sometidos a una cromatografía de exclusión molecular (Fig. 2.7.A), reveló que la mutante *ndvB* no es capaz de producir glucanos cíclicos  $\beta$ -(1,2). Teniendo en consideración lo previamente observado para la mutante *hrpM*, esto se

evidencia en la ausencia del segundo pico en el perfil, que sí está presente en la cepa silvestre (fracciones 28 a 31).

Paralelamente, se extrajeron azúcares totales con etanol 70% (v/v) de cultivos crecidos por 24 horas de las cepas mutante *ndvB*, silvestre y complementada (*c-ndvB*). Estas muestras fueron sometidas a una cromatografía en capa delgada junto al patrón de glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) purificado (Fig. 2.7.B). Para la *ndvB*, no se observa el *spot* correspondiente al glucano cíclico que sí se evidencia en la muestra de la cepa silvestre. La cepa complementada, *c-ndvB*, restaura parcialmente la producción de la molécula en estudio.



**Figura 2.7.** Análisis de la producción de glucanos cíclicos de la mutante *ndvB* (A) Perfil cromatográfico (Biogel P4) de la cepa mutante (*ndvB*) y la cepa silvestre (*Xcc 306*). (B) Análisis de la cromatografía en capa delgada (TLC) de las muestras de extracción de azúcares totales.

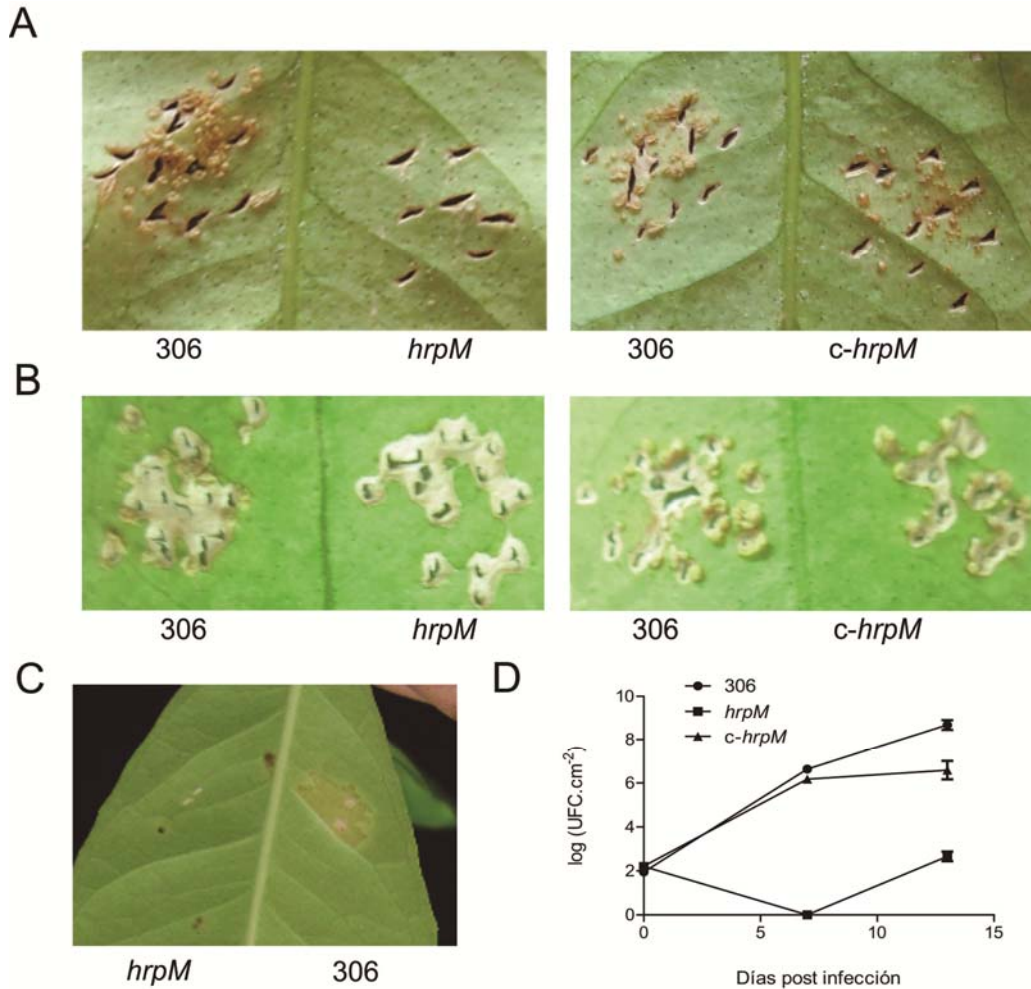
##### 5. La virulencia está afectada en las mutantes *hrpM* y *ndvB*.

Con el fin de determinar cuál es la influencia del producto de los genes *hrpM* y *ndvB*, y como consecuencia del glucano cíclico  $\beta$ -(1,2), en la patogenicidad de *Xcc*, llevamos a cabo ensayos de infección en plantas de cítrico.

Infectamos dos especies de cítrico con la mutante *hrpM*: limón (*C. limon* cv. Eureka) y pomelo (*C. paradisi* cv. Macfadyen). Una suspensión bacteriana de concentración determinada se hisopó sobre las hojas jóvenes de ambas especies previamente heridas con una aguja, con el propósito de favorecer la entrada de las bacterias al mesófilo. A las cuatro semanas posteriores a la infección, la cepa silvestre desarrolló canchales mientras que para la mutante *hrpM* no se observaron síntomas. Con la cepa

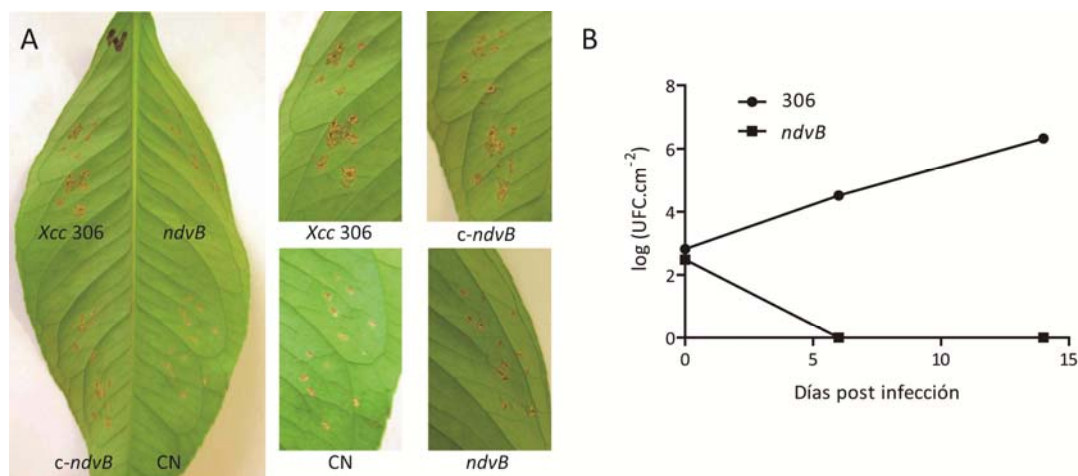
complementada (*c-hrpM*) se restauró la virulencia en ambos casos, limón y pomelo (Fig. 2.8.A y 2.8.B). Otro de los métodos de infección ensayados con la mutante *hrpM* fue el de infiltración. Este último implica la inyección dentro de la hoja de la suspensión bacteriana de concentración determinada. Tampoco por este método la mutante *hrpM* desarrolló síntomas (Fig. 2.8.C).

Se comparó el crecimiento de las tres cepas en plantas de limón. Se infectaron hojas jóvenes de la planta por el método que requiere de heridas previas en el tejido vegetal. A los 0, 7 y 13 días posteriores a la infección se extrajo el material vegetal, se procesó y se determinó el número de UFC (unidades formadoras de colonias). Los resultados graficados en la Figura 2.8.D muestran diferencias significativas entre la mutante *hrpM* y la cepa silvestre *Xcc* 306. A los 7 días post infección (dpi) no se detectó crecimiento para la mutante *hrpM*. A los 13 dpi, la cepa silvestre fue capaz de aumentar su población tres órdenes respecto a la población inicial (0 dpi) mientras que la mutante *hrpM* sólo alcanzó cantidades similares a las iniciales. La cepa complementada tuvo un comportamiento similar al de la cepa silvestre. Las diferencias presentes a los 13 pudieron deberse a la probable pérdida parcial del plásmido pBBR1-MCS::*hrpM*.



**Figura 2.8.** Ensayos de infección en hojas de cítrico con la mutante *hrpM*. (A) Suspensiones bacterianas de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *Xcc* 306, *hrpM* y *c-hrpM*, fueron hisopadas sobre hojas jóvenes de limón (*C. limon* cv. Eureka). Las fotografías se tomaron 30 días después de la infección. (B) Ensayo similar al llevado a cabo en limón, pero en hojas jóvenes de pomelo (*C. paradisi* cv. Macfadyen). (C) Suspensiones bacterianas de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *Xcc* 306, *hrpM* y *c-hrpM*, fueron inyectadas dentro del mesófilo de hojas jóvenes de limón. Las fotografías se tomaron a los 14 días posteriores a la infección. (D) Curva de crecimiento in vivo de las cepas en estudio en hojas de limón. Estas últimas fueron infectadas con suspensiones bacterianas de concentración conocida ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) mediante el método de hisopado. Tres experimentos independientes se llevaron a cabo para cada cepa con resultados muy similares.

La mutante *ndvB* fue utilizada para la infección de limón. El método aplicado fue el de hisopado sobre heridas de la hoja. Del mismo modo que ocurrió para la *hrpM*, esta otra mutante defectiva en la producción de glucanos cíclicos tampoco mostró síntomas de la enfermedad después de los 30 días de la infección (Fig. 2.9.A). No pudieron determinarse las UFC a los 7 y 15 días posteriores a la infección, por lo que se determina que esta cepa ha sido incapaz de crecer en la planta (Fig. 2.9.B).



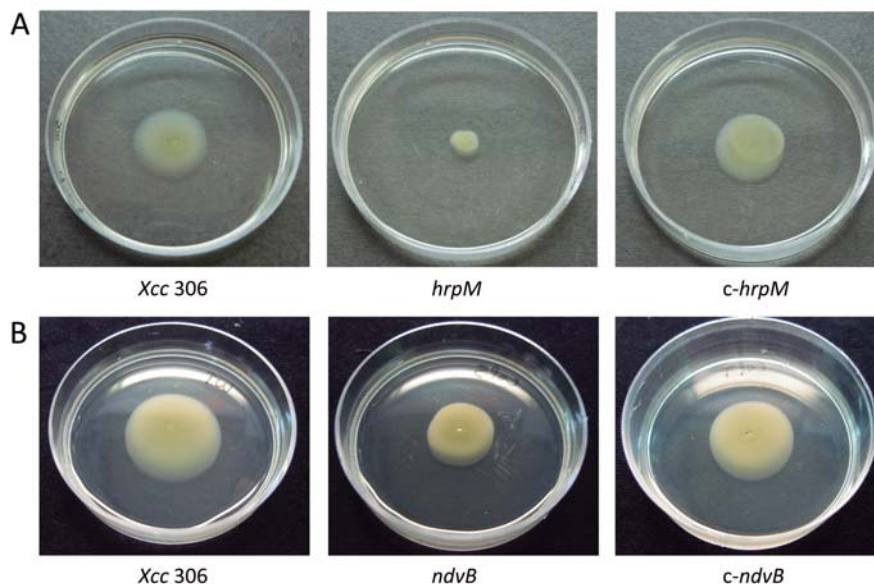
**Figura 2.9.** Ensayos de infección en hojas de cítrico con la mutante *ndvB*. (A) Suspensiones bacterianas de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *Xcc* 306, *ndvB* y *c-ndvB* fueron hisopadas sobre hojas jóvenes de limón (*C. limon* cv. Eureka). Las fotografías se tomaron 30 días después de la infección. CN, control negativo. (B) Curva de crecimiento in vivo de las cepas en estudio en hojas de limón. Estas últimas fueron infectadas con suspensiones bacterianas de concentración conocida ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) mediante el método de hisopado. Tres experimentos independientes se llevaron a cabo para cada cepa con resultados muy similares.

6. La movilidad dependiente del flagelo y la quimiotaxis se ven afectada en ambas mutantes no productoras de glucanos cíclicos  $\beta$ -(1,2).

En especies como *P. syringae*, *Erwinia chrysanthemi* y *Salmonella entérica*, entre otras, la producción de glucanos periplasmáticos es necesaria para la movilidad (Page *et al.*, 2001). Como ya ha sido detallado en la sección introductoria, en *Xcc* fueron descritos dos tipos de movilidad que son fundamentales en el proceso de virulencia (Malamud *et al.*, 2011). Uno de esos tipos de movilidad es el *swimming*, que es totalmente dependiente de la estructura flagelar.

Profundizando en el estudio del fenotipo resultante de la pérdida de glucanos cíclicos, se intentó determinar la capacidad de realizar este tipo de movimiento en estas cepas. Para ello pequeñas alícuotas de cultivos de las distintas cepas en estudio fueron sembradas en placas de agar blando. Después de 72 horas de incubación a 28°C, se tomaron fotografías de las placas y se realizaron mediciones de los halos de movilidad formados en cada caso. Tanto la mutante *hrpM* como la *ndvB* mostraron una considerable reducción en el *swimming*, comparativamente con la cepa silvestre. En las mutantes complementadas hubo una restauración parcial del fenotipo defectivo (Fig. 2.10.A y 2.10.B).



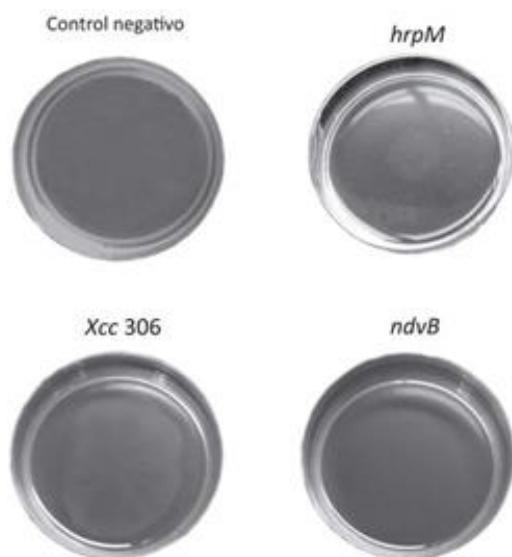


**Figura 2.10.** Movilidad dependiente de la estructura flagelar. La movilidad tipo *swimming* fue ensayada en placas de medio NYBG 0,25%, para las mutantes (A) *hrpM* y (B) *ndvB* junto a sus respectivas cepas complementadas.

La movilidad dependiente de flagelo, entonces, manifestó una disfuncionalidad aparente en mutantes carentes de glucanos cíclicos de *Xcc*. Por consiguiente, para dar énfasis a este resultado, analizamos el proceso de quimiotaxis en estas cepas. La quimiotaxis en bacterias es un fenómeno en el que las células bacterianas “perciben” sus ambientes químicos y dirigen sus movimientos hacia los atractantes y lejos de los repelentes (Tu, 2013). Este proceso está estrechamente relacionado con el *swimming* y el funcionamiento del flagelo (Sarkar *et al.*, 2010). Con el fin de evaluar la capacidad quimiotáctica de las cepas no productoras de glucanos cíclicos y determinar si estas moléculas influían o no en este proceso, se estimó cualitativamente la migración de las distintas cepas hacia gradientes químicos generados por extractos acuosos de hojas jóvenes de pomelo (su preparación se describe en detalle en el apartado Materiales y Métodos). Para ello las células bacterianas se resuspendieron en un medio conteniendo *Hipromelosa*, un polímero semisintético viscoelástico, y esta suspensión se depositó en placas de Petri de manera de formar una lámina delgada. Una pequeña gota de extracto de hojas de pomelo se colocó en el centro de estas placas con la suspensión bacteriana en *Hipromelosa*. Normalmente, luego de un período de aproximadamente una hora, en caso de existir una respuesta quimiotáctica positiva, se espera la formación de un halo turbio alrededor del extracto. Esto último significa que las bacterias se ven atraídas por el extracto de pomelo y como consecuencia se mueven hacia él; el halo turbio representa la acumulación de bacterias. En nuestro experimento, la respuesta fue positiva, tal como se suponía, para la cepa silvestre (Fig.



2.11). Sin embargo, no hubo respuesta quimiotáctica en las mutantes *hrpM* y *ndvB* (Fig. 2.11).



**Figura 2.11.** Respuesta quimiotáctica de las mutantes *hrpM* y *ndvB* y de la cepa silvestre (*Xcc* 306), hacia extracto acuoso de pomelo. El halo turbio se corresponde con una respuesta positiva. Los ensayos fueron reproducidos al menos tres veces de manera independiente, con resultados similares a los aquí presentados.

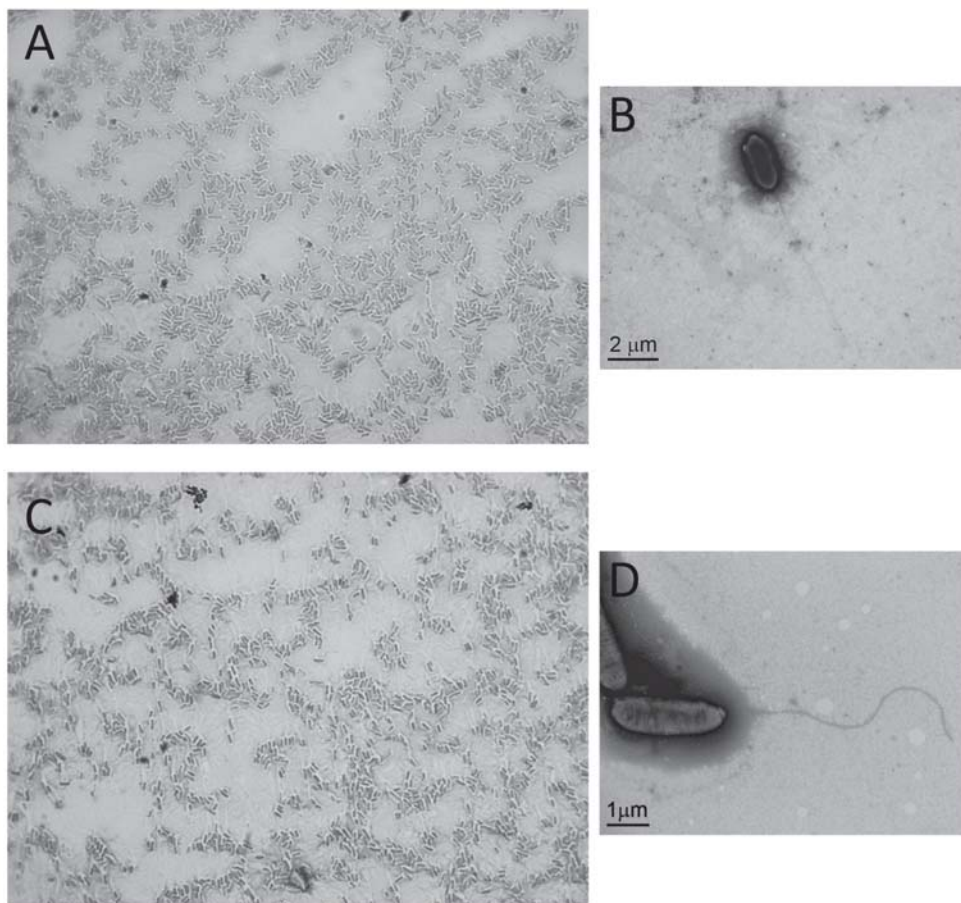
## 7. Observación de la estructura flagelar en la mutante *hrpM*.

Dado el análisis detallado previamente, las mutantes no productoras de glucanos cíclicos no responden a estímulos quiotácticos y no realizan *swimming* (Figs. 2.10 y 2.11). Con esta evidencia, se puede conjeturar la existencia de alteraciones en la estructura del flagelo. Se ha documentado previamente disfunciones en la movilidad asociadas a la deficiencia en la producción de glucanos periplasmáticos para algunas especies bacterianas como *E. coli*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens*, *Mesorhizobium loti*, *E. chrysanthemii* y *B. abortus* (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013; Cangelosi *et al.*, 1990; Dylan *et al.*, 1990; Kawaharada *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2001; Roset *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de asociar la falta de movilidad con un flagelo que no se ensambla, en ninguno de estos proyectos se demuestra directamente esta afirmación. Nuestro objetivo, entonces, fue examinar la presencia de esta estructura de membrana cuando los glucanos cíclicos  $\beta$ -(1,2) no se producían en *Xcc*. Para ello, procedimos con el análisis de una de nuestras mutantes: *hrpM*.

En primer lugar, realizamos observaciones mediante microscopio óptico de las muestras de *Xcc* 306 y la mutante *hrpM*. Para poder ser observadas, las muestras debieron ser tratadas siguiendo el protocolo descrito por Kodaka y colaboradores (1982), que permite la visualización del flagelo con este tipo de tecnología. Las imágenes capturadas se publican en la figuras 2.12.A y 2.12.C. Contrariamente a lo que

suponíamos, en la cepa *hrpM* sí se halló flagelo, y al parecer de características similares al presente en la cepa silvestre.

Para ahondar en el análisis, muestras de *Xcc* 306 y *hrpM* fueron fotografiadas en detalle mediante microscopía electrónica de transferencia, previa fijación y tinción. A través de este método, confirmamos los resultados anteriormente descritos para las observaciones con microscopio óptico (Fig. 2.12.B, 2.12.D).



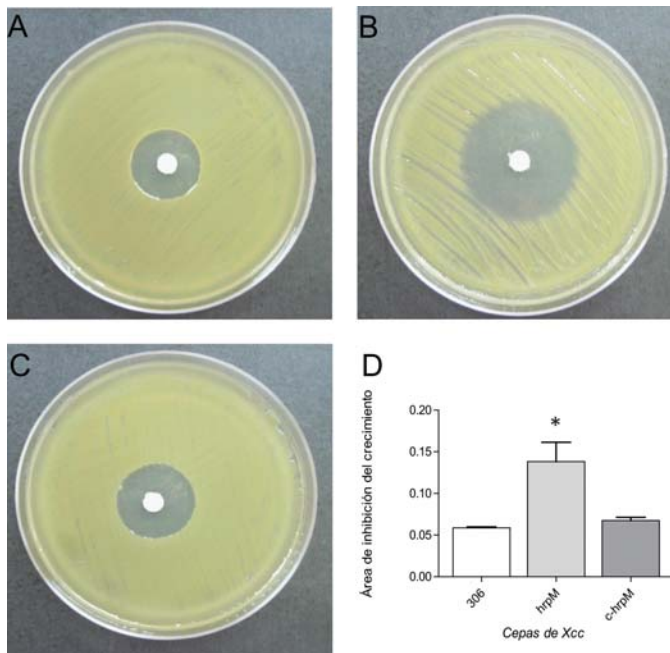
**Figura 2.12.** Observación de la estructura flagelar mediante microscopía óptica y electrónica. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico de preparados de bacterias tenidas con una solución con cristal violeta de base: (A) *hrpM* y (C) *Xcc* 306; Aumento: 10000X. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las estructuras flagelares de (B) *hrpM* y (D) *Xcc* 306.

#### 8. La mutante *hrpM* es más sensible al tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Una de las respuestas tempranas de la planta posterior al reconocimiento del patógeno, que juega un papel muy importante en la defensa, es la producción de especies reactivas de oxígeno o ROS (del inglés: *Reactive Oxygen Species*). Muchos de estos compuestos, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), tienen actividad antimicrobiana. La acumulación de estas sustancias en el sitio de ataque del patógeno

resulta directamente dañina para el mismo. Esto último forma parte de lo que se llama respuesta hipersensible o HR (del inglés: *Hipersensitive Response*): generación de una zona de muerte celular que previene el esparcimiento de patógenos biótrofos (como *Xcc* 306) (Liu *et al.*, 2011).

La tolerancia al estrés oxidativo frente a la imposibilidad de producir glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2 fue examinada para la mutante *hrpM*. Suspensiones de las distintas cepas fueron esparcidas en placas de medio PYM-agar. Posteriormente, sobre cada una de esas placas se colocó un disco embebido en  $H_2O_2$ . Las placas se incubaron y se determinó el diámetro del área de inhibición del crecimiento en cada una de ellas. Diferencias significativas se encontraron entre ellas en relación a la tolerancia al tratamiento con el oxidante (Fig. 2. 13). El halo de inhibición de crecimiento de *hrpM* fue significativamente más extenso que el de la cepa silvestre (*Xcc* 306) y la complementada (*c-hrpM*), indicando, entonces, mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno.

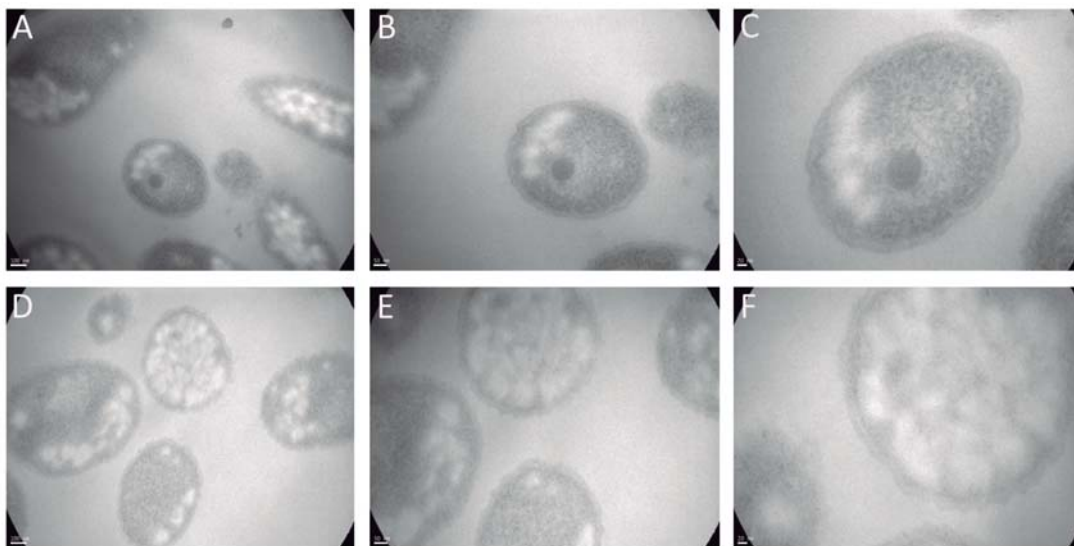


**Figura 2.13.** Sensibilidad de *Xcc* 306, *hrpM* y *c-hrpM* al tratamiento con  $H_2O_2$ . Luego de ser incubadas por 48 horas a 28°C, se determinaron las respectivas áreas de inhibición de crecimiento. (A) cepa silvestre 306; (B) cepa mutante *hrpM*; (C) cepa complementada *c-hrpM*. (D) Cuantificación relativa del área de inhibición de crecimiento (las barras representan los valores de las medias  $\pm$  el error estándar, n=3). El asterisco (\*) indica la diferencia significativa en relación al control (cepa silvestre) ( $P < 0,005$ ).

## 9. Observación de la membrana plasmática en la mutante *hrpM*

En otras especies de bacterias, se ha descrito que mutantes carentes de glucanos periplasmáticos muestran fenotipos pleitrópicos. Para los autores de estos trabajos, la explicación de estos fenotipos reside en que la falta de glucanos en el periplasma conllevaría a una pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Briones *et al.*, 2001; Douglas *et al.*, 1985; Geremia *et al.*, 1987; Mah *et al.*, 2003; Minsavage *et al.*,

2004; Peñaloza-Vazquez, 2010). Los resultados de este capítulo muestran que también para nuestras cepas mutantes, la ausencia de glucanos cíclicos  $\beta$ -(1,2) tiene como consecuencia disfuncionalidades múltiples en la biología de las mismas. Por consiguiente, planteamos un primer estudio de la estructura de la membrana plasmática de una de las mutantes, *hrpM*. Para ello, se realizaron análisis de cortes ultrafinos mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Para la obtención de las muestras, se fijaron pellets de cultivos de la cepa silvestre y de la cepa *hrpM*, que después fueron cortados por un micrótopo. Posteriormente, los ultracortes se montaron y contrastaron para poder ser examinados.



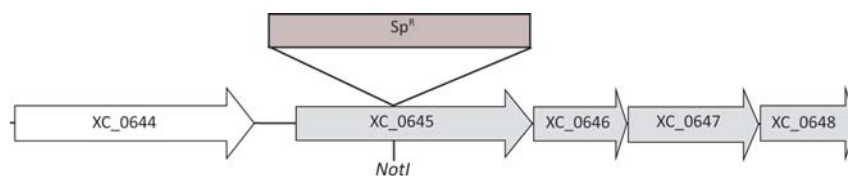
**Figura 2.14.** Observaciones de la membrana plasmática mediante microscopía electrónica de transferencia (MET). (A) *Xcc* 306, aumento 85000X; barra escala, 100nm (B) *Xcc* 306, aumento 140000X; barra escala, 50nm (C) *Xcc* 306, aumento 250000X; barra escala, 20nm (D) *hrpM*, aumento 85000X; barra escala, 100nm (E) *hrpM* 306, aumento 140000X; barra escala, 50nm (F) *hrpM*, aumento 250000X; barra escala, 20nm.

A pesar de no derivar en conclusiones robustas, este experimento brindó una aproximación inicial. La metodología utilizada no permitió obtener imágenes con la resolución suficiente. Aun así, podría sugerirse la existencia de defectos en la membrana de la mutante *hrpM*. Al compararse las membranas plasmáticas de la cepa silvestre con la de la cepa mutante *hrpM*, se evidenció que no poseen el mismo aspecto, pareciendo la membrana de esta última más irregular, sobre todo en su parte externa (Fig. 2.14).

#### 10. Síntesis de glucanos cíclicos en *X. campestris* y su rol en la virulencia.

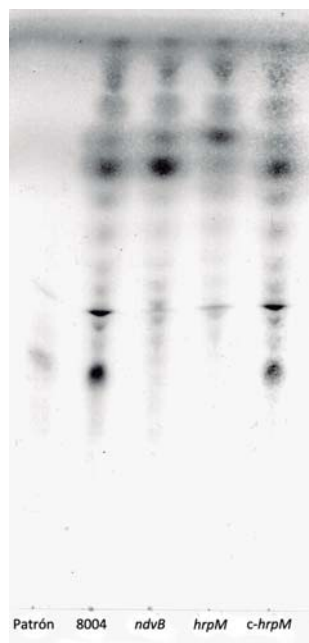
*X. campestris* produce un hexadecaglucósido cíclico neutro de 15 enlaces  $\beta$ -(1,2) y un enlace  $\alpha$ -(1,6) (Amemura and Cabrera-Crespo, 1986; York, 1995). Este glucano cíclico tiene las mismas características que el descrito para *Xcc* (Talaga et. al, 1996). Como ya se mencionó en la sección Introducción, en *X. campestris* 8004 se hayan presentes al menos dos proteínas especializadas en la síntesis de glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2. En el laboratorio, previamente a la realización de este trabajo de tesis, se demostró la implicancia de una de esas proteínas, NdvB protein (XC\_4168), en dicho proceso (Rigano *et al.*, 2007a). Sin embargo, no había reportes de la función de *hrpM* en *X. campestris*.

Considerando los datos obtenidos para la mutante en el gen *hrpM* en *Xcc*, decidimos estudiar su homólogo en *X. campestris* 8004. Se procedió a anular la expresión del mismo (XC\_0645) mediante mutagénesis dirigida (Fig. 2.15). Los detalles de la metodología se especifican en la sección Materiales y Métodos.



**Figura 2.15.** Diagrama de la mutante *hrpM* en *X. campestris* 8004. La mutante *hrpM* (XC\_0645) fue construida por la inserción de un *cassette* de espectinomicina (Sp).

Se extrajeron los azúcares totales de pellet de cultivos de la mutante obtenida en el gen *hrpM* de *X. campestris* y de las cepas control (*X. campestris* 8004 y *X. campestris ndvB*), mediante el tratamiento con etanol 70% (ver Materiales y Métodos). Luego, estas muestras fueron analizadas por cromatografía en capa delgada (TLC) junto con el patrón de glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2 (Fig. 2.16). Tal como se esperaba, la mutante *hrpM* en *X. campestris* mostró que no tiene la capacidad de síntesis de glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2, dado que no es posible evidenciar el *spot* correspondiente a estas moléculas para esta cepa en la placa cromatográfica.

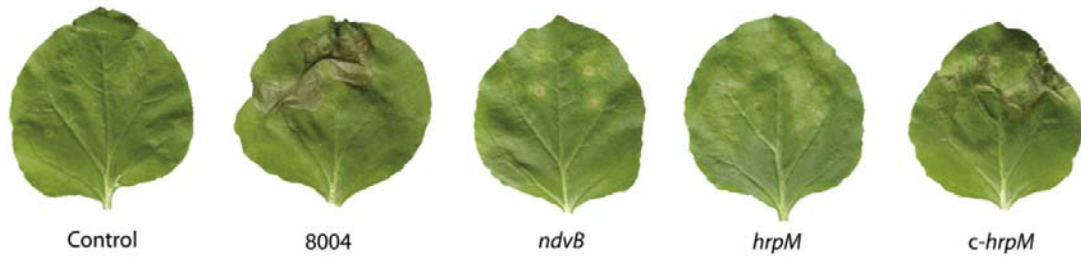


**Figura 2.16.** Análisis de la producción de glucanos cíclicos de las cepas de *X. campestris*. Cromatografía en capa delgada de las muestras de azúcares totales, extraídas de las distintas cepas de *X. campestris* en estudio. De izquierda a derecha: patrón de glucano cíclico  $\beta$ -1,2 de *X. campestris* 8004 purificado (primera calle), cepa silvestre *X. campestris* 8004 (segunda calle), mutante *ndvB* (tercera calle), mutante *hrpM* (cuarta calle) y su complementada (quinta calle).

La complementación en *trans* del gen *hrpM* de *X. campestris* se realizó mediante la introducción del plásmido pBBR1-MCS::*hrpM*, conteniendo una copia intacta del gen *hrpM* de *Xcc* (XAC0618) bajo la actividad de su propia región promotora. Como se observa en la Fig. 16, en la cepa complementada se reestablece la actividad de la enzima mutada y vuelven a producirse los glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2. El gen de *Xcc* fue funcional en *X. campestris*, afirmando lo obtenido en el análisis bioinformático: el gran porcentaje de homología entre ellos. Lo que es más, parece existir un alto grado de conservación del mecanismo de regulación transcripcional y de la región promotora en ambas especies.

Los efectos de la inactivación del gen *ndvB* en el desarrollo de la enfermedad producida por *X. campestris* fueron estudiados en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Éste último es un modelo que se ha utilizado bastamente en nuestro laboratorio para evaluar los efectos de la infección con *X. campestris* (Rigano *et al.*, 2007a; Torres *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2006). Se infectaron plántulas de *N. benthamiana* con las distintas cepas en estudio y se examinó la sintomatología que éstas presentaban luego de 5 días de ser infectadas. La infección fue realizada por infiltración de suspensiones bacterianas de concentración conocida, aproximadamente  $10^7$  UFC/ml. Observamos, entonces, que tanto la cepa silvestre como la cepa complementada mostraron síntomas claros de necrosis. Sin embargo, éstos últimos no fueron evidenciados en las cepas mutantes no productoras de glucanos cíclicos (*ndvB* y *hrpM*) (Fig 2.17).





**Figura 2.17.** Infección de *N. benthamiana* con las cepas de *X. campestris*. Se realizó por infiltración con jeringa de suspensiones bacterianas de las distintas cepas en 10mM de  $MgCl_2$  de  $1 \times 10^7$  UFC/ml de concentración final, en hojas jóvenes. Los síntomas fueron observados luego a los 5 dpi. El ensayo fue repetido tres veces de manera independiente, obteniéndose resultados similares.

## CAPÍTULO II



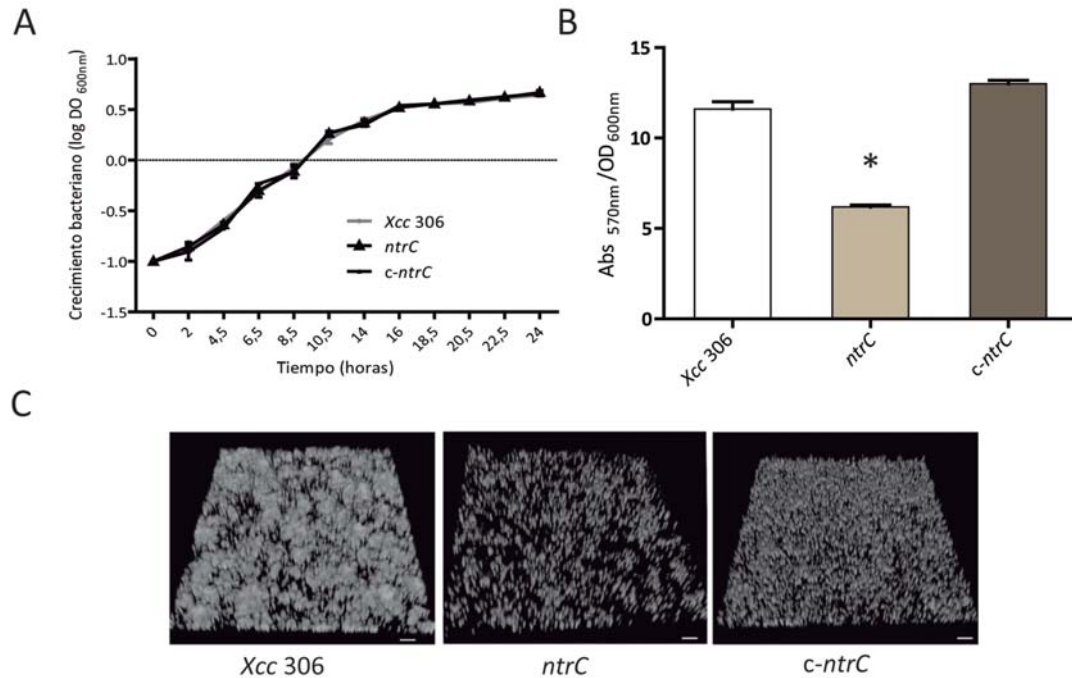
### **Regulación de la síntesis de factores de virulencia por NtrC**

#### 1. Obtención, identificación y caracterización de la mutante *ntrC*.

La mutante en el gen XAC3733, al que llamaremos *ntrC*, fue adquirida por la inserción de un transposón Tn5. Se seleccionó de un *pool* de mutantes a partir de un *screening* en búsqueda de aquellas con capacidad reducida de formar *biofilm*. Los detalles de este *screening* se resumen en capítulo II de la sección Resultados de esta tesis, el cual describe a la mutante *hrpM* que también se obtuvo mediante la misma metodología.

Respecto a los primeros estudios acerca de la capacidad de la mutante *ntrC* de formar *biofilm*, los ensayos de adhesión a superficies de poliestireno mostraron que esta cepa se adhirió significativamente menos que la cepa silvestre *Xcc 306*, aun cuando ambas cepas presentaron tasas de crecimiento comparables (Fig. 3.1.A y 3.1.B). Esta mutante fue complementada en *trans* por la introducción del plásmido pBBR1-MCS portando el gen XAC3733 endógeno junto a su región promotora. La cepa complementada (*c-ntrC*) presentó valores de adhesión similares a los de la cepa silvestre *Xcc 306* (Fig. 3.1.B).

Mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM, del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*), analizamos detalladamente las estructuras de tipo *biofilm* que formaban las cepas en estudio. La cepa silvestre, la mutante *ntrC* y la complementada *c-ntrC* fueron tratadas con el kit de viabilidad celular *BacLight LIVE/DEAD* para facilitar su visualización. Cultivos estáticos de estas bacterias se incubaron en cámaras especiales a 28°C. Estos cultivos se observaron al microscopio luego de cuatro días de crecimiento. Las imágenes obtenidas se analizaron más detalladamente mediante la utilización del *software* COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000), determinando: biomasa total, espesor promedio y coeficiente de *roughness* del *biofilm*. El coeficiente de *roughness* es un índice de la heterogeneidad del *biofilm* que refiere a la variación del espesor del mismo; cuanto más alto es el valor del coeficiente, más heterogéneo es el *biofilm* (Murga *et al.*, 1995).



**Figura 3.1.** Caracterización de la mutante *ntrC*. (A) Curva de crecimiento para la cepa silvestre (*Xcc 306*). La mutante (*ntrC*) y la complementada (*c-ntrC*). Fue iniciada a una DO<sub>600</sub> aproximada de 0.1 en medio PYM y se incubó a 28°C y 250 rpm el tiempo de duración del ensayo. Las mediciones fueron realizadas por triplicado. (B) Ensayo de adhesión celular en microplacas de 96 pocillos. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con seis réplicas cada uno. Las barras de error representan el error estándar de la media; el asterisco (\*) indica los datos que son significativamente diferentes del control (*Xcc 306*) ( $P < 0,001$ ). (C) Observaciones mediante microscopía confocal láser de escaneo de estructuras de *biofilm* de la cepa *Xcc 306*, *ntrC* y *c-ntrC*. Las cepas fueron incubadas en las cámaras, teñidas y observadas luego de los 4 días. Aumento, 1000X; barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

Pasado el tiempo de incubación adecuado, se advirtieron las estructuras de *biofilm* maduras típicas formadas por la cepa silvestre (Fig. 3.1.C). Validando los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión, la mutante *ntrC* no mostró el *biofilm* maduro típico, formando en su lugar estructuras de escasa biomasa y de espesor reducido (Fig. 3.1.C; **Tabla 3.1**). La complementación de la mutante, si bien no arrojó valores de espesor iguales a la cepa silvestre, llevó a un aumento en la biomasa y en el espesor del *biofilm* significativos comparados con la cepa mutada (Fig. 3.1.C; **Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1.** Análisis de las propiedades del *biofilm* obtenidas por COMSTAT.

Cepa	Biomasa ( $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ )	Espesor promedio ( $\mu\text{m}$ )	Coefficiente de <i>roughness</i>
<i>Xcc</i> 306	5,70 $\pm$ 0,021 (a)	7,15 $\pm$ 0,1 (a)	0,30 $\pm$ 0,04 (a)
<i>ntrC</i>	1,72 $\pm$ 0,10 (b)	2,90 $\pm$ 0,06 (b)	1,13 $\pm$ 0,01 (b)
<i>c-ntrC</i>	3,92 $\pm$ 0,15 (c)	6,03 $\pm$ 0,04 (a)	0,57 $\pm$ 0,09 (a)
<i>ntrC</i> (PA2567)	4,05 $\pm$ 0,40 (c)	6,25 $\pm$ 0,30 (a)	0,51 $\pm$ 0,12 (a)
<i>ntrC</i> ( <i>wspR19</i> )	2,10 $\pm$ 0,10 (b)	3,7 $\pm$ 0,34 (b)	1,06 $\pm$ 0,01 (b)

Los datos representan la media  $\pm$  el desvío estándar; las distintas medias simbolizan las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Las mediciones de biomasa total, espesor y el coeficiente de *roughness* se realizaron en un *biofilm* de 4 días de desarrollo.

El análisis de la secuencia de la mutante en XAC3733 permitió determinar el sitio de inserción del transposón Tn5, hallándose éste a 482 pares de bases río abajo del sitio ATG. Al parecer, *ntrC* es un gen monocistrónico y la inserción del transposón no provocaría efecto polar alguno (Fig. 3.2.A). La complementación en *trans*, introduciendo al gen endógeno XAC3733 bajo la actividad de su promotor, demuestra la hipótesis planteada.

### 1.1. Estudios *in silico* de la proteína NtrC.

La secuencia XAC3733 codifica para una proteína de 437 aminoácidos, homóloga a un activador transcripcional perteneciente a la familia NtrC. Este tipo de activadores son conocidos por regular múltiples procesos fisiológicos en bacterias (Andrade *et al.*, 2006; De Carlo *et al.*, 2006; Kim and McCarter, 2007; Kroos, 2007). Esta familia de activadores se relacionan con la regulación de la actividad de promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  (Hirschman *et al.*, 1985; Kustu *et al.*, 1989; Studholme and Dixon, 2003) y en su forma fosforilada, se unen a *enhancers* (De Carlo *et al.*, 2006). No existen muchos reportes que describan el rol de la familia de reguladores NtrC en el género *Xanthomonas* mas aún no se ha descrito en profundidad el rol de XAC3733.

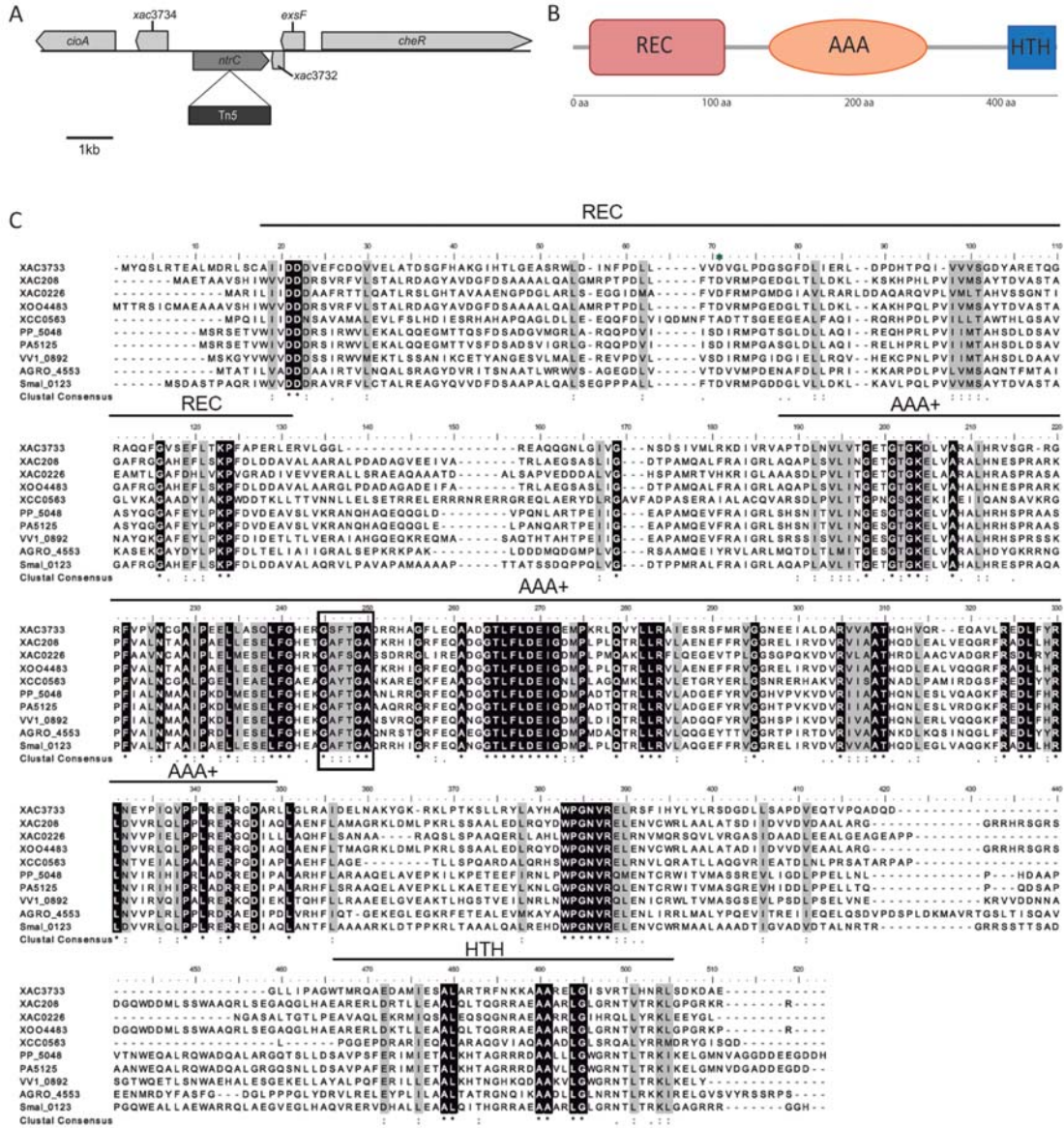
En general, los miembros de la familia NtrC tienen tres dominios conservados (De Carlo *et al.*, 2006): un dominio central que hidroliza ATP (dominio AAA+) y activa la transcripción por interacción con la subunidad  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa, un dominio regulador de respuesta de un sistema de dos componentes en el extremo N-terminal (REC) y en el extremo C-terminal conteniendo un motivo de unión a ADN (HTH) (Fig. 3.2.B).

La secuencia aminoacídica de XAC3733 fue comparada con las secuencias de otras dos proteínas de la familia NtrC en *Xcc* 306 (XAC0208 y XAC0226) junto a las proteínas de la familia NtrC de *X. oryzae pv oryzae* (XOO4483), *X. campestris pv. campestris* (XCC0563), *P. putida* (PP\_5048), *P. aeruginosa* (PA5125), *Vibrio vulnificus* (VV1\_0892), *Agrobacterium tumefaciens* (AGRO\_4553) y *Stenotrophomonas maltophilia*

(Sma1\_0123) (Fig. 3.2.C). El porcentaje de identidad que comparten las secuencias es, en general, bastante similar. El porcentaje de identidad entre la secuencia aminoacídica de XAC3733 y de las demás secuencias de Xcc 306, es de 40% con XAC0208 y 35% con XAC0226. Respecto a las demás secuencias, 39% con XOO4483 y Sma1\_0123, 38% con XCC0563 y 34% con PA5125, AGRO\_4553 y VV1\_0892.

Analizando las secuencias de las proteínas del alineamiento, observamos diferencias en el dominio AAA+. En este dominio existe un motivo, el GAFTGA, que está implicado en la unión con subunidad  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa y subsiguiente activación en la síntesis del ARN (De Carlo *et al.*, 2006). La secuencia XAC3733 posee una variante GSFTGA, respecto de las demás secuencias: la primera alanina (aminoácido no polar) fue reemplazada por serina (aminoácido polar) (Fig. 3.2.C).

Por otra parte, XAC3733 parece codificar para un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes, pero a pesar de ello, cuando analizamos el entorno de esta secuencia, no está asociada con ningún gen que codifique para una proteína sensora. Esto último nos lleva a pensar que NtrC actuaría como un regulador “huérfano”. Otro dato interesante a considerar es que encontramos en esta proteína NtrC, un putativo sitio de fosforilación en la Asp-64, similar al hallado en la NtrC homóloga de *P. putida* (Hervas *et al.*, 2009).

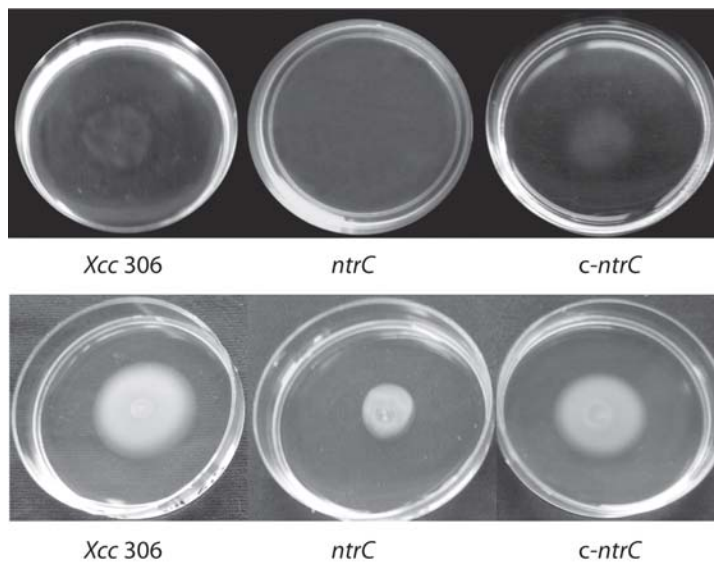


**Figura 3.2.** Estudio de secuencia de *ntrC*. (A) Gráfico del entorno génico de XAC3733 (*ntrC*) y del sitio de inserción del transposón Tn5, 482 pares de bases río abajo del inicio de la transcripción. (B) Esquemas de la estructura secundaria de las proteínas obtenidas a partir de la base de datos SMART: el rectángulo rosado representando al dominio REC (dominio regulador de respuesta), el óvalo anaranjado representando el dominio AAA+ (de interacción con la subunidad  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa e hidrólisis de ATP) y el rectángulo azulado representando el dominio HTH de unión al ADN. (C) Alineamiento múltiple entre las proteínas de la familia NtrC en *Xcc* 306 y las homólogas en otras bacterias. Los alineamientos de secuencias proteicas fueron realizados con el software ClustalX 2.1. Los residuos idénticos se indican con asterisco (\*), los altamente conservados con dos puntos (;) y los menos conservados con un único punto (.). Los respectivos códigos de acceso a las secuencias por *GenBank* son (por especie y en orden de aparición): *Xcc* 306 (XAC3733), NP\_644040.1; (XAC0208) NP\_640564.1; (XAC0206) NP\_640582.1, for *X. oryzae* pv. *oryzae* (XOO4483) YP\_203122.1; *X. campestris* pv. *campestris* (XCC0563) NP\_635955.1; *P. putida* (PP\_5048) AAN70613.1; *P. aeruginosa* (PA5125); NP\_253812.1; *V. vulnificus* (VV1\_0892) NP\_759868.1; *A. tumefaciens* (AGRO\_4553) EGL62776.1 and *S. maltophilia* (SmaI\_0123) YP\_002026511.1. Las bases encuadradas (recuadro negro) son el motivo conservado en el dominio AAA+. El asterisco verde indica el probable sitio de fosforilación.

## 2. Efecto de la mutación en *ntrC* en la quimiotaxis y movilidad.

Tal como ha sido descrito anteriormente, la movilidad dependiente del flagelo es uno de los determinantes en la formación de *biofilm* en varias especies de bacterias (Guttenplan and Kearns, 2013; Malamud *et al.*, 2011). A fin de determinar si la imposibilidad de la mutante *ntrC* de desarrollar un *biofilm* maduro estaba relacionada con su movilidad, realizamos dos tipos de ensayos. Uno de estos consistió en estimar el movimiento quimiotáctico de la bacteria hacia un extracto acuoso de hojas de pomelo que actuó como “agente atractante” (Fig. 3.3.A). Este extracto de pomelo provocó una respuesta quimiotáctica positiva evidente en la cepa silvestre que no se manifestó para la mutante *ntrC*. La respuesta quimiotáctica positiva se manifiesta como un halo turbio alrededor del sitio de siembra del extracto, que representa la acumulación de bacterias atraídas por el mismo. La deficiencia respuesta quimiotáctica en mutante *ntrC* fue restaurada con la complementación en *trans* (*c-ntrC*).

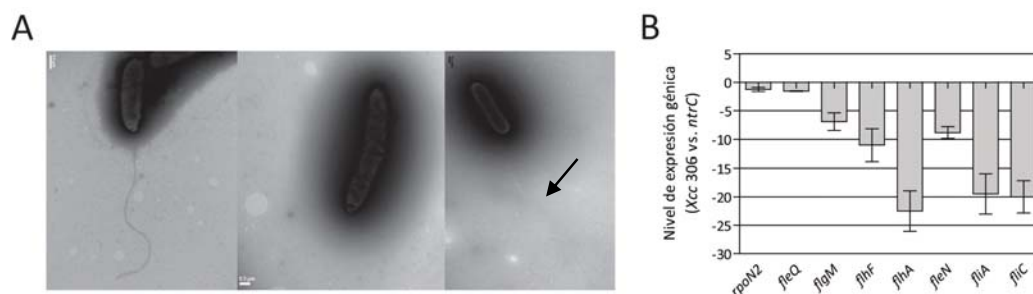
Esta imposibilidad de la mutante *ntrC* de moverse hacia el extracto de pomelo podía deberse, más allá de a no poder sentir la presencia del mismo, a un impedimento en su facultad de “nadar” hacia él. Teniendo esto último en consideración, el otro de los ensayos llevados a cabo tuvo como objeto establecer si la mutación en *ntrC* afectaba la capacidad de la bacteria de realizar *swimming* en un medio semisólido (Fig.3.3.B). Como resultado de este último, advertimos que la mutante *ntrC* redujo sustancialmente el *swimming* respecto de la cepa silvestre *Xcc 306*. La capacidad de movimiento se restableció en la cepa complementada (*c-ntrC*).



**Figura 3.3.** Efectos de la mutación *ntrC* en la movilidad. (A) Ensayo de quimiotaxis. Diez microlitros de extracto de pomelo fueron colocados en el centro de cada placa con solución de Hipromelosa y bacterias. Las fotografías fueron tomadas luego de 30 minutos a 1 hora. (B) Ensayo de *swimming*. Tres microlitros de cultivos en fase exponencial fueron colocados en centro de placas de medio NYBG 0,25% agar. Las fotografías se tomaron luego de 72h de incubación.

### 3. Implicancia de NtrC en la regulación de la síntesis del flagelo.

La incapacidad de la mutante *ntrC* de realizar *swimming* y la ausencia de una respuesta quimiotáctica son señales de un impedimento en el accionar del flagelo o deficiencias en el proceso de biosíntesis del mismo. Examinamos la presencia y la integridad del flagelo mediante microscopía electrónica de transmisión. La metodología utilizada para la visualización de las muestras se describe en la sección Materiales y Métodos. Las imágenes obtenidas por esta técnica mostraron la ausencia del único flagelo polar en la mutante *ntrC* que sí pudo visualizarse en la cepa silvestre y en la cepa complementada (Fig. 3.4.A).



**Figura 3.4.** Análisis de los efectos de la mutación en *ntrC* en la estructura flagelar y las expresiones de los genes del flagelo. (A) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la estructura flagelar en las cepas estudiadas, crecidas en medio PYM sin glucosa. La flecha negra indica el flagelo. (B) Niveles de expresión relativa de los genes flagelares (*rpoN2*, *fleQ*, *flgM*, *flhM*, *flhA*, *fleN*, *fliA* y *fliC*) entre la mutante *ntrC* respecto de la cepa silvestre Xcc 306, estimados por qRT-PCR. Los datos representan la media entre tres experimentos independientes y las barras de error el desvío estándar de estos datos.

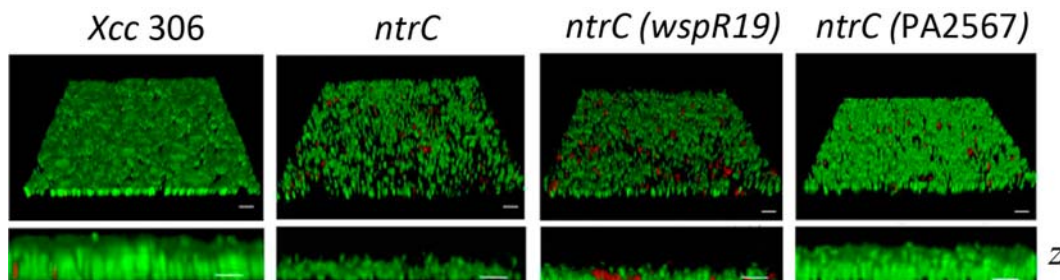
Los resultados obtenidos anteriormente refuerzan la hipótesis de que la cepa *ntrC* es incapaz de moverse porque carece de flagelo. Consecuentemente esto sugiere un rol de NtrC en la regulación de la síntesis de esta estructura. A fin de demostrar nuestra hipótesis, realizamos un análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes involucrados en la síntesis de flagelo entre la cepa mutante *ntrC* y la silvestre. Los niveles de expresión fueron estimados mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR). El análisis de los niveles de expresión se ilustran en la figura 3.4.B. El gen que codifica para la flagelina (principal proteína estructural), *fliC*, disminuye su expresión alrededor de 20 veces en la mutante *ntrC* respecto de la cepa silvestre. Los niveles de expresión de los genes de clase II *fliA*, *flhF*, *flhA* y *fleN* son significativamente más bajos en la cepa mutante *ntrC* en relación a la cepa silvestre. En los genes de clase I *rpoN2* y *fleQ* no existieron diferencias significativas entre las cepas estudiadas.

### 4. Vinculación de la regulación vía NtrC con el metabolismo del di-GMP cíclico.



El fenotipo defectivo de la mutante *ntrC* para *biofilm*, movilidad y quimiotaxis, nos llevó a examinar una posible relación entre NtrC y el segundo mensajero di-GMP cíclico, sabiendo que éste último regula dichos procesos en varias especies bacterianas (Romling, 2013; Sondermann, *et al.*, 2012). Para probar esta supuesta vinculación, planteamos en primera instancia alterar artificialmente la concentración de di-GMP-cíclico intracelular en las cepas en estudio. Para ello, utilizamos una estrategia previamente empleada por Ryan y colaboradores en *X. campestris* (Ryan *et al.*, 2006). La misma constó en la introducción, en nuestras bacterias, de un dominio en *trans* que posee actividad de diguanilato ciclasa, el WspR19 de *P. fluorescens*, o un dominio con actividad de la fosfodiesterasa de di-GMP-cíclico, el PA2567 de *P. aeruginosa*.

Analizamos las estructuras de *biofilm* generadas por estas cepas modificadas mediante microscopía confocal. Observamos que la expresión de PA2567 en la cepa mutante *ntrC* restauró, casi a semejanza de la cepa silvestre, su fenotipo defectivo respecto a la formación de *biofilm*. Por el contrario, la expresión de WspR19 en el *background ntrC*, no produjo cambios evidentes (Fig. 3.5). Del análisis con COMSTAT derivan conclusiones equivalentes a lo observado en las imágenes por microscopía confocal. La biomasa total y el espesor promedio de las cepas *ntrC* y *ntrC* WspR19 fueron similares entre sí y significativamente menores a los valores de *ntrC* PA2567. Los índices de *roughness* de *ntrC* y *ntrC* WspR19 fueron más altos que los de la cepa silvestre y que la *ntrC* PA2567, consistente con el hecho de que las dos primeras cepas no formaron estructuras maduras de *biofilm* (Tabla 3.1).



**Figura 3.5.** Efectos de la modulación del di-GMP cíclico en la formación de *biofilm*. Los niveles de di-GMP cíclico se alteraron por la expresión de la fosfodiesterasa de di-GMP cíclico PA2567 o por la diguanilato ciclasa WspR19. Las cepas se cultivaron en cámaras apropiadas y pasados 4 días de incubación, se tiñeron y se observaron al microscopio. El verde representa las células vivas (Syto-9) y el rojo las muertas (PI). Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia en tres dimensiones y las vistas de perfil (eje Z). Barras de escala, 5 micrómetros.

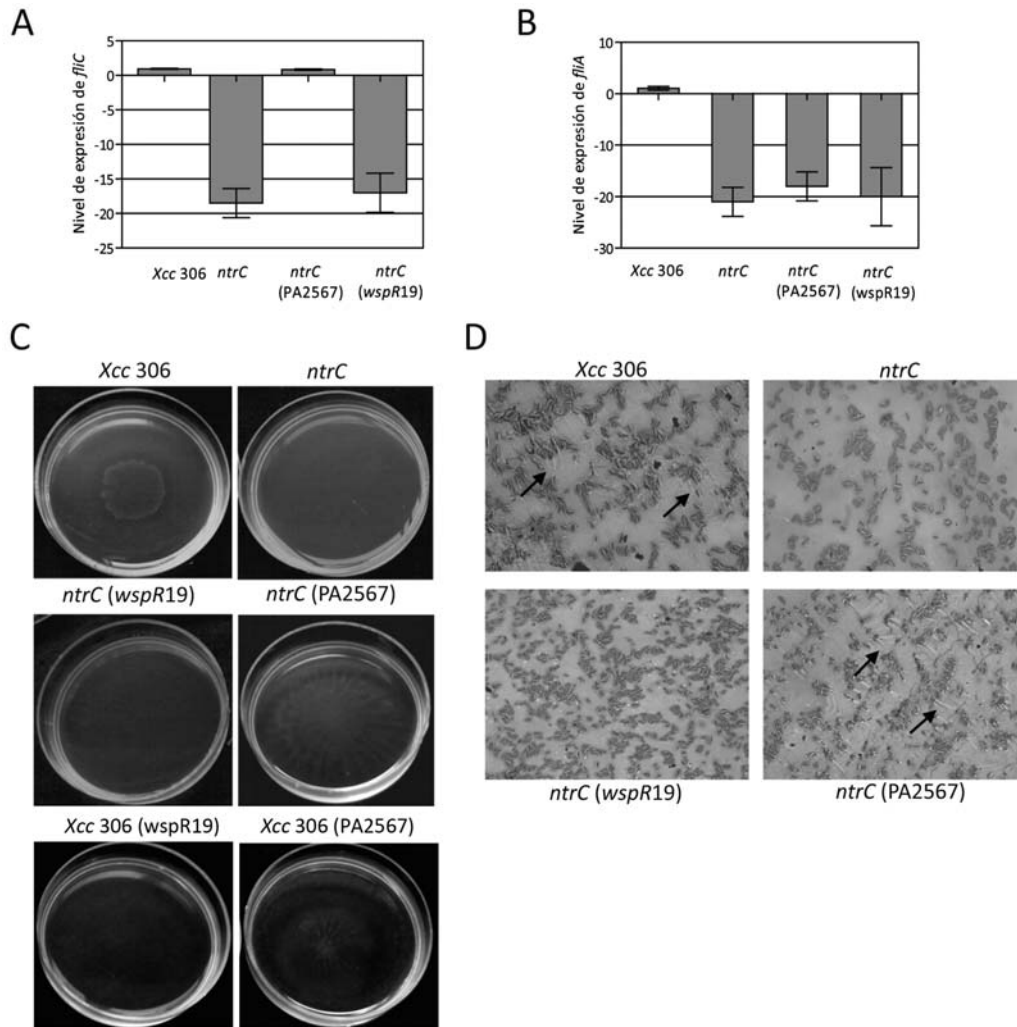
En estas cepas también examinamos el fenotipo de movilidad y la expresión de los genes vinculados con la estructura flagelar. Consistentemente con lo obtenido en el estudio de *biofilm* frente a la expresión de la fosfodiesterasa PA2567 en el *background* mutante, advertimos que se restauró a niveles de la cepa silvestre la expresión de *fliC* y la movilidad (Figs. 3.6.A y 3.6.C). La expresión de la ciclasa WspR19 no generó efectos



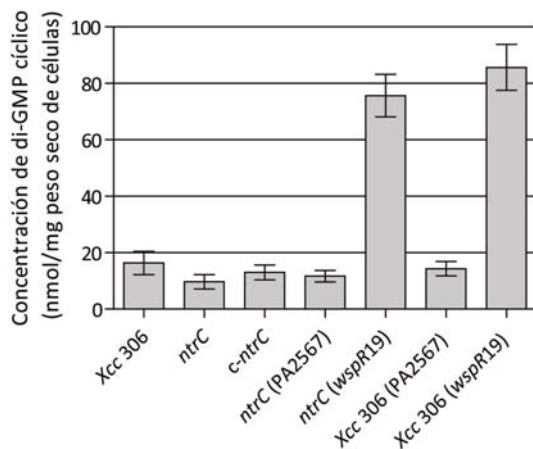
en la movilidad ni en la expresión de *fliC* en la mutante *ntrC*. El efecto en la movilidad de la expresión de la diguanilato ciclasa y de la fosfodiesterasa en la cepa silvestre es el mismo que en la mutante *ntrC* (Fig. 3.6.C). Como complemento a estos experimentos, las estructuras flagelares fueron observadas por microscopía óptica (Fig. 3.6.D). La presencia del flagelo se hizo evidente, de modo similar, en la cepa *ntrC* (PA2567) y en la cepa silvestre. Por el contrario, las cepas mutante y *ntrC* WspR19 no mostraron estructuras flagelares (Fig. 3.6.D).

La expresión de *fliC*, el gen de la flagelina, está regulada por FliA. Se determinaron los niveles de expresión de *fliA* en las cepas en estudio (Fig. 3.6.B), observándose que estos niveles siguieron el mismo comportamiento de la expresión del gen *fliC*. Contrariamente a lo esperado, la introducción de la actividad fosfodiesterasa en la *ntrC*, a pesar de haber restaurado la expresión de *fliC*, no generó efectos en la de *fliA*. Esto último, daría indicio de un mecanismo de regulación de la síntesis del flagelo río abajo de FliA.

Los cambios observados producto de la expresión de la actividad de diguanilato ciclasa WspR19 y fosfodiesterasa de di-GMP-cíclico PA2567, en el fenotipo de *biofilm* y movilidad, nos condujeron a determinar cuál era la concentración intracelular de este di-nucleótido en las distintas cepas. La determinación se realizó sobre extractos de cultivos en fase exponencial tardía utilizando el método de cromatografía líquida de alta presión; las condiciones y demás detalles de la técnica se describen en el apartado Materiales y Métodos. En las condiciones de estos ensayos, los niveles de di-GMP cíclico de la mutante *ntrC* no fueron estadísticamente diferentes de aquellos de la cepa silvestre (Fig. 3.7). Asimismo, la expresión de la fosfodiesterasa PA2567 no tuvo efectos significativos en ninguna de las cepas. No obstante, la expresión de la ciclasa WspR19 aumentó considerable y significativamente los niveles de di-GMP cíclico tanto en la cepa silvestre como en la mutante *ntrC*. No se manifestaron diferencias en el di-GMP cíclico intracelular de *ntrC* respecto de la cepa silvestre, aun cuando la primera mostró fenotipos defectuosos de *biofilm* y movilidad (que podrían haberse asociado con un incremento general de la concentración del di-nucleótido). De todas maneras, la reversión del fenotipo generada por la introducción de la actividad de PA2567 sugeriría que una mutación en *ntrC* sí afecta la concentración de di-GMP cíclico, pero este fenómeno estaría localizado dentro de la célula (Romling *et al.*, 2013). En el mismo sentido, la expresión de la ciclasa WspR19 en la cepa silvestre generó altos niveles celulares de di-GMP-cíclico, que quizás saturan todo el sistema de respuesta y como consecuencia causen el mismo fenotipo que la mutante *ntrC*.



**Figura 3.6.** Efectos de la modulación del di-GMP cíclico sobre la síntesis del flagelo y la movilidad. Los niveles de di-GMP cíclico se alteraron por la expresión de la fosfodiesterasa de di-GMP cíclico PA2567 o por la diguanilato ciclasa WspR19. (A) Nivel de expresión de *fliC* estimado en las distintas cepas por qRT-PCR. (B) Nivel de expresión de *fliA* estimado en las distintas cepas por qRT-PCR. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes. Las barras de error figuran el desvío estándar de las muestras. (C) Respuesta quimiotáctica de las cepas expresando la diguanilato ciclasa (WspR19) o la fosfodiesterasa de di-GMP cíclico (PA2567) respecto de la cepa silvestre (*Xcc 306*) y la mutante *ntnC*. (D) Tinción del flagelo en las distintas cepas y visualización por microscopía óptica; aumento: 1000X.



**Figura 3.7.** Cuantificación de los niveles de di-GMP cíclico celular.

5. Probable mecanismo de regulación de la concentración de di-GMP-cíclico a través de NtrC.

La influencia de *ntrC* sobre el nivel de di-GMP-cíclico en *Xcc* 306 podría llevarse a cabo de diferentes modos. Dadas las evidencias con las que contábamos, especulamos que uno de ellos podía ser a través de la acción de FliA. El gen que codifica para este regulador tuvo menor expresión en la mutante *ntrC* que en la cepa silvestre (Fig. 3.4.B). FliA es un factor  $\sigma^{28}$  que regula la transcripción de genes flagelares de clase III (como *fliC*). Por otro lado, existen reportes en *X. campestris* donde hallaron genes regulados por FliA involucrados en la síntesis o degradación de di-GMP-cíclico (Yang *et al.*, 2009). Específicamente, estos genes son cinco y codifican para proteínas con dominios GGDEF y uno para proteína con dominio HD-GYP (Yang *et al.*, 2009). Nosotros realizamos una búsqueda similar, en el genoma de *Xcc* 306, a la realizada por estos investigadores. Utilizamos también el *software* RSAT (Thomas-Chollier *et al.*, 2011) y los mismos parámetros de búsqueda. Los genes encontrados se listan en la **Tabla 3.2**. Identificamos los homólogos en *Xcc* de los seis genes hallados por Yang y colaboradores (2009). Cuatros de ellos (XAC0424, XAC0593, XAC0614 y XAC 1486) contienen la secuencia canónica (incluyendo al motivo GGDEF) asociada con la actividad diguanilato ciclasa. La secuencia de XAC1795 contiene al motivo GGDEF degenerado (DPTTF) y además contiene un dominio EAL que probablemente funcione en la degradación de di-GMP-cíclico. El homólogo de la proteína con dominio HD-GYP, XAC0350 posee además, aminoácidos conservados para la unión a metales y para la unión a di-GMP cíclico (Bellini *et al.*, 2014), dando indicios de ser enzimáticamente activa. Sumados a estos, se hallaron tres genes más (XAC1993, XAC1940 y XAC1184) que codifican para proteínas con dominios de síntesis o degradación de di-GMP cíclico candidatos a ser regulados por FliA (**Tabla 3.2**).

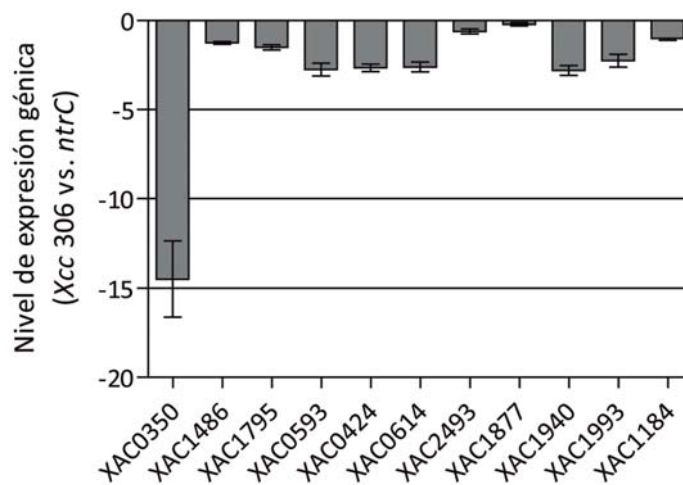
**Tabla 3.2:** Supuestos promotores FliA-dependientes en *Xcc* 306, obtenidos con el *software* RSAT.

Locus	Gen	Descripción	Weight
NP_640706	XAC0350	Proteína con dominio HD-GYP	10.4
NP_640779	XAC0424	Proteína GGDEF	10.7
NP_640945	XAC0592	Proteína hipotética	13.6
NP_640946	XAC0593	Proteína GGDEF	13.6
NP_640967	XAC0614	Proteína de la familia GGDEF	8.92
NP_641216	XAC0864	<i>pdxA</i> 4-hydroxytreonin-4-fosfato deshidrogenasa	9.8
NP_641520	XAC1184	Proteína con dominio EAL	9.9
NP_641521	XAC1185	Proteína hipotética	9.9
NP_641609	XAC1274	Kinasa de histidina –regulador de respuesta	9.1
NP_641733	XAC1398	Proteína hipotética	11
NP_641820	XAC1486	Proteína GGDEF	12.7
NP_641821	XAC1487	Proteína hipotética	12.7
NP_641966	XAC1634	Proteína hipotética	11.4
NP_642067	XAC1736	Proteína de unión a GTP Hfix	9.5
NP_642122	XAC1795	Proteína GGDEF y EAL	10

NP_642123	XAC1796	Endo-1,4-beta-mannosidasa (celulasa)	10
NP_642216	XAC1890	Metiltransferasa de quimiotaxis CheR	10.5
NP_642227	XAC1901	Proteína hipotética	9.4
NP_642233	XAC1907	Proteína de división del cromosoma	10.3
NP_642235	XAC1909	Homólogo de la proteína flagelar MotA	12.5
NP_642266	XAC1940	Proteína de la familia GGDEF	10
NP_642300	XAC1974	Proteína flagelar FliD	13.1
NP_642301	XAC1975	Flagelina FliC	9.4
NP_642315	XAC1989	Proteína flagelar FlgM	12.9
NP_642316	XAC1990	Proteína hipotética	12.9
NP_642319	XAC1994	Proteína tipo HrpX	10.2
NP_642320	XAC1993	Proteína GGDEF y EAL	10.2
NP_642322	XAC1996	Proteína de quimiotaxis Mcp	10.5
NP_642427	XAC2110	Regulador transcripcional de la familia LuxR	8.8
NP_642648	XAC2321	Hidrolasa	9.10
NP_642854	XAC2539	Proteína hipotética	9.3
NP_642906	XAC2593	Factor de iniciación de la traducción IF-3	8.9
NP_642931	XAC2618	VirB11	8.2
NP_643021	XAC2712	Proteína hipotética	9.9
NP_643357	XAC3048	Proteína <i>heat shock</i>	10
NP_643411	XAC3102	Proteína del pilus <i>pilG</i>	8.9
NP_643412	XAC3103	<i>gshB</i> glutatión sintetasa	8.9
NP_643621	XAC3314	Proteína hipotética	9
NP_643644	XAC3337	Proteína hipotética	9.5
NP_643756	XAC3449	Proteína de quimiotaxis Tar	12.9
NP_644000	XAC3693	Proteína del motor flagelar MotA	11.4
NP_644504	XAC4205	Proteína hipotética	8.9

(\*) En color azul se indican los homólogos en *X. campestris*.

Estimamos los niveles de expresión (por qRT-PCR) de los genes que identificamos como pertenecientes al regulón de FliA, en la cepa mutante *ntrC* respecto de la cepa silvestre. De este grupo de genes, XAC0350 mostró la mayor diferencia de expresión: alrededor de 14 veces menos en la mutante *ntrC* que en la cepa silvestre. La expresión de los genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF se redujo no más de 2,5 veces. Para XAC1184, gen que codifica para una proteína con dominio EAL, no existieron diferencias de expresión entre la mutante *ntrC* y la cepa silvestre (Fig. 3.8). Complementariamente, analizamos dos genes cuya regulación no depende de FliA pero cuya actividad está relacionada con la modificación de la concentración de di-GMP cíclico: XAC2493, que codifica para una proteína de la familia HD-GYP, y XAC1877 (*rpfG*), cuyo producto es una fosfodiesterasa de di-GMP cíclico. La expresión de estos últimos no presentó diferencias entre las cepas estudiadas (Fig. 3.8).



**Figura 3.8.** Efecto de la mutación *ntrC* en la expresión de los genes que codifican para proteínas con dominios EAL, HD-GYP y GGDEF, relacionados con el metabolismo del di-GMP cíclico. XAC0350, XAC1877 (RpfG) y XAC2493 codifican para proteínas con dominios HD-GYP; XAC0424, XAC0593, XAC0614, XAC1486 y XAC1940 codifican para proteínas con motivos GGDEF; XAC1184 y XAC1993 codifican para proteínas con dominios EAL; XAC1785 lo hace para una proteína con dominios EAL y GGDEF degenerado. Se esquematiza el nivel de expresión de cada uno de estos genes en la mutante *ntrC* respecto de la cepa silvestre de tres experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las muestras.

La disminución radical de la expresión de XAC0350 en la mutante *ntrC* supone una vinculación entre el producto de este gen y NtrC. NtrC estaría regulando directa o indirectamente su expresión y consecuentemente estaría afectando los niveles de di-GMP cíclico de la célula. Sin embargo, para plantear esta hipótesis es necesario comprobar que el dominio fosfodiesterasa de di-GMP cíclico de la proteína codificada por XAC0350 es funcional. Con este propósito, examinamos el efecto de la expresión en *trans* de XAC0350 en la mutante *rpfG* de *X. campestris*. RpfG es uno de los componentes del sistema RpfC/RpfG, que regula la virulencia y la formación de *biofilm*, a través del sensado y respuesta al factor difusible DSF (Ryan *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2000). Cuando RpfG se activa degrada di-GMP cíclico. Mutaciones en el dominio HD-GYP generan un aumento de di-GMP cíclico celular. A altas concentraciones del dinucleótido, se reprime la actividad endoglucanasa de la bacteria y frente a la expresión de fosfodiesterasas activas este efecto se revierte (Ryan *et al.*, 2006). Se clonó entonces el dominio HD-GYP de XAC0350 de *Xcc 306* en un plásmido de bajo número de copias (pLARF3), bajo la actividad del promotor del mismo, y se transformó *X. campestris rpfG* (los detalles se describen en la sección Materiales y Métodos). Se logró así un aumento ligero pero significativo de la actividad de la endoglucanasa (**Tabla 3.3**) indicando que XAC0350 es una fosfodiesterasa de di-GMP cíclico.

**Tabla 3.3.** Evaluación de XAC0350 como una potencial fosfodiesterasa de di-GMP cíclico.

Cepa	Actividad endoglucanasa (unidades arbitrarias)
<i>X. campestris</i> 8004	42 ± 3.5 (a)
<i>X. campestris rpfG</i> (pLAFR3)	2.3 ± 0.01 (b)
<i>X. campestris rpfG</i> (XAC0350)	4.2 ± 0.35 (c)

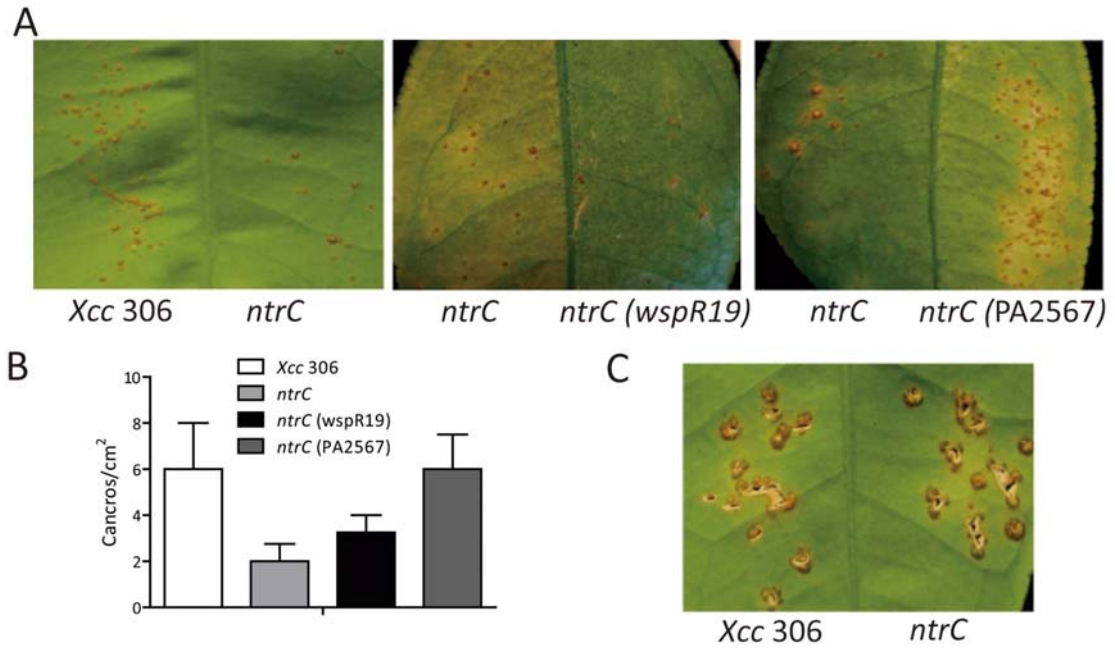
Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres réplicas; las diferentes letras indican las diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).

## 6. Efecto de NtrC en la virulencia de *Xcc*.

A fin de determinar la implicancia de NtrC en la patogénesis de *Xcc*, realizamos infecciones en hojas jóvenes de plantas de pomelo (*C. paradise* cv. Macfadyen). Utilizamos dos métodos de infección: hisopado de la solución bacteriana, de concentración conocida, sobre una hoja previamente herida con una aguja o hisopado de la suspensión bacteriana sobre hojas sanas.

Los síntomas generados por las distintas cepas testeadas se analizaron pasados los 30 días de la infección. A través del método de hisopado sobre la hoja herida, no se observaron diferencias entre la cepa mutante *ntrC* y la cepa silvestre; en ambos casos se desarrollaron canchros en cantidad semejante (Fig. 3.9.C). Las diferencias se hallaron cuando se infectaron hojas sanas por hisopado. La mutante *ntrC* mostró una reducción significativa de los canchros generados respecto de la cepa silvestre (Fig. 3.9.A). Considerando este último método de infección, la introducción de la función ciclasa de di-GMP-cíclico, WspR19, en la mutante *ntrC* no alteró significativamente la habilidad de esta última de generar canchros (Fig.3.9.A). No obstante, la actividad fosfodiesterasa PA2567 expresada en *ntrC* restauró la capacidad de infección de la misma (Fig. 3.9.A).

A efectos de obtener un resultado más preciso de la infección originada por cada cepa, realizamos una cuantificación del número de canchros luego de 20 días de infección. Como vemos en la figura 3.9.B, la mutante *ntrC* fue la más comprometida viendo severamente reducida su producción de canchros. La introducción de WspR19 en *ntrC* no recuperó la virulencia de esta última. Contrariamente, la actividad fosfodiesterasa PA2765 en *ntrC* llevó los valores de la cantidad de canchros generados por la mutante a números similares a aquellos de la cepa silvestre (Fig. 3.9.B).



**Figura 3.10.** Ensayos de infección en plantas de pomelo. (A) Suspensiones bacterianas de  $10^6$  UFC/ml de la cepa silvestre *Xcc 306*, la mutante *ntrC*, *ntrC* (PA2567) y *ntrC (wspR19)* fueron esparcidas con un hisopo del lado abaxial de hojas sanas. Las fotografías fueron tomadas 30 días luego de la infección. (B) Cuantificación del número de canchros generados en  $1\text{cm}^2$  por cada cepa en estudio, luego de 20 días de infección. La cuantificación se realizó sobre 20 hojas para cada cepa, de 4 ensayos independientes. Las barras de error representan el error estándar de las muestras. (C) Suspensiones bacterianas de  $10^6$  UFC/ml de la cepa silvestre *Xcc 306* y de la mutante *ntrC* fueron esparcidas con un hisopo de lado abaxial de hojas previamente lastimadas con aguja. Las fotografías fueron tomadas luego de 30 días posteriores a la infección.

## CAPÍTULO III

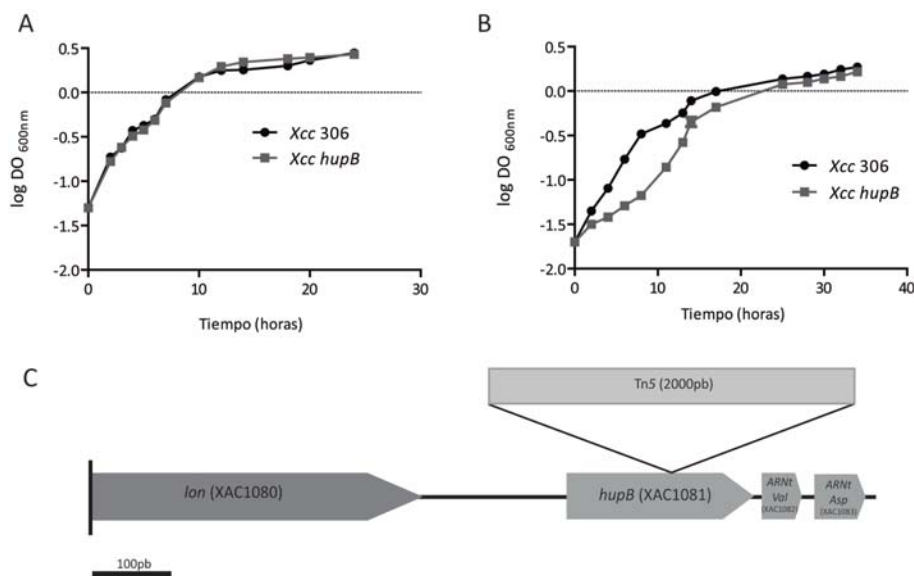


## Caracterización fenotípica de la mutante *hupB* de *Xcc* e implicancia del gen en la producción de factores de virulencia.

1. Identificación de una mutante *hupB* a partir de un *screening* en búsqueda de cepas defectivas en la formación de *biofilm*.

La mutante en el gen XAC1081, *hupB*, fue seleccionada a partir de un *screening* realizado sobre un *pool* de mutantes de *Xcc* 306, cuyo fin era identificar aquellas con menor capacidad de adhesión a sustrato en relación a la cepa silvestre. La librería de mutantes que fue analizada se construyó por inserción del transposón Tn5 (Malamud, 2011). Los detalles de este *screening* se resumen en el capítulo II de esta tesis, donde se explica la forma de obtención de la mutante *Xcc hrpM*, también encontrada mediante la misma metodología. Como método de *screening* se eligió la técnica de tinción con cristal violeta, que permite cuantificar las bacterias adheridas a microplacas de poliestireno.

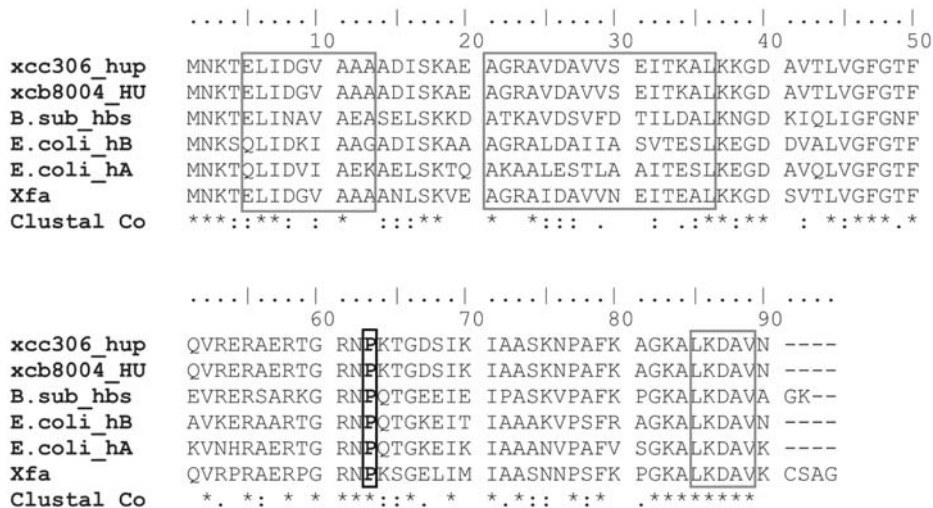
Por otro lado, se descartó que las mutantes tuvieran irregularidades de crecimiento pudiendo ser ésta la causa de su fenotipo defectivo. En el caso particular de la mutante *hupB*, no mostró diferencias de crecimiento respecto de la cepa silvestre cuando fue cultivada en medio rico (Fig. 4.1.A). En medio mínimo Y (medio en el que se realizan los ensayos de *biofilm*), la fase de crecimiento exponencial está alterada respecto de la cepa silvestre. A pesar de ello, *hupB* logra llegar a valores de densidad óptica equivalente a la cepa silvestre en casi el mismo período (Fig. 4.1.B).



**Figura 4.1.** Curvas de crecimiento de *Xcc* 306 y *Xcc hupB* en (A) medio rico PYM y (B) medio mínimo Y. (C) La mutante *hupB* fue obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5. El sitio de inserción de este transposón se localiza alrededor de los 141 pares de bases río abajo del codón de inicio de la traducción. En el esquema se muestra el entorno génico, mostrando parte del gen *lon*; se respeta la escala salvo para el caso del transposón.

Posteriormente, se corroboró la única inserción del transposón en el genoma de la mutante y se determinó el sitio de inserción del mismo, mediante PCR inversa. El Tn5 se ubicó a 141 pares de bases río abajo del codón de inicio de la transcripción del gen XAC1081 (Fig. 4.1.C). La inserción del transposón puede generar un efecto polar y como consecuencia, la transcripción normal de los genes lindantes podría verse afectada. A fin de descartar este efecto, en primera instancia, se tuvo en cuenta la posición del Tn5 y la presencia de los promotores de la región – predichos a través del *software Bprom* (Solovyev and Salamov, 2011)- . El posible efecto polar fue descartado por complementación de esta mutante con el plásmido pLAFR3 (de bajo número de copias) portando una copia del gen endógeno bajo la actividad de su propio promotor.

El gen XAC1081, *hupB*, codifica para una proteína tipo histona bacteriana, homóloga a la subunidad  $\beta$  de la proteína HU (del inglés: *heat-unstable nucleoid protein*). Posee una secuencia y estructura conservadas con respecto a sus homólogas, no sólo en especies del mismo género (como *X. campestris*) o especies emparentadas (como *X. fastidiosa*), sino que también en otras bacterias como la *E. coli* y *Bacillus subtilis* (especie Gram positiva) (Fig. 4.2). Típicamente, las HU son homodímeros, excepto en *E. coli* y algunas enterobacterias, donde funcionan como heterodímeros (Grove, 2011). Estructuralmente, según se describe en la bibliografía (Swinger *et al.*, 2003), HU adopta una conformación compacta enlazando a los dos monómeros entre sí. Dos alfa hélices de cada monómero forman el cuerpo de la proteína que se limita por dos láminas beta que se extienden y son las que “abrazan” al ADN. Una hélice alfa (de corta secuencia) es la que completa la estructura. Según Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 1992), un aminoácido esencial en el “acople” al ADN es una prolina (P<sub>63</sub>), resultando su sustitución en una alteración significativa en la unión al ADN. Todos estos elementos anteriormente descritos parecen conservarse en la proteína codificada por el gen XAC1081 (Fig. 4.2).



**Figura 4.2.** Alineamiento múltiple de los homólogos de *hupB*. Los recuadros grises indican las tres secuencias pertenecientes a las estructuras de hélices alfa (Grove, 2011). La prolina (que se intercala al ADN) se indica con un recuadro negro. Referencias y NCBI protein ID: xcc306\_hup, *X. citri* subsp. *citri* cepa 306 (AAM35959); xcb8004\_HU, *X. campestris* pv. *campestris* cepa 8004 (AAY50306); Bsub\_hbs, *Bacillus subtilis* cepa 168 (NP\_380160); E.coli\_hB, *hupB* en *Escherichia coli* cepa K-12 MG1655 (NP\_414974); E.coli\_hA, *hupA* en *E. coli* cepa K-12 MG1655 (NP\_418428); Xfa, *X. fastidiosa* cepa 9a5c (AAF84000).

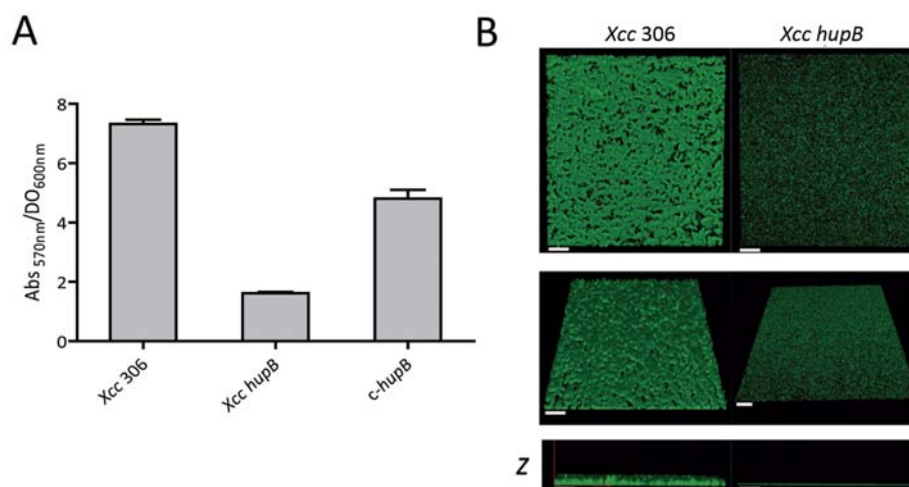
## 2. Impacto de la mutación en el gen *hupB* en el proceso de formación de *biofilm*.

Como se ha descrito en secciones anteriores de esta tesis, el proceso de formación de *biofilm* es dinámico, implica varios pasos y se ve influenciado por múltiples factores. La adhesión de la bacteria al sustrato es uno de los primeros pasos que da comienzo a lo que luego derivará en una estructura madura en forma de “seta” de hongo. Esta última estructura es lo que llamamos *biofilm* maduro.

Estudiamos en detalle el *biofilm* formado por la mutante *hupB*. Tal como se vio en el *screening*, su capacidad de adhesión fue considerablemente menor al compararla con la cepa silvestre. La cepa complementada, *c-hupB*, pudo reestablecer parcialmente este fenotipo defectivo (Fig. 4.3.A).

Se profundizó el estudio de *biofilm* en esta cepa mediante la observación de estructuras formadas luego de cuatro días de cultivo. Para ello, las distintas cepas se cultivaron en medio mínimo Y, en cámaras especiales, durante ese período. Luego, las mismas se visualizaron mediante SCLM. Las imágenes obtenidas se analizaron con el *software* COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) para obtener detalles de las estructuras. Los parámetros estimados por este *software* fueron explicados en el capítulo II de esta tesis. Determinamos biomasa total, espesor promedio, coeficiente de *roughness* y distancia de difusión promedio de cada *biofilm*. La distancia de difusión promedio es la mínima distancia de cada célula del *biofilm* hacia el vacío, representada por el

promedio de la distancia mínima entre un *pixel* con biomasa y uno libre de la misma (Yang *et al.*, 2000). Este parámetro es de suma importancia en el *biofilm* ya que es en el vacío donde las células podrían potencialmente hallar nutrientes, oxígeno, etc. Tanto el coeficiente de *roughness* como la distancia de difusión promedio, son parámetros de valor arbitrario (sin unidades).



**Figura 4.3.** (A) Ensayo de adhesión en microplaca de la cepa silvestre (*Xcc 306*), la cepa mutada (*hupB*) y complementada (*c-hupB*). Las barras de error representan el error estándar de la media entre tres ensayos independientes. (B) Imágenes del *biofilm* formado por la cepa silvestre y la cepa mutante *hupB* obtenidas por SLCM. Las bacterias fueron cultivadas durante 4 días en cámaras especiales sin agitación, teñidas con el *BacLight LIVE/DEAD viability kit* para poder ser visualizadas. En los paneles se muestran a las estructuras vistas desde distintos enfoques. Los paneles superiores muestran el *biofilm* visto desde arriba de la placa; los medios, visto en tres dimensiones; los inferiores, muestran la vista desde el eje z. Barra de escala= 5µm.

La cepa mutante no llegó a formar estructuras maduras como la cepa silvestre (Fig. 4.3.B). El *biofilm* formado por *hupB* resultó ser más delgado (Fig 4.3.B); su espesor promedio es significativamente menor que el de la cepa silvestre, y dado que su coeficiente de *roughness* también es menor, concluimos que esta estructura no es heterogénea (Tabla 4.1). Se supone que cuanto mayor es la distancia de difusión promedio más compacto es el *biofilm*. Si comparamos este parámetro para ambas cepas, *Xcc 306* posee una mayor distancia de difusión promedio que la mutante. Esto último, estaría indicando una mayor compactación de este *biofilm* en la cepa mutada, propio de estructuras maduras.

**Tabla 4.1.** Análisis de *biofilm* por COMSTAT.

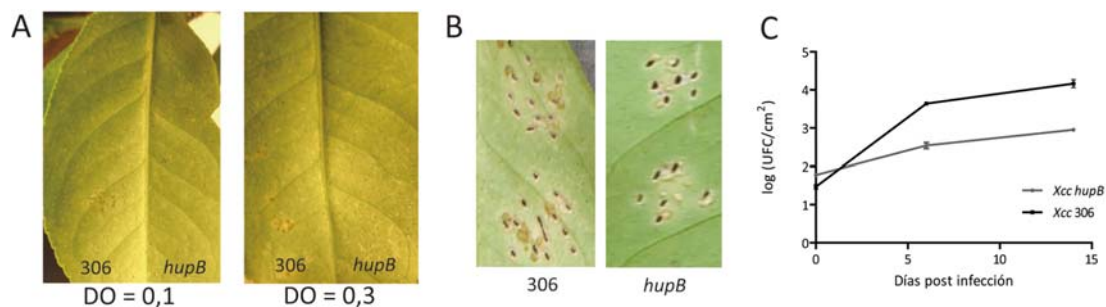
Cepa	Biomasa ( $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ )	Espesor promedio ( $\mu\text{m}$ )	Coefficiente de <i>roughness</i>	Distancia de difusión promedio
Xcc 306	12,78 $\pm$ 1,26	9,1 $\pm$ 0,84	0,74 $\pm$ 0,05	2,06 $\pm$ 0,15
<i>hupB</i>	6,2 $\pm$ 1,25	5,84 $\pm$ 1,3	0,26 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,2

Las medias son estadísticamente significativas con un  $P < 0,05$ , para todos los casos.

### 3. Efecto de la mutación en *hupB* en la virulencia de la bacteria.

Con el objetivo de analizar el efecto de la mutación *hupB* en la virulencia, infectamos plantas de limón (*C. limon* cv. Eureka) con la cepa mutada y la cepa silvestre. Suspensiones bacterianas de ambas fueron utilizadas para hisopar hojas jóvenes. Se utilizaron dos densidades ópticas (estimadas a 600 nm) diferentes (0,1 y 0,3). A los 16 días posteriores a la infección, la cepa silvestre desarrolló canchales para ambas concentraciones de suspensión. Mientras que, para la mutante *hupB* no se observó lesión alguna en ninguno de los casos (Fig. 4.4.A). Adicionalmente, se utilizó otro método de infección: se hisoparon las suspensiones bacterianas (de una concentración determinada), pero sobre hojas jóvenes que habían sido previamente lastimadas con una aguja. De este modo, a través de las lesiones se favorece la entrada de la bacteria al mesófilo de la hoja. A los 30 días posteriores a la infección, los canchales generados por la cepa silvestre son notorios, mientras que para la cepa mutante *hupB*, su número es significativamente reducido (Fig. 4.4.B).

Por otra parte, se comparó el crecimiento de las cepas en plantas de limón. Se infectaron hojas jóvenes de la planta, por el método que requiere de heridas previas en el tejido vegetal. A los 0, 6 y 14 días posteriores a la infección se extrajo el material vegetal, se procesó y se determinó el número de UFC (unidades formadoras de colonias). Los resultados graficados en la figura 4.4.C muestran diferencias significativas entre la mutante *hupB* y la cepa silvestre a partir de los primeros días posteriores a la infección (6 dpi). A los 14 dpi, la cepa silvestre pudo aumentar su población en más de tres órdenes mientras que la mutante *hupB* sólo lo hizo en casi un orden.



**Figura 4.4.** Ensayos de virulencia en plantas de limón. (A) Infección por hisopado de hojas sanas. En el panel izquierdo se encuentran las hojas infectadas con las suspensiones bacterianas de la cepa silvestre (*Xcc* 306) y la cepa mutante *hupB*, de  $DO_{600nm}$  de 0,1 (aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/ml); en el panel derecho, las hojas infectadas con las suspensiones de  $DO_{600nm}$  de 0,3 (aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC/ml). Las fotografías fueron tomadas a los 16 días posteriores a la infección (dpi). (B) Infección por hisopado de hojas previamente heridas. Las hojas fueron infectadas con suspensiones bacterianas de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de la cepa silvestre y mutante *hupB*, respectivamente. Las fotografías fueron tomadas a los 30 dpi. (C) Crecimiento in vivo en hojas de limón de la cepa mutante *hupB* y la silvestre. Suspensiones bacterianas de  $1 \times 10^8$  UFC/ml aproximadamente fueron hisopadas sobre hojas previamente heridas y se determinó la población bacteriana a los 0, 6 y 14 dpi. Tres experimentos independientes fueron llevados a cabo con resultados similares.

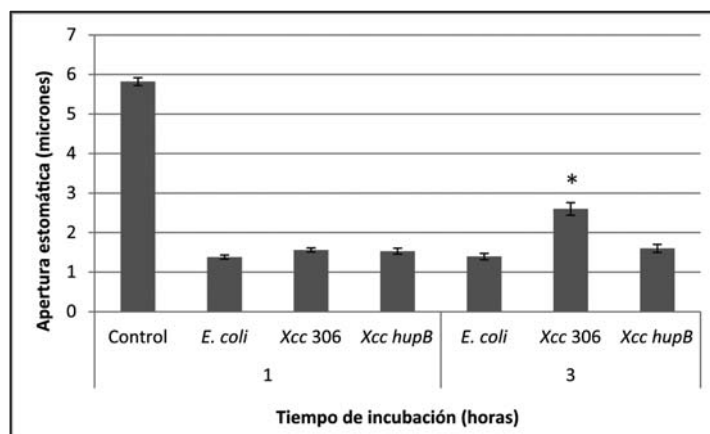
#### 4. Efecto del producto de *hupB* sobre la modulación de la apertura estomática.

En nuestro laboratorio, se estudia un factor de virulencia producido por el género *Xanthomonas* spp., que puede interferir con el cierre estomático que es inducido por la bacteria o por ABA (ácido abscísico). Al igual que la coronatina, como se describió en la sección introductoria de esta tesis, actuaría como modulador de la apertura estomática. Cuando se incubaron epidermis de *Arabidopsis* con suspensiones bacterianas, las bacterias vivas de *X. campestris* y los extractos de acetato de etilo de sobrenadantes de cultivos de las mismas fueron capaces de revertir el cierre de los estomas inducidos por la bacteria, el LPS o el ABA (Gudesblat *et al.*, 2009). Aún no ha sido dilucidada la naturaleza y estructura de este factor de virulencia.

La mutante *hupB* no es capaz de generar síntomas en la hoja sana cuando se infecta por hisopado con la solución bacteriana. Esto último ocurre aun cuando las concentraciones de la suspensión son altas (Fig. 4.4.A). Contando con estos datos, cabe la posibilidad de que *Xcc* se vea imposibilitada de ingresar al interior de la hoja por la vía estomática. Se consideró entonces, observar cómo respondían los estomas al tratamiento con suspensiones de la cepa silvestre y de la mutante *hupB*. El objetivo fue evaluar si el producto de este gen *hupB* estaba involucrado de alguna manera en la regulación de la apertura estomática.

El sistema utilizado fue la epidermis de *Vicia faba*. Estas epidermis fueron incubadas con las suspensiones bacterianas de concentración determinada. Se midió la apertura estomática a la hora y a las tres horas de incubación. Luego de una hora de incubación,

producto de la detección de la “presencia del patógeno”, los estomas se cerraron para todas las cepas. A las tres horas de incubación, la cepa silvestre fue capaz de inducir la reapertura estomática mientras que la *hupB* se vio imposibilitada de hacerlo. Esto último demostró que la *hupB* fue incapaz de modular la apertura estomática (Fig. 4.5), posiblemente porque la proteína HupB esté involucrada en la regulación del factor de *Xanthomonas* capaz de revertir el cierre estomático y cuya estructura aún desconocemos.



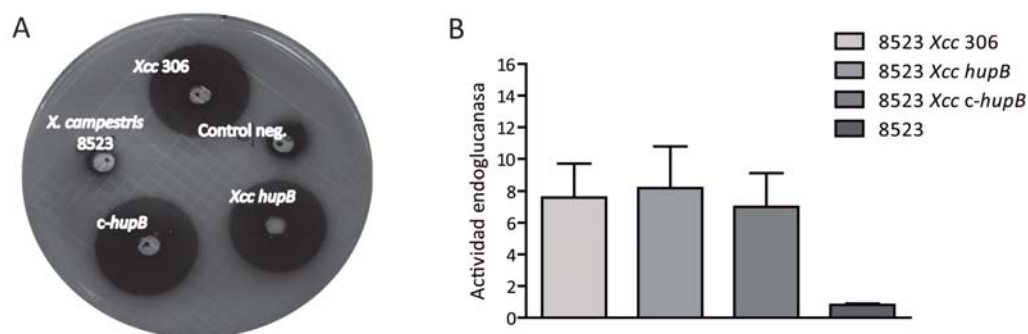
**Figura 4.5.** Medición de la apertura estomática a la hora y a las tres horas de incubación con las suspensiones de las distintas cepas: *E. coli* (control negativo), *Xcc 306* y la mutante *hupB*. Control, indica el control positivo de apertura. Las barras de error indican el error estándar de la media. El asterisco indica a la media estadísticamente significativa con un  $P < 0,05$ .

##### 5. Análisis de la producción de DSF la mutante *hupB*.

El DSF es la molécula señal producida por *Xanthomonas* spp. involucrada en el QS. Los niveles de esta molécula regulan la expresión de los genes vinculados con la virulencia en el género. Dado que la mutante mostró ser menos virulenta que la cepa silvestre, nos propusimos estudiar una posible vinculación entre la actividad de *hupB* y la síntesis de DSF. Con este fin, estimamos los niveles relativos de DSF en los sobrenadantes de cultivos de las cepas en estudio. Evaluamos entonces, la capacidad de estos sobrenadantes de restaurar la actividad endoglucanasa de la cepa mutante *X. campestris rpjF 8523*, siendo ésta una manera indirecta de medir la producción de DSF (Barber *et al.*, 1997). Esta última, no sintetiza DSF y es deficiente en la producción de endoglucanasa, de modo que la adición de DSF exógena a los cultivos de esta cepa restaura la producción de la enzima en cuestión (Barber *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 2000).

El DSF fue extraído del sobrenadante (libre de células) mediante una extracción con acetato de etilo, a partir de cultivos en medio rico en fase estacionaria de las distintas

cepas de *Xcc* (Barber *et al.*, 1997) (los detalles se describen en la sección Materiales y Métodos). El acetato de etilo de los extractos fue evaporado, éstos fueron resuspendidos en etanol 70% (v/v) y utilizados para complementar a la mutante *X. campestris rpfF* 8523. Se estimó la capacidad de restaurar la deficiencia en la actividad endoglucanasa de la cepa *Xcc* 8523. La actividad de la enzima fue estimada a partir de la medición del halo de degradación formado por cada muestra en placas de carboximetilcelulosa. Los resultados que obtuvimos por medio de esta estimación indirecta de la producción de DSF revelan que no hubo una diferencia visible entre la cepa mutante en histonas y la cepa silvestre (Fig. 4.6). Por lo tanto, la mutación en el gen *hupB* no afecta la síntesis de DSF en *Xcc*.



**Figura 4.6.** Restauración de la actividad endoglucanasa de *X. campestris rpfF* 8523 cultivada en presencia de los distintos extractos de las cepas de *Xcc*. (A) El sobrenadante de los cultivos de *X. campestris rpfF* 8523 que fueron cultivados con los sobrenadantes de las cepas de *Xcc* en estudio fue sembrado en placas de carboximetilcelulosa 0,125%-agar. Luego de 24hs de incubación a 28 °C, el área del halo de degradación fue estimada y relativizada al control. (B) Diámetro del halo de degradación para tres ensayos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media de los datos.

## 6. Influencia de *hupB* en la síntesis de polisacáridos.

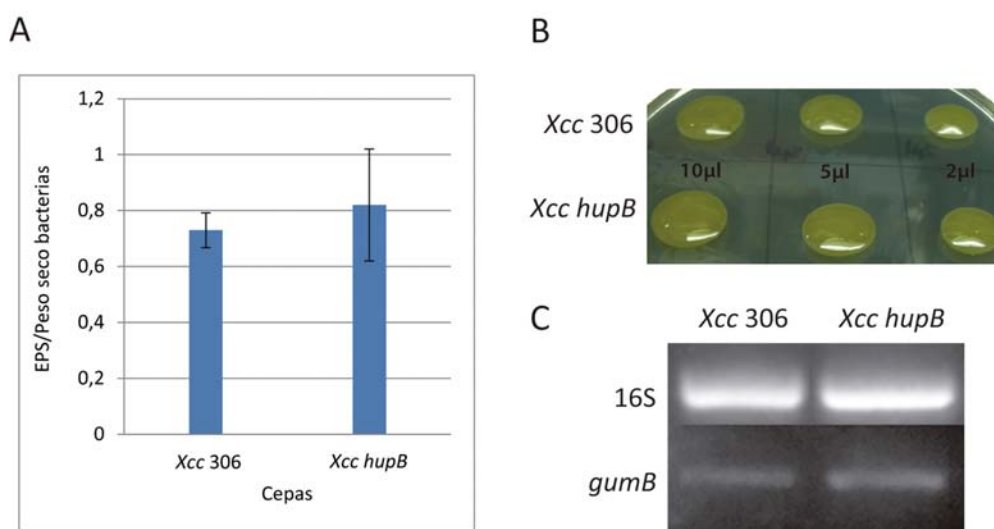
Como ya se ha descrito en la sección introductoria de esta tesis, los polisacáridos sintetizados por *Xanthomonas* spp. son importantes en la formación de *biofilm* y la virulencia de la bacteria. Estimamos, entonces, la producción de xantano, LPS y glucano cíclico  $\beta$ -(1,2).

La producción *in vivo* de xantano fue determinada para cada una de las cepas en estudio. Las bacterias se cultivaron en medio rico hasta su fase estacionaria. De los sobrenadantes de estos cultivos, a partir de una precipitación etanólica, se extrajo el xantano. Posteriormente, tanto el xantano extraído como las células fueron liofilizados. Si observamos la cantidad de xantano relativizada a la masa de células, vemos que existió una ligera tendencia de la cepa *hupB* a producir más xantano que la cepa silvestre, pero ésta no es estadísticamente significativa (Fig. 4.7.A). Asimismo, al



analizar la producción de xantano en placa de medio NYGB suplementado con 2% de glucosa, vemos que el aspecto mucoso de las colonias fue similar para ambas (Fig. 4.7.B).

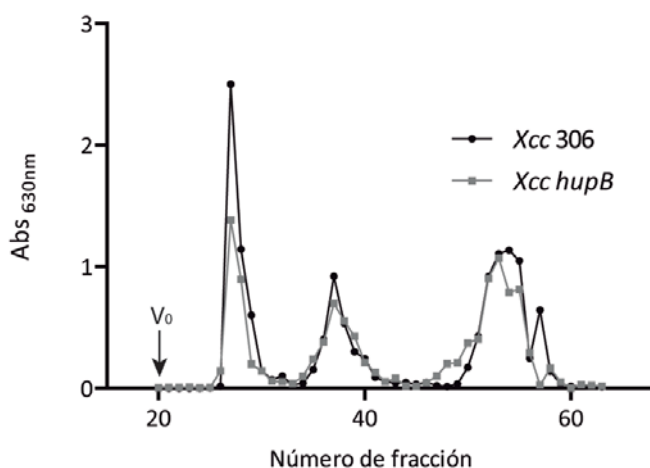
Como suplemento de los datos anteriores, se examinó la expresión del primero de los genes del operón *gum*: *gumB* (Katzen *et al.*, 1996). Se empleó el método de RT-PCR (los detalles se describen en la sección de Materiales y métodos) tomando como material de partida ARN extraído de cultivos en fase estacionaria. Los niveles del mensajero de *gumB* mostraron ser equivalentes en ambas cepas (Fig.4.7.C). Conjuntamente, todos estos resultados, evidencian que esta mutación en *hupB* no afectó la producción de xantano.



**Figura 4.7.** (A) Resultados de la precipitación etanólica de xantano de cultivos de la cepa silvestre (*Xcc* 306) y la cepa mutante *hupB*. Se expresan en miligramos de EPS (xantano) relativizados a los miligramos de células cultivadas en medio rico PYM (liofilizadas). (B) Distintos volúmenes (2, 5 y 10 mililitros) de cultivos en medio rico, de las cepas silvestre y mutante, fueron sembrados en medio NYG suplementado con 2% de glucosa. Las fotografías que muestran la producción de xantano en estas placas fueron tomadas 48 horas post siembra. (C) Estimación de la expresión de *gumB* mediante RT-PCR. El mensajero del gen ribosomal 16S fue utilizado como control.

Otro de los polisacáridos producidos por *Xanthomonas* spp. es el glucano cíclico  $\beta$ - $(1,2)$ . Con el objetivo de estudiar si la mutación en el gen *hupB* afectaba la síntesis del mismo, se aisló esta molécula de las cepas en estudio. La metodología de aislamiento ya fue descrita en el capítulo I de esta tesis. Brevemente, se extrajeron los azúcares totales de cultivos de 24 horas con y luego fueron sometidos a una cromatografía de exclusión molecular; los detalles del procedimiento se describen en el apartado Materiales y Métodos. La cantidad de carbohidratos de cada fracción resultante de la columna se estimó mediante la reacción de antrona.

El perfil de elución de la cepa mutante *hupB* se muestra junto al de la cepa silvestre, en la figura 4.8. Como previamente se ha descrito en el capítulo I de esta tesis, el primer pico de elución, que abarca las fracciones 26-30, se encuentran los sacáridos de alto peso molecular (Talaga *et al.*, 1996). El segundo pico de elución (fracciones 35-41) fue demostrado que pertenece a los glucanos cíclicos (Vojnov *et al.*, 2001). Finalmente, el tercer pico (fracciones 50-57) posee las moléculas de bajo peso molecular (Vojnov *et al.*, 2001). Si comparamos el pico correspondiente a los glucanos cíclico de ambas cepas, observamos que no hay diferencia entre ellas. Concluimos, entonces, que la mutación en el gen *hupB* no afectó la producción de estos sacáridos.



**Figura 4.8.** Análisis de la producción de glucanos cíclicos de la mutante *hupB*. Perfil cromatográfico (Biogel P4) de cada una de las cepas mutante (*hupB*) y silvestre (306).

Se ha demostrado que el LPS juega un rol importante en las interacciones entre bacterias y plantas (Wang *et al.*, 2007). En *Xcc*, las mutantes de LPS son menos virulentas y su capacidad de formación de *biofilm* es muy pobre (Casabuono *et al.*, 2011; Li and Wang, 2011). Teniendo en consideración estos aspectos, se decidió analizar si la mutación en *hupB* afectaba la producción de LPS. Para ello, se llevó a cabo un abordaje similar al realizado por Li y colaboradores (2011). Se realizó una extracción fenólica partiendo de cultivos de las cepas en estudio, en fase exponencial tardía (con densidad óptica similar). La fase acuosa obtenida para cada caso fue analizada por la técnica de SDS-PAGE. La visualización de la molécula se logró mediante una tinción del gel con una solución de plata. Los resultados se muestran en la figura 4.9. En el gel se observan dos marcas por cada calle de corrida, una en el margen superior y otra, en el inferior. La marca superior representa al LPS maduro constituido por el antígeno O y la región del *core* unida al lípido A; la inferior, representa al lípido A libre (Sidhu *et al.*, 2008). Si comparamos lo obtenido para la cepa silvestre y la mutante *hupB* vemos que esta última no produjo LPS maduro.

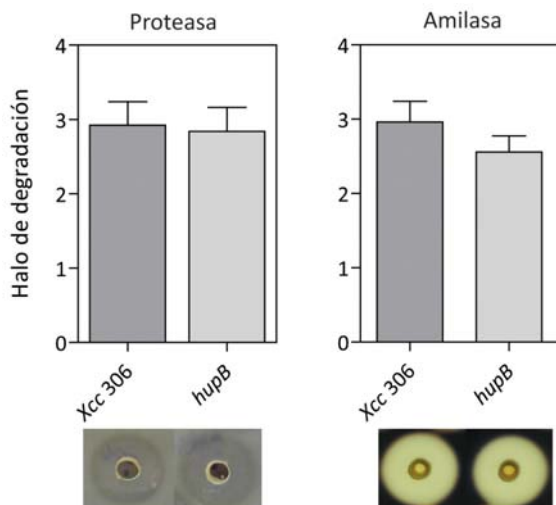


**Figura 4.9.** Producción de LPS en la mutante *Xcc hupB* analizada por SDS-PAGE. (1) cepa silvestre *Xcc* 306; (2) cepa complementada, *c-hupB*; (3) LPS extraído de *P. aeruginosa* utilizado como control; (4) mutante *Xcc hupB*.

#### 7. Producción de enzimas extracelulares en la mutante *hupB*.

Facilitando el proceso infectivo y de obtención de nutrientes del huésped, las bacterias patógenas producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas que son secretadas a través del T2SS (Cianciotto, 2005). *Xanthomonas* spp. es capaz de secretar enzimas como proteasas, pectato liasas, amilasas y celulasas por esta vía (Lee *et al.*, 2004). En particular, *Xcc* posee en su genoma los genes de dos T2SS, que se organizan en dos *clusters*: *xps* y *xcs* (da Silva *et al.*, 2002).

Para analizar la influencia de la mutación en *hupB* sobre los T2SS de *Xcc* y las enzimas extracelulares, determinamos la actividad proteasa y amilasa de esta mutante comparado con la cepa silvestre. Cultivamos las bacterias en medio rico hasta la fase estacionaria de crecimiento, centrifugamos estos cultivos y analizamos los sobrenadantes. Estos últimos fueron sembrados en placas de almidón 1% (p/V) para la determinación de la actividad amilasa y en placas con leche 1% (p/V) para la actividad proteasa. Las placas fueron incubadas a 28°C de 24 a 48hs. Para el caso de las placas de leche, el halo de degradación se evidencia sin requerir revelado de ningún tipo. Las placas de almidón, en cambio, deben ser reveladas con una solución de yodo (ver sección de Materiales y Métodos). Las placas fueron fotografiadas y las imágenes analizadas con el *software Image J* 1.49. Se estimó el área del halo de degradación en cada caso; los resultados se muestran en la figura 4.10. Respecto a la actividad proteasa, no se observaron diferencias entre las cepas. La actividad amilasa en la mutante *hupB* muestra una mínima disminución respecto de la de la cepa silvestre, que no es estadísticamente significativa.

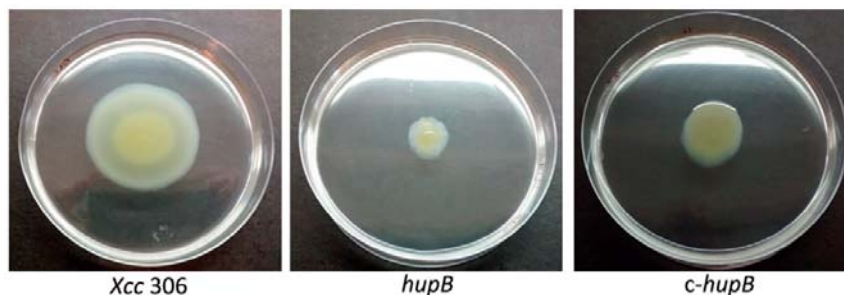


**Figura 4.10.** Análisis de la producción y secreción de proteasa (panel izquierdo) y amilasa (panel derecho). El gráfico de barras representa la media del área del halo de degradación de tres experimentos independientes, para cada enzima. Las barras de error representan el error estándar de los datos. Debajo de los gráficos hay una foto representativa de cada experimento.

#### 8. Estudio de la movilidad dependiente de flagelo en la mutante *hupB*.

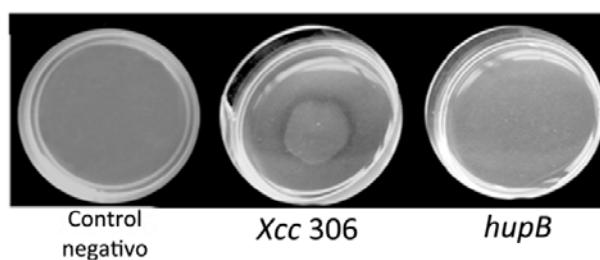
Como ha sido mencionado anteriormente en esta tesis, una propiedad muy importante para la supervivencia y capacidad infectiva de las bacterias es su facultad de poder moverse. Varios trabajos reportan que mutaciones en genes que codifican para proteínas tipo histonas en bacterias, resultan en fenotipos inmóviles, sin capacidad de realizar *swimming* y/o *swarming* (movimientos dependientes del flagelo). Algunos ejemplos son los casos de mutantes del gen que codifica para H-HS en *E.coli* (Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987) y en *V. cholerae*, o para la mutante HU en *E. coli* (Nishida *et al.*, 1997).

Para comprobar si la deficiencia de *hupB* afectaba la movilidad dependiente del flagelo, también en *Xcc*, comparamos el *swimming* y la quimiotaxis de la mutante en este gen y la cepa silvestre. Los ensayos de *swimming* fueron realizados sembrando una pequeña alícuota de cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento, en placas de agar blando NYGB. Luego de 72 horas de incubación se observó la migración de las bacterias alrededor del lugar de siembra, para cada una de las cepas en estudio. Tal como se observa en la figura 4.11, la mutante *hupB* no realiza *swimming*. La movilidad de la cepa complementada, *c-hupB*, se reestableció de manera parcial.



**Figura 4.11.** Ensayo de *swimming*. Alícuotas de cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre (*Xcc 306*), de la mutante *hupB* y de la cepa complementada (*c-hupB*) se sembraron en el centro de placas de Petri con medio de agar blando (NYGB 0,125%). Se incubaron durante 72 horas y luego, las placas se fotografiaron. Las imágenes que se muestran son representativas de tres experimentos similares.

Estudiamos, además, otro proceso que involucra la participación del flagelo: la quimiotaxis. Como ya se ha mencionado, es el movimiento direccionado de las bacterias hacia un gradiente de señales químicas. Llevamos a cabo un ensayo que consistió en medir la capacidad de migración de la bacteria hacia extractos de hojas jóvenes de pomelo. Los detalles se describen en la sección Materiales y Métodos y en los capítulos anteriores de la sección de resultados. Encontramos que, contrariamente a lo que ocurrió con la cepa silvestre, la mutante en *hupB* no fue capaz de moverse hacia el atrayente utilizado, en la medida en que sí lo hizo la cepa silvestre; de hecho, se redujo a niveles no detectables (Fig. 4.12)

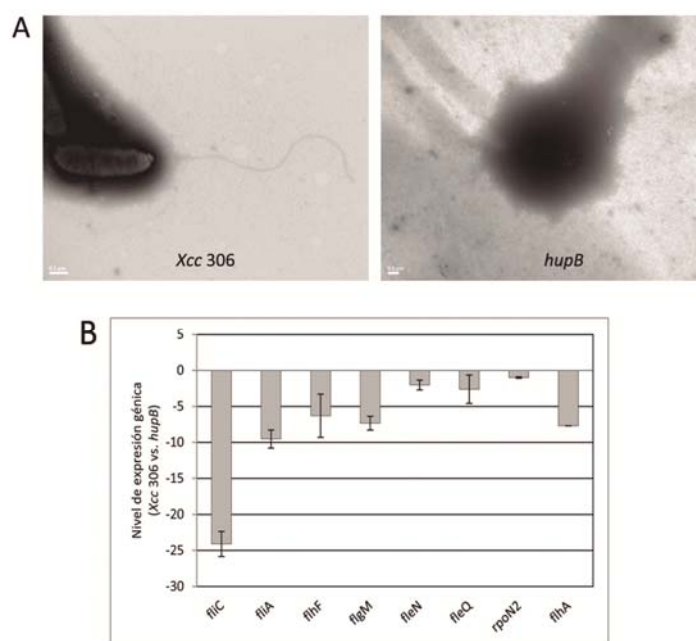


**Figura 4.12.** Ensayo de quimiotaxis. Cada suspensión bacteriana fue disuelta en una solución de hipromelosa 1% (a una  $DO_{600nm}$  final de 0,6) y vertida en una placa de 6 cm de diámetro. Diez microlitros de extracto acuoso de hojas de pomelo fueron colocados en el centro de cada placa. Luego 30 minutos a 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se observaron los halos de turbidez. De izquierda a derecha: control negativo (sin bacterias), cepa silvestre (*Xcc 306*), mutante *hupB*.

La ausencia del *swimming* y la respuesta quimiotáctica en la mutante *hupB* podían deberse a la ausencia del flagelo en la mutante o defectos de en su biogénesis en esta cepa. Examinamos la estructura del flagelo mediante microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes obtenidas revelan en la cepa silvestre la presencia de un único flagelo polar pero esta estructura está ausente en la cepa mutante *hupB* (Fig.

4.13.A). Estos resultados dan evidencia del posible rol de *hupB* en la regulación de la síntesis del flagelo.

Realizamos un análisis comparativo de la expresión de algunos genes flagelares de las tres clases jerárquicas (ver sección Introducción 2.4.1), entre la cepa mutante *hupB* y la cepa silvestre. Las estimaciones fueron realizadas mediante q-RT PCR. Los resultados muestran que la reducción de expresión más significativa fue la del gen que codifica para la flagelina, *fliC*, siendo ésta de alrededor de 24 órdenes menor (Fig. 13B). Los genes que codifican para FleQ y RpoN<sub>2</sub>, son de clase I y dirigen la expresión del resto. No muestran diferencias de expresión sustanciales entre las cepas mutante y silvestre. El gen *flgM*, también de clase I, mostró una reducción cerca a los 7 órdenes en la mutante *hupB* respecto de la cepa silvestre (Fig. 4.13.B). Los genes de clase II evaluados, *fliA*, *flhA* y *flhF*, se expresan menos en la mutante respecto de *Xcc* 306, siendo *fliA* el más afectado (con una reducción de 10 órdenes); *fleN*, otro gen de clase II, no mostró diferencias de expresión entre las cepas estudiadas (Fig. 14.3.B).



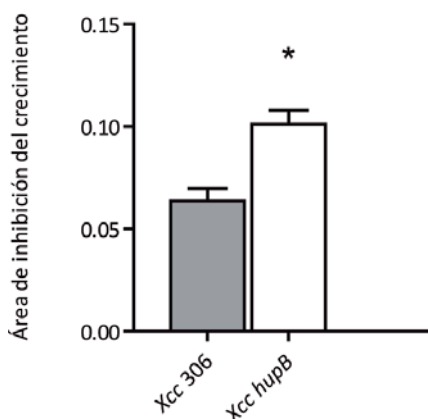
**Figura 4.13.** Análisis del efecto de la mutación en *hupB* sobre la estructura del flagelo. (A) Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de la estructura flagelar de la cepa silvestre *Xcc* 306 y la cepa mutante *hupB*. Las bacterias observadas fueron cultivadas en medio rico. Barra de escala = 0,5µm. (B) Expresión relativa de los genes flagelares (*fliA*, *fliC*, *flhF*, *flgM*, *fleN*, *flhA*, *fleQ*, *rpoN2*, *flhA*) estimada mediante qRT-PCR. Los datos presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes, siendo las barras de error, el error estándar de las muestras.

## 9. Efecto de la mutación en *hupB* en la tolerancia al estrés oxidativo.

Todos los organismos aerobios están expuestos a una amplia variedad de especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En el caso particular de las bacterias fitopatógenas, estos compuestos son sintetizados y utilizados por la planta como una primera respuesta de defensa ante su presencia. Las especies reactivas del oxígeno producen lesiones en el ADN, daños en las enzimas que utilizan grupos hierro-azufre como cofactores, entre otras alteraciones. (Cabiscol *et al.*, 2000).

Las histonas, en general, tienen un papel importante en la resistencia a estrés en varias especies de bacterias (Wang and Maier, 2015). Por ejemplo, experimentos *in vivo* llevados a cabo en *E. coli* muestran que las cepas mutantes deficientes en HU son altamente sensibles al estrés oxidativo (Oberto *et al.*, 2009).

Para evaluar si la deficiencia en *hupB* afecta la capacidad de tolerancia al estrés oxidativo, se realizó un ensayo de inhibición de crecimiento en presencia de  $H_2O_2$ . Se llevó a cabo hisopando en placas de medio rico sin antibiótico, cultivos líquidos de las cepas en estudio. Posteriormente se colocaron discos de papel tipo filtro en el centro de la placa, humedecidos con una solución de  $H_2O_2$  (de una concentración final de 100 mM). Luego de 24 horas de incubación, se estimó el área de inhibición con el *software* Image J 1.49 y se la relativizó al área total de crecimiento. Los resultados de estos experimentos se grafican en la figura 4.14. La mutante *hupB* mostró ser más sensible que la cepa la cepa silvestre al tratamiento con  $H_2O_2$ .



**Figura 4.14.** Cuantificación relativa del área de inhibición de crecimiento (las barras representan los valores de las medias  $\pm$  el error estándar,  $n=3$ ). El asterisco (\*) indica la diferencia significativa en relación al control (cepa silvestre) ( $P < 0,05$ ).

*Xcc*, como otras bacterias, ha desarrollado mecanismo para detoxificarse de estas especies reactivas del oxígeno; la producción de catalasas es uno de ellos. Se ha descrito el rol de la catalasa codificada por *katE* (XAC1211), siendo ésta totalmente funcional e importante para la virulencia de la bacteria (Tondo *et al.*, 2010). Dada la sensibilidad de la mutante *hupB* al tratamiento con  $H_2O_2$ , estimamos la expresión del gen *katE* en la mutante mediante qRT-PCR. Para ello, utilizamos ARN de cultivos en fase estacionaria de crecimiento, en medio rico. La expresión de *katE* en la mutante

fue casi 4 veces ( $3,84 \pm 0,16$ ) menor respecto de la cepa silvestre. La disminución de la expresión de *katE* en la cepa mutada puede ser una causa de su mayor sensibilidad a  $H_2O_2$ .



DISCUSIÓN

**Estudios de las proteínas involucradas en la síntesis de glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) y el rol en la patogénesis de este factor de virulencia.**

Los glucanos son un tipo de oligosacárido que cumple un rol muy importante en la interacción entre plantas y bacterias, tanto en las simbióticas como en las patógenas. Diferentes estudios muestran que *Xanthomonas* spp. produce un glucano cíclico (Minsavage *et al.*, 2004; Talaga *et al.*, 1996; Vojnov *et al.*, 2001). Se trata de un glucano neutro de 16 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,2) y un único enlace  $\alpha$ -(1,6) (Talaga *et al.*, 1996; York, 1995). Hasta el momento de la presente tesis, se conocía muy poco acerca de la biosíntesis de esta molécula en el género. Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostró que el gen que codifica para la proteína *ndvB* (del inglés: *for nodule development B*) estaba implicado en este proceso en *X. campestris* (Rigano *et al.*, 2007a). En el capítulo I de la presente tesis, demostramos la implicancia de dos genes en la biosíntesis del glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) en *Xcc*: *hrpM* y *ndvB*. Además, comprobamos que la funcionalidad de *hrpM* se conserva en *X. campestris*. Asimismo, a partir del estudio de estas mutantes, mostramos las alteraciones que produjo en la bacteria la falta de esta molécula.

Se determinó mediante el análisis de la secuencia que el producto del gen *hrpM* presenta dominios transmembrana a membrana. Además, es homóloga a la *opgH* (previamente *mdoH*) de *E. coli*, una glucosiltransferasa de membrana interna que sintetiza el glucano a partir de UDP-glucosa. HrpM posee un dominio glucosiltransferasa 2 que está asociado con la generación del esqueleto de glucosas. Este dominio puede catalizar la síntesis de glucanos lineales, como los de la familia I, producidos por ejemplo por *P. syringae* (Talaga *et al.* 1994), o los cíclicos de la familia IV, producidos por ejemplo por *R. sphaeroides* (Talaga *et al.*, 2002).

En bacterias como *E. coli*, en el mismo operón que *hrpM* se halla un gen denominado *opgG*, cuya función fue atribuida a la generación de las ramificaciones del glucano. El mismo no está presente en el genoma de *Xcc* 306 y tampoco en el de *X. campestris*. Por otro lado el gen *mdoD* (XC\_4237 en *X. campestris* 8004 y XAC4284 en *Xcc* 306) se encuentra presente y también su un rol que no está bien definido en la biosíntesis del oligosacárido. Este gen pertenece a la misma familia que *opgH* y es parálogo del mismo. Fue descrito por primera vez en *E. coli* como parte del complejo de biosintético y actuaría como una proteína de unión al glucano (Lequette *et al.*, 2004). La mutación en este gen no genera cambios significativos en la síntesis de glucanos (Lequette *et al.*, 2004). *mdoD* en *Xcc* tiene alrededor de un 45% de identidad con su homólogo en *E. coli*; sería de interés estudiar en *Xanthomonas* spp. el fenotipo producto de una mutación en este gen.

La mutante en el gen *hrpM* (XAC0618) que utilizamos en esta tesis, surge de un *screening* sobre una biblioteca de mutantes de *Xcc* 306, obtenidas por inserción del transposón Tn5 (Malamud *et al.*, 2013). Este *screening* tuvo como finalidad la búsqueda de mutantes cuya capacidad de adhesión al sustrato (uno de los primeros pasos en el proceso de formación de *biofilm*) estuviera disminuida respecto de la cepa silvestre. Si bien, ésta fue la primera descripción de la asociación del gen *hrpM* en este proceso en *Xcc*, previamente se había descrito que mutantes *hrpM* en *P. syringae* eran deficientes en la formación de *biofilm* (Peñaloza-Vazquez *et al.*, 2010).

Con el objetivo de corroborar que efectivamente el gen *hrpM* se encuentra involucrado en la síntesis de glucanos cíclicos en *Xcc*, purificamos los azúcares totales producidos por la mutante *Xcc hrpM*, los sometimos a una filtración molecular y a una TLC (Fig. 2.6), demostrando su incapacidad de sintetizar glucano cíclico. Además, construimos la mutante *hrpM* (XC\_0645) en *X. campestris* por mutagénesis dirigida. Esta última tampoco produjo glucanos cíclicos (Fig.2.7).

El otro de los genes estudiados fue *ndvB protein* (XAC4195). Esta proteína es homóloga a la de *X. campestris*, previamente descrita (Rigano *et al.*, 2007a). El análisis de secuencia aminoacídica mostró que guarda similitud con su homóloga en *X. campestris*. Pero además, las proteínas en *Xcc* y *X. campestris* son similares al extremo carboxilo terminal de la enzima *ndvB* en *S. meliloti*. *NdvB protein* es una proteína más pequeña que *NdvB* de *S. meliloti* (319KDa). Esta última se ubica en la membrana interna de la bacteria y tiene actividad glucosiltransferasa sintetizando glucanos  $\beta$ -(1,2) en el citoplasma (Castro *et al.*, 1996; Ielpi *et al.*, 1990). Se trata de la única glucosiltransferasa que posee esta bacteria y está encargada de todo el proceso de biosíntesis de la molécula (Castro *et al.*, 1996). En esta bacteria, posterior a su síntesis, los glucanos son enviados al periplasma por la actividad del transportador *NdvA* (Stanfield *et al.*, 1988). Los genes *ndvB* y *ndvA* no forman parte del mismo operón y no se cotranscriben, así que pueden ser reguladas independientemente. El gen *ndvA* no se haya presente en el genoma de *Xcc* 306 y de *X. campestris* 8004. El mecanismo de exportación de glucanos en *Xanthomonas* spp. no se ha determinado aún.

El gen *ndvB* en *R. sphaeroides* codifica para una proteína de 2761 aminoácidos con 48% de identidad con la *NdvB* de *S. meliloti* (Choudhary *et al.*, 1997). Contrariamente con lo que ocurre en *Xcc*, se demostró que este gen no afecta la síntesis de glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) (de la familia IV) que la bacteria produce (Lequette *et al.*, 2004).

Nuestros resultados indican que en tanto en *Xcc* como en *X. campestris* los genes *hrpM* y *ndvB* están implicadas en la virulencia. Demostramos que las mutantes en estos genes no son capaces de desarrollar la enfermedad en sus respectivas plantas

huésped (Fig. 2.8 y Fig. 2.9). En particular *hrpM*, no desarrolló síntomas en ninguno de los huéspedes en donde fue testeada, aun en el más susceptible de ellos, el pomelo.

Dependiendo del método aplicado para la infección, se pudo determinar cuál es la contribución del factor analizado en los diferentes estadios de la enfermedad. Consecuentemente, para las infecciones realizadas con *hrpM* se utilizaron tres métodos de infección distintos. Infectamos hojas sanas, por hisopado de una suspensión bacteriana, para simular las condiciones normales de la entrada de la bacteria por aperturas naturales (estomas). Infectamos también hojas previamente lastimadas, también por hisopado, para estimular la entrada de la bacteria por heridas del tejido vegetal. Finalmente, infiltramos hojas a modo de introducir la suspensión bacteriana directamente en el mesófilo para así incrementar la eficiencia de la generación de síntomas. El resultado de esto, independientemente del método de infección utilizado, fue que la bacteria mutada en los genes involucrados en la síntesis de glucanos, no produjo síntomas. Sugiriendo que los glucanos no sólo son necesarios para el desarrollo de la enfermedad dentro del tejido sino que además, aumentan el *fitness* de la bacteria fuera del mismo. Esta reducción del *fitness* fuera del tejido vegetal, se asocia también con los resultados obtenidos para la formación de *biofilm*. Ambas mutantes, *hrpM* o *ndvB*, mostraron una reducción significativa de su capacidad de adhesión a superficies abióticas (Fig. 2.3.B y Fig. 2.5.C). En cuanto al crecimiento dentro del tejido, éste sólo fue estimado para la mutante *hrpM*, que mostró un crecimiento mucho más lento en la planta que la cepa silvestre, manteniéndose en bajas concentraciones.

La mutante *hrpM* fue considerablemente más sensible al tratamiento con peróxido de hidrógeno que la cepa silvestre (Fig. 2.13), indicio de que los glucanos son importantes frente a la tolerancia al estrés oxidativo. Esta deficiencia en la mutante *hrpM* podría explicar la caída de la población de esta bacteria en hojas de limón infectadas, que luego logra recuperarse parcialmente a los 13 días posteriores a la infección. Sin embargo, aquí no podríamos descartar la influencia del glucano cíclicos como supresor de la respuesta inmune de la planta (Rigano *et al.*, 2007a).

La sensibilidad a distintos tipos de estrés fue observada en varias bacterias. Recientemente, un trabajo en *D. dadantii* muestra que los glucanos actúan modulando la actividad de un sistema de fosfo-*relay* de la membrana interna de la célula. La presencia de glucanos en el espacio periplásmico reprime este sistema y permite la expresión de genes, entre los que se encuentran aquellos relacionados con la tolerancia a ROS (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013b).

En muchas bacterias, como por ejemplo *E. coli* (Fiedler and Roterling, 1988) y *D. dadantii* (Page *et al.*, 2001), las mutantes no productoras de glucanos presentan movilidad dependiente de flagelo reducida respecto de la cepa silvestre. Nosotros

también observamos el mismo fenotipo para ambas mutantes, *hrpM* y *ndvB*. En primera instancia, pensamos que esto se asociaba a un problema de ensamblaje del flagelo, dado que tiene lugar en el periplasma (Nambu and Kutsukake, 2000). Los glucanos colaboran con la estabilización de la membrana plasmática y con el correcto ensamblaje de los complejos proteicos en el espacio periplásmico (Briones *et al.*, 2001; Peñaloza-Vazquez *et al.*, 2010). Otra de las explicaciones posibles podía ser que los glucanos estén afectando de modo indirecto la expresión de algunos de los genes de la síntesis del flagelo. A través del análisis por microscopía notamos que el flagelo de la mutante *hrpM* parecía no tener deferencias respecto del flagelo de la cepa silvestre (Fig. 2.12). Entonces, descartamos las hipótesis del ensamblaje y por lo menos, parcialmente, la de la influencia sobre la síntesis de los genes del flagelo. Se necesita llevar a cabo un análisis más profundo para determinar por qué estando el flagelo presente, la bacteria no realiza *swimming*.

En conclusión, estos resultados presentados en el capítulo I, contribuyen a robustecer el rol esencial del glucano en la interacción planta – *Xanthomonas* spp. Dado que la pérdida de estas moléculas provoca la merma de la virulencia la inhibición de su síntesis puede ser uno de *targets* para frenar la infección a campo. Sin embargo, para lograrlo aún falta establecer con exactitud todas las enzimas intervinientes en la síntesis del glucano cíclico (además de HrpM y NdvB) su aporte individual y que mecanismo utilizan para transferir glucosa desde UDP-glucosa a glucano cíclico. De todos modos, éste sería el primer informe en que de dos proteínas de dos familias distintas que se involucren en la síntesis de la misma molécula de glucano.

### **Regulación de la virulencia, movilidad y formación de *biofilm* por NtrC en *Xcc*.**

El gen XAC3733 pertenece a la familia de los reguladores transcripcionales NtrC, que son reconocidos por regular múltiples procesos fisiológicos en las bacterias en respuesta a señales ambientales (Andrade *et al.*, 2006; De Carlo *et al.*, 2006). La mutante en este gen, *ntrC*, fue obtenida de un *screening* realizado en el laboratorio (Malamud *et al.*, 2013) que lo asocia por primera vez con el proceso de formación de *biofilm* y quimiotaxis en *Xcc*. La asociación de las proteínas de esta familia con el proceso de *biofilm* había sido descripta previamente en *V. vulnificus* (Kim *et al.*, 2007). En el capítulo II de esta tesis se profundiza en el rol de este gen *ntrC* en el proceso de formación de *biofilm* en *Xcc*.

NtrC en *Xcc*, tiene la estructura típica de las proteínas EBP (del inglés: *Enhancer Binding Proteins*). Estas proteínas poseen tres dominios característicos: un dominio AAA+ (característico de proteínas con unión a la subunidad  $\sigma^{54}$ ), un dominio de interacción con el ADN (HTH) y un dominio REC (homólogo al dominio receptor de un

sistema de dos componentes) (Fig. 3.2). Este tipo de proteínas, EBPs, forman un complejo con RpoN<sub>2</sub> que es necesario para la transcripción de los genes con promotores dependientes de RpoN<sub>2</sub> (Studholme and Dixon, 2003).

La mutante *ntrC* presentó fenotipos defectivos en la movilidad y en el *biofilm*. En particular, relacionado con el último, esta mutante mostró una adhesión al sustrato significativamente menor que la cepa silvestre (Fig. 3.1). Observaciones por microscopía, óptica y electrónica (Fig. 3.4.A), revelaron la ausencia de la estructura flagelar en esta cepa. Considerando su naturaleza de activador transcripcional, analizamos si la ausencia del flagelo en la mutante era producto de la influencia de NtrC sobre la síntesis de los genes flagelares. La mutación en *ntrC* no afectó la síntesis de rpoN<sub>2</sub>, pero sí disminuyó la expresión del mensajero de *flgM*, *fliA*, *flhA*, *flhF* y *fliC* (Fig. 3.4.B). Planteamos, entonces, la hipótesis de que NtrC podría interactuar con RpoN<sub>2</sub> y regular positivamente la transcripción de los genes flagelares, por un mecanismo río arriba de la síntesis de *fliA*. Reforzando nuestra hipótesis, sabemos que mutaciones en *rpoN<sub>2</sub>* derivan en la pérdida de la movilidad y la virulencia en *Xanthomonas* spp. (Tian *et al.*, 2014). Se requiere de experimentos futuros para comprobar la interacción del complejo RpoN<sub>2</sub>-NtrC con el promotor de *fliA*. Asimismo, podría construirse la mutante de *fliA* y comprobar que ésta también posee un fenotipo inmóvil.

El segundo mensajero di-GMP cíclico está involucrado en el control de varias funciones celulares, que incluyen la virulencia, la movilidad y la adhesión, sin embargo, su rol principal es regular la transición de un estilo de vida planctónico de la bacteria al estado sésil de formación de *biofilm*.

Dado que, según los resultados obtenidos, el di-GMP cíclico regula los procesos en los que encontramos anomalías en la mutante *ntrC*, estudiamos una posible vinculación entre el di-GMP cíclico y NtrC. Para ello, modificamos la concentración intracelular de este segundo mensajero en la mutante *ntrC* mediante la expresión de una fosfodiesterasa de di-GMP cíclico (PA2567 de *P. aeruginosa*) o una diguanilatociclasa (WspR19 de *P. fluorescens*). Comprobamos que efectivamente esa vinculación existía.

La expresión de la fosfodiesterasa PA2567 en el *background* mutante restauró la expresión de *fliC*, la síntesis del flagelo, la movilidad y la capacidad de formar *biofilm* de la *ntrC*. Sin embargo, la expresión de *fliA* no retornó a los valores de la cepa silvestre (Fig.3.7.A). Esto último sugiere que el mecanismo por el cual NtrC se vincularía con el di-GMP cíclico se hallaría río abajo de FliA, en línea jerárquica de expresión de los genes flagelares.

Existen reportes que relacionan la actividad de fosfodiesterasas de di-GMP cíclico con FliA. En *E.coli*, FliA regula la expresión de una fosfodiesterasa de este tipo (YhjH),

con dominio EAL, que está implicada en el control de la rotación del flagelo (Boehm *et al.*, 2010; Claret *et al.*, 2007). Específicamente, YhjH reduce los niveles de segundo mensajero y como consecuencia evita que la molécula se una a otra proteína y juntas inhiban la rotación flagelar (Wolfe and Visick, 2008). Un análisis bioinformático nos permitió conseguir datos del regulón de FliA en *Xcc* (Tabla 3.2), obteniéndose un grupo de genes relacionados con el metabolismo di-GMP cíclico. De estos últimos, el gen XAC0350, que codifica para una fosfodiesterasa con dominio HD-GYP, fue el único cuya expresión se redujo significativamente en la mutante *ntrC* (Fig.3.8). Comprobamos experimentalmente la funcionalidad del dominio HD-GYP de esta proteína. A partir de estos resultados proponemos que FliA regula la expresión de esta fosfodiesterasa y de esta manera, reduce la concentración di-GMP cíclico, activando la movilidad. Este sería el mecanismo por el cual NtrC modularía la concentración de di-GMP cíclico en la bacteria. Resultaría interesante poder analizar qué ocurre en una mutante en *fliA* con la expresión del gen XAC0350; si, efectivamente, al no estar FliA activa, reduce su expresión.

Observamos, además, que la actividad de PA2567 no alteró los niveles globales del di-GMP cíclico en la bacteria mutante *ntrC* respecto de la cepa silvestre (Fig. 3.7). Esto, entonces, puede ser una evidencia de una posible acción de NtrC sobre *pools* de di-GMP cíclico “sitio específicos” y no sobre niveles globales del mismo. En la cepa silvestre, XAC0350 es funcional, de modo que actuaría bajando los niveles de di-GMP cíclico en estos “sectores”. En la cepa mutante *ntrC* complementamos la actividad de XAC0350 con la expresión de PA2567.

Ha sido descrita en la bibliografía, para bacterias como *P. fluorescens*, *Salmonella enterica*, *E. coli* y *V.cholerae*, la acción específica de un determinado grupo de enzimas del metabolismo de di-GMP cíclico (fosfodiesterasas o diguanilato ciclasas) en *pools* determinados de este dinucleótido, regulando así procesos como virulencia, formación de *biofilm* y movilidad (Ahmad *et al.*, 2011; Boehm *et al.*, 2010; Newell *et al.*, 2011). En *Pseudomonas*, esta “micro-compartmentalización” que hemos descrito, la asocian a una localización diferencial de las diguanilato ciclasas (Merritt *et al.*, 2010).

Contrariamente con lo que ocurrió con la expresión de PA2567, la expresión de la diguanilato ciclasa WspR19, sí condujo a un aumento global significativo, tanto en la cepa mutante *ntrC* como en la silvestre (Fig. 3.7). Podría decirse que la expresión de WspR19 satura el sistema de di-GMP cíclico, no pudiéndose “modular” su concentración.

Respecto a la virulencia de la bacteria mutante *ntrC*, ésta generó resultados distintos respecto del método de infección utilizado. No se observaron diferencias entre la cepa mutante y la silvestre cuando se infectan hojas previamente heridas (Fig. XX). En las condiciones ensayadas, parecería ser que, o bien la deficiencia en el flagelo,

la quimiotaxis y la formación de *biofilm* no afectaron la virulencia en este caso, o que posea otro fenotipo (no estudiado en esta tesis) que la tornó más virulenta. Cuando la infección se realizó sobre hojas sanas, la mutante generó una cantidad significativamente menor de canchales que la cepa silvestre (Fig. 3.9). Estos resultados sugieren que tanto el flagelo como la quimiotaxis son importantes para la penetración de la bacteria a través de las aperturas naturales de la hoja, los estomas.

### **El gen *hupB* como regulador de la síntesis de factores de virulencia en *Xcc*.**

En el capítulo III de esta tesis, se hizo foco en el estudio de los efectos de la mutación en el gen *hupB* (XAC1081) sobre la producción de factores de virulencia en *Xcc*. *hupB* es homólogo a la subunidad  $\beta$  de la proteína tipo histona HU de *E. coli*. Además, su secuencia aminoacídica presenta una similitud significativa con las de otras bacterias, aun de Gram negativas (Fig. 4.2)

La proteína tipo histona HU es un miembro de las familia II de proteínas de unión a ADN (DNABII), un grupo de proteínas pequeñas relacionadas con la organización y la compactación del ADN bacteriano (Dillon and Dorman, 2010). A HU y a otras proteínas tipo histonas en bacterias actualmente se las llama NAPs (del inglés: *Nucleoid Associated Proteins*). Las NAPs han sido relacionadas con la formación de complejos en sitios específicos del ADN, en los procesos de recombinación, inicio de la replicación y regulación de la expresión génica, además de su rol en la compactación y protección del ADN. En cada bacteria, en general, hay múltiples NAPs cuyas funciones usualmente se superponen y son complementarias. Por ejemplo, en *E. coli*, la carencia de HU no resulta letal, al menos que otras NAPs como IHF y H-NS también estén suprimidas (Yasuzawa *et al.*, 1992). En otras bacterias la disrupción de HU resulta letal dado que sólo poseen una NAP disponible (Liu *et al.*, 2008; Micka and Marahiel, 1992). En el caso particular de *Xcc*, en su genoma hay genes que codifican para proteínas homólogas a los IHF y las H-NS (da Silva *et al.*, 2002). Congruentemente con esto, nuestros resultados muestran que la mutación en *hupB* no resultó ser letal para la bacteria.

Como se ha comentado anteriormente, las histonas HU actúan como homodímeros en la mayoría de las especies, a excepción de *E. coli* y de algunas otras enterobacterias (Grove, 2011). Podría pensarse que en *Xcc*, *hupB* actúa como homodímero de HU, dada la ausencia de genes similares en este genoma (da Silva *et al.*, 2002), pero no contamos con evidencia suficiente para afirmarlo.

Al momento de iniciada esta tesis no se había reportado la asociación de *hupB* en el proceso de formación de *biofilm*. Esta mutante surge a partir del *screening* realizado con el objetivo de buscar mutantes defectivas en el primer paso de la formación del *biofilm*, la adhesión a un sustrato. (Malamud *et al.*, 2013).



Uno de los objetivos de los estudios que se realizaron en esta tesis fue tratar de entender por qué una mutación de pérdida de función en una proteína de tipo histona resultaba en una disminución en la capacidad que *Xcc* tiene para adherirse a un sustrato. Por este motivo, comenzamos observando cuáles eran las estructuras que intervienen en el desarrollo del *biofilm* en *Xcc* afectadas por esta mutación. Por un lado, encontramos que la mutante en *hupB* no posee flagelo y además, parece producir un LPS defectuoso. No podemos descartar que existan otras características afectadas en esta mutante, que no han sido estudiadas en la tesis, y que puedan contribuir a la pérdida de la capacidad de formación de *biofilm*. Relativo a esto último, cabe hacer referencia a un reciente trabajo sobre el rol de *hupB* en el *biofilm* en *E. coli*. Los autores proponen que *hupB* actuaría en la estructuración del *biofilm* como un elemento esencial de la matriz. HU, como otras proteínas DNABII, se halla presente en la matriz, unida al ADN extracelular. Específicamente, se describe a la subunidad *hupB* como componente necesario y limitante para el crecimiento y la mantención de las estructuras de *biofilm* (Devaraj *et al.*, 2015).

La mutante *hupB* no fue capaz de realizar *swimming* debido a que en ella no se pudo observar la presencia del flagelo (Fig. 4.13.A). Asociamos esta ausencia a que la mutación en *hupB* provocó una reducción significativa de la expresión del gen que codifica para flagelina, proteína estructural del filamento (Fig. 4.13.B); esto es un indicio de que *hupB* regula positivamente la síntesis del flagelo en *Xcc*. La ausencia del flagelo y la consecuente pérdida de movilidad en mutantes HU ya habían sido reportadas en *E. coli* hace varios años (Nishida *et al.*, 1997). Los autores demostraron que la doble mutante *hupA-hupB* (de ambas subunidades de la proteína) en *E. coli* no produce flagelina y como consecuencia no es móvil. Además, comprobaron, al igual que nosotros, que la regulación se daba a nivel transcripcional. Con certeza no podemos establecer cuál es el mecanismo por el cual *hupB* regula la expresión de *fliC*. Si se observa la expresión de los genes que coordinan la síntesis del flagelo, vemos que en general los genes de clase II se expresan menos en la mutante que en la cepa silvestre (salvo *fleN*), siendo *fliA* el más afectado. Por su parte, los de clase I, que actúan como reguladores maestros, no ven afectada su expresión en la mutante (salvo *flgM*). Comparativamente con los genes de clase I y II, *fliC* tiene una baja en su expresión mucho más marcada (Fig. 4.13.B). Teniendo en cuenta estos dos últimos datos como referencia, postulamos que la expresión de *fliC* podría estar modulada por *hupB* mediante dos vías. A partir de estudios derivados del análisis del operón *gal* de *E. coli*, se presume que HU podría inducir un *looping* del ADN ayudando así a cargar o descargar reguladores (negativos o positivos) en sitios específicos con el fin de ayudar o bloquear el inicio de la transcripción de los genes (Lewis *et al.*, 1999; Oberto *et al.*, 2009). A partir de esto último, podría decirse que la ausencia de HU alteraría la

actividad del promotor *fliC* directamente, haciendo que éste pierda accesibilidad para los reguladores positivos o haciéndolo más accesible a reguladores negativos. Está claro que la pérdida de la actividad de HU, proteína que promueve la compactación del ADN, alteraría la estructura del mismo y como consecuencia se afectaría la actividad de varios promotores. Bajo esta hipótesis, y considerando que *hupB* afecta el súper-enrollamiento del ADN, su mutación podría afectar la transcripción de los genes de clase I y clase II; entre estos, *fliA*, influyendo así también sobre *fliC*.

No obstante, el mecanismo de síntesis y funcionamiento del flagelo es complejo y en este participan muchos factores. No podemos descartar que *hupB* participe de otras cuestiones relacionadas con el flagelo que afecten la movilidad; ejemplo de esto, es el caso de la H-NS en *E. coli*. La mutante para esta proteína es inmóvil. Por un lado, H-NS es un regulador positivo del regulón flagelar, pegándose al ADN y promoviendo la síntesis del regulador maestro FlhDC (clase I) (Bertin *et al.*, 1994). Por el otro, H-NS modula la rotación del flagelo mediante la interacción con FliG, haciendo que ésta interactúe con las proteínas Mot (del motor flagelar) (Ko and Park, 2000).

La bacteria mutante *hupB* no fue capaz de generar un LPS de características similares al de la cepa silvestre. Tal como se explicó en la sección introductoria, el LPS no es sólo importante para la formación de *biofilm* sino que además afecta la virulencia. Un LPS defectuoso puede afectar el *delivery* de efectores a la célula huésped. En *Xcc*, se comprobó que alteraciones en el LPS (especialmente en el antígeno O) afectan la actividad secretora del T3SS (Wang *et al.*, 2013). La producción defectiva de LPS en la mutante *hupB* debería analizarse más exhaustivamente para establecer con exactitud si es que el LPS se ve afectado en su integridad o si es más bien, una región específica del mismo. Asimismo, sería de gran interés estudiar si *hupB* afecta directamente la expresión de los genes de síntesis de este polisacárido. Cabe destacar que no existe en la bibliografía disponible mucha evidencia acerca del rol de HU sobre la síntesis del LPS. Un único trabajo en *E. coli* propone que una disfuncionalidad de HU no afectaría la estructura del LPS (Painben *et al.*, 1997). Los autores analizan el LPS mediante tres metodologías: TLC, SDS-PAGE y espectroscopía de masa. A partir de la TLC obtienen que la mutante HU produce un LPS idéntico al procedente de mutantes defectivas en el *core*. Sin embargo, como la resolución es pobre, descartan este resultado. Su análisis por SDS-PAGE resultó ambiguo por lo cual no pudieron sacar conclusiones fehacientes. Finalmente, a partir de la espectroscopia de masa pudieron determinar que el LPS producido por la cepa mutante HU era similar al de la cepa silvestre. Un dato a tener en cuenta es que estos investigadores observaron que la mutante HU se veía más afectada por el antibiótico debido a cambios en la permeabilidad de la membrana. Estos cambios fueron atribuidos en primera instancia al LPS, pero luego confirmaron que se debían a un aumento en la

abundancia en la membrana de la porina OmpF. En consecuencia con lo relatado, consideramos necesario profundizar en la investigación en este fenotipo de *Xcc hupB*.

La histona HU coordina la expresión de genes de respuesta a situaciones de estrés (Oberto *et al.*, 2009). Por ejemplo, en *Helicobacter pylori* se comprobó que protege al ADN del estrés oxidativo y en *Mycobacterium tuberculosis*, su proteína homóloga, lo protege del daño causado por las especies reactivas de oxígeno –ROS (del inglés: *Reactive oxygen species*)-(Colangeli *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Nosotros comprobamos que la mutante *hupB* fue menos tolerante al estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno (Fig. 4.14). Asimismo, comprobamos que la expresión de la expresión del gen *katE*, que codifica para una catalasa, se expresaba menos en la mutante que en la cepa silvestre. De modo que, podemos concluir que *hupB* estaría involucrada en el mecanismo de tolerancia a estrés de *Xcc*, por lo menos, perturbando la transcripción de uno de los genes implicados en el mecanismo de decodificación de ROS. Mediante un análisis transcriptómico por *microarray* se determinó que HU afecta la expresión del 8% de los genes de *E. coli* (Oberto *et al.*, 2009). Uno de los genes que resulta con menor expresión en ese análisis es *katE*, lo cual se corresponde con lo que nosotros hemos obtenido.

Como se demuestra en los ensayos de infección en plantas de limón (Fig. 4.4), la mutante *hupB* fue menos virulenta que la cepa silvestre. Los resultados de la infección por hisopado en hojas sanas revelan que la cepa mutante *hupB* tuvo problemas para colonizar el tejido vegetal a través de las aperturas naturales, los estomas (Fig.4.5). Los ensayos con estomas en *V.faba* muestran que *Xcc* y la mutante pudieron promover inicialmente el cierre de los mismos. Luego, la cepa silvestre pudo revertir ese cierre, mientras que la mutante no. Esto último, es un indicio de que el producto del gen *hupB* estaría afectando la producción del factor modulador de la apertura estomática en *Xanthomonas* spp. (Gudesblat *et al.*, 2009). Se ha descrito que este factor está bajo el control del sistema de QS (Gudesblat *et al.*, 2009). Nosotros no encontramos diferencias en la generación de DSF entre la mutante *hupB* y la cepa silvestre, de modo que *hupB* ejercería su influencia independientemente de este sistema.

La mutación en *hupB* no afectó la producción de algunos los factores de virulencia: no se encontraron diferencias en la producción de xantano, glucano cíclico  $\beta$ -(1,2) y enzimas extracelulares entre la cepa mutada y la silvestre.

A partir de los resultados obtenidos comprobamos que la *hupB* es funcional y que su acción sobre producción de factores de virulencia y fisiología de *Xcc* es compleja. A partir de estos ensayos, obtuvimos el primer abordaje. Estudios más profundos se requieren para identificar, por un lado, los sitios de unión de la proteína al ADN, por ejemplo a través de tecnologías de ChiP-seq (Liu *et al.*,2010). Por otra parte, sería muy útil poder contar con el transcriptoma completo de la mutante.

### **Consideraciones finales**

*Xanthomonas* es uno de los géneros de bacterias fitopatógenas que produce más pérdidas económicas en el mundo. Por ejemplo, *Xcc* (objeto de estudio de esta tesis) es la especie causante de la cancrrosis del cítrico, enfermedad distribuida mundialmente y presente en Argentina. Dado que nuestro país se encuentra entre los 10 primeros productores de cítricos, esta enfermedad representa un gran impacto en porcentaje de la producción que se destina a la exportación. Otro aspecto negativo es el impacto que tiene en la ecología ya que, en general, el manejo de esta y otras enfermedades, implica la aplicación de compuestos agronómicos que pueden llegar a resultar tóxicos.

Como consecuencia de lo anteriormente descrito, consideramos de gran interés la investigación de los mecanismos moleculares de la patogénesis de las bacterias del género y en particular, de *Xcc*. Estos estudios son, sin lugar a dudas, una ruta a la identificación de nuevas estrategias para la diagnosis y el manejo responsable de estas enfermedades. Además, la identificación de aspectos relacionados con factores de virulencia permite la manipulación genética de sus *targets* en plantas, generando así cultivares más resistentes a la infección. Todo esto, entonces, aportaría al desarrollo agronómico sustentable.

REFERENCIAS

- Ahmad, I.,** Lamprokostopoulou, A., Le Guyon, S., Streck, E., Barthel, M., Peters, V., Hardt, W. D., and Romling, U. (2011). Complex c-di-GMP signaling networks mediate transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *PLoSOne* **6** (12), e28351.
- Alegria, M. C.,** Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., da Silva, A. C., and Farah, C. S. (2004). New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *J Bacteriol* **186** (18), 6186-97.
- Alfano, J. R.,** and Collmer, A. (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* **8** (10), 1683-1698.
- Alfano, J. R.,** and Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 385-414.
- Allaway, D.,** Schofield, N. A., Leonard, M. E., Gilardoni, L., Finan, T. M., and Poole, P. S. (2001). Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ Microbiol* **3** (6), 397-406.
- Amemura, A.,** and Cabrera-Crespo, J. (1986). Extracellular oligosaccharides and low-Mr polysaccharides containing (1-2)-beta-D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **132** (9), 2443-52.
- Andrade, M. O.,** Alegria, M. C., Guzzo, C. R., Docena, C., Rosa, M. C., Ramos, C. H., and Farah, C. S. (2006). The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Mol Microbiol* **62** (2), 537-51.
- Anuchin, A. M.,** Goncharenko, A. V., Demina, G. R., Mulyukin, A. L., Ostrovsky, D. N., and Kaprelyants, A. S. (2010). The role of histone-like protein, Hlp, in *Mycobacterium smegmatis* dormancy. *FEMS Microbiol Lett* **308** (2), 101-7.
- Arrebola, E.,** Cazorla, F. M., Perez-Garcia, A., and Vicente, A. (2011). Genes Involved in the Production of Antimetabolite Toxins by *Pseudomonas syringae* Pathovars. *Genes (Basel)* **2** (3), 640-60.
- Aslam, S. N.,** Newman, M. A., Erbs, G., Morrissey, K. L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T. T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R. W., Knight, M. R., and Cooper, R. M. (2008). Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* **18** (14), 1078-83.
- Astua-Monge, G.,** Minsavage, G. V., Stall, R. E., Davis, M. J., Bonas, U., and Jones, J. B. (2000). Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (9), 911-21.
- Balandina, A.,** Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouviere-Yaniv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol Microbiol* **39** (4), 1069-79.
- Barber, C. E.,** Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P., and Daniels, M. J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* **24** (3), 555-66.
- Barends, T. R.,** Hartmann, E., Griese, J. J., Beitlich, T., Kirienko, N. V., Ryjenkov, D. A., Reinstein, J., Shoeman, R. L., Gomelsky, M., and Schlichting, I. (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459** (7249), 1015-8.
- Bassler, B. L.,** and Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell* **125** (2), 237-46.

- Beattie, G. A.**, and Lindow, S. E. (1994). Survival, Growth, and Localization of Epiphytic Fitness Mutants of *Pseudomonas syringae* on Leaves. *Appl Environ Microbiol* **60** (10), 3790-8.
- Becker, A.**, Katzen, F., Puhler, A., and Ielpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **50** (2), 145-52.
- Bellini, D.**, Caly, D. L., McCarthy, Y., Bumann, M., An, S. Q., Dow, J. M., Ryan, R. P., and Walsh, M. A. (2014). Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Mol Microbiol* **91** (1), 26-38.
- Bender, C.**, Rangaswamy, V., and Loper, J. (1999). Polyketide Production by Plant-Associated Pseudomonads. *Annu Rev Phytopathol* **37**, 175-196.
- Bender, C. L.**, Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **63** (2), 266-92.
- Bender, C. L.**, and Scholz-Schoeder, B. K. (2004). New Insights into the Biosynthesis, mode of action, and regulation of syringomicyn, syringopeptin, and coronatine. In "The pseudomonads" (J. L. Ramos, Ed.), pp. 125-158. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bertin, P.**, Terao, E., Lee, E. H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A., and Collatz, E. (1994). The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176** (17), 5537-40.
- Better, M.**, and Helinski, D. R. (1983). Isolation and characterization of the recA gene of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **155** (1), 311-6.
- Bhagwat, A. A.**, Mithofer, A., Pfeffer, P. E., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss, A., Ebel, J., and Keister, D. L. (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), 1057-64.
- Bhagwat, A. A.**, Jun, W., Liu, L., Kannan, P., Dharne, M., Pheh, B., Tall, B. D., Kothary, M. H., Gross, K. C., Angle, S., Meng, J., and Smith, A. (2009). Osmoregulated periplasmic glucans of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* are required for optimal virulence in mice. *Microbiology* **155** (Pt 1), 229-37.
- Birch, R. G.** (2001). *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol Plant Pathol* **2** (1), 1-11.
- Blocker, A.**, Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (6), 3027-30.
- Boehm, A.**, Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C. A., Ackermann, M., Kaever, V., Sourjik, V., Roth, V., and Jenal, U. (2010). econd messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141** (1), 107-16.
- Bohin, J. P.** (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **186** (1), 11-9.
- Bontemps-Gallo, S.**, Cogez, V., Robbe-Masselot, C., Quintard, K., Dondeyne, J., Madec, E., and Lacroix, J. M. (2013a). Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in *Escherichia coli*: the phosphoethanolamine transferase is encoded by opgE. *Biomed Res Int* **2013**, Article ID 371429.
- Bontemps-Gallo, S.**, Madec, E., Dondeyne, J., Delrue, B., Robbe-Masselot, C., Vidal, O., Prouvost, A. F., Boussemart, G., Bohin, J. P., and Lacroix, J. M. (2013b). Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB

phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii*. *Environ Microbiol* **15** (3), 881-94.

**Bontemps-Gallo, S.**, and Lacroix, J. M. (2015). New insights into the biological role of the osmoregulated periplasmic glucans in pathogenic and symbiotic bacteria. *Environ Microbiol Rep.* **7** (5), 690–697.

**Bouchard, F.** (2006). Universidad de Lille, Villeneuve-d'Ascq.

**Boyd, C. D.**, and O'Toole, G. A. (2012). Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 439-62.

**Bradbury, J. F.** (1984). Genus II. *Xanthomonas*, Dowson 1939,187. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (N. R. K. J. G. Holt, Ed.), Vol. 1, pp. 199-210. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Braun, S. G.**, Meyer, A., Holst, O., Puhler, A., and Niehaus, K. (2005). Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharide substructures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. *Mol Plant Microbe Interact* **18** (7), 674-81.

**Breedveld, M. W.**, and Miller, K. J. (1994). Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol Rev* **58** (2), 145-61.

**Breedveld, M. W.**, Yoo, J. S., Reinhold, V. N., and Miller, K. J. (1994). Synthesis of glycerophosphorylated cyclic beta-(1,2)-glucans by *Rhizobium meliloti* ndv mutants. *J Bacteriol* **176** (4), 1047-51.

**Briones, G.**, Inon de Iannino, N., Steinberg, M., and Ugalde, R. A. (1997). Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology* **143** (Pt 4), 1115-24.

**Briones, G.**, Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S., and Ugalde, R. A. (2001). *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* **69** (7), 4528-35.

**Brooks, D. M.**, Bender, C. L., and Kunkel, B. N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* **6** (6), 629-39.

**Brunings, A. M.**, and Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* **4** (3), 141-57.

**Buttner, D.**, and Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* **9** (2), 193-200.

**Büttner, D.**, and Bonas, U. (2009). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34** (2), 107-33.

**Büttner, D.**, and He, S. Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* **150** (4), 1656-64.

**Cabiscol, E.**, Tamarit, J., and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3** (1), 3-8.

**Cadmus, M. C.**, Rogovin, S. P., Burton, K. A., Pittsley, J. E., Knutson, C. A., and Jeanes, A. (1976). Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can J Microbiol* **22** (7), 942-8.



- Camilli, A.**, and Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311** (5764), 1113-6.
- Cangelosi, G. A.**, Martinetti, G., and Nester, E. W. (1990). Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic beta-1,2-glucan. *J Bacteriol* **172** (4), 2172-4.
- Canteros, B.** (2001). Cancrosis de los Citrus. *Idia XXI* **1**, 23-27.
- Casabuono, A.**, Petrocelli, S., Ottado, J., Orellano, E. G., and Couto, A. S. (2011). Structural analysis and involvement in plant innate immunity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **286** (29), 25628-43.
- Castro, O. A.**, Zorreguieta, A., Ielmini, V., Vega, G., and Ielpi, L. (1996). Cyclic beta-(1,2)-glucan synthesis in Rhizobiaceae: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *J Bacteriol* **178** (20), 6043-8.
- Chaban, B.**, Hughes, H. V., and Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin Cell Dev Biol*. **46**, 91–103.
- Chan, J. W.**, and Goodwin, P. H. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Adv* **17**(6), 489-508.
- Chang, A. L.**, Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2001). Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* **40** (12), 3420-6.
- Chatterjee, S.**, Chaudhury, S., McShan, A. C., Kaur, K., and De Guzman, R. N. (2013). Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. *Biochemistry* **52** (15), 2508-17.
- Chou, F. L.**, Chou, H. C., Lin, Y. S., Yang, B. Y., Lin, N. T., Weng, S. F., and Tseng, Y. H. (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), 265-9.
- Choudhary, M.**, Mackenzie, C., Nereng, K., Sodergren, E., Weinstock, G. M., and Kaplan, S. (1997). Low-resolution sequencing of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: chromosome II is a true chromosome. *Microbiology* **143** (Pt 10), 3085-99.
- Christen, M.**, Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., and Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280** (35), 30829-37.
- Cianciotto, N. P.** (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13** (12), 581-8.
- Claret, L.**, Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282** (46), 33275-83.
- Cogez, V.**, Talaga, P., Lemoine, J., and Bohin, J. P. (2001). Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* **183** (10), 3127-33.
- Colangeli, R.**, Haq, A., Arcus, V. L., Summers, E., Magliozzo, R. S., McBride, A., Mitra, A. K., Radjainia, M., Khajo, A., Jacobs, W. R., Jr., Salgame, P., and Alland, D. (2009). The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (11), 4414-8.

- Coletta-Filho, H. D.**, Takita, M. A., Souza, A. A., Neto, J. R., Destefano, S. A., Hartung, J. S., and Machado, M. A. (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), 279-85.
- Comolli, J. C.**, Hauser, A. R., Waite, L., Whitchurch, C. B., Mattick, J. S., and Engel, J. N. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **67** (7), 3625-30.
- Costerton, J. W.**, Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**, 435-64.
- Costerton, J. W.**, Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-45.
- Cramton, S. E.**, Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., and Gotz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67** (10), 5427-33.
- Crossman, L.**, and Dow, J. M. (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect* **6** (6), 623-9.
- da Silva, A. C.**, Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C., and Kitajima, J. P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417** (6887), 459-63.
- Dangl, J. L.**, and Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** (6839), 826-33.
- Danhorn, T.**, and Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**, 401-22.
- Daniels, M. J.**, Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J., and Fielding, A. H. (1984). Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J* **3** (13), 3323-8.
- Darrasse, A.**, Carrere, S., Barbe, V., Boureau, T., Arrieta-Ortiz, M. L., Bonneau, S., Briand, M., Brin, C., Cociancich, S., Durand, K., Fouteau, S., Gagnevin, L., Guerin, F., Guy, E., Indiana, A., Koebnik, R., Lauber, E., Munoz, A., Noel, L. D., Pieretti, I., Poussier, S., Pruvost, O., Robene-Soustrade, I., Rott, P., Royer, M., Serres-Giardi, L., Szurek, B., van Sluys, M. A., Verdier, V., Verniere, C., Arlat, M., Manceau, C., and Jacques, M. A. (2013). Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics* **14**, 761.
- Das, A.**, Rangaraj, N. , Sonti, R. V. (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.

- De Carlo, S.**, Chen, B., Hoover, T. R., Kondrashkina, E., Nogales, E., and Nixon, B. T. (2006). The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. *Genes Dev* **20** (11), 1485-95.
- de Weert, S.**, Vermeiren, H., Mulders, I. H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R., and Lugtenberg, B. J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact* **15** (11), 1173-80.
- Devaraj, A.**, Justice, S. S., Bakaletz, L. O., and Goodman, S. D. (2015). DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol* **96** (6), 1119-35.
- Dharmapuri, S.**, and Sonti, R. V. (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), 53-9.
- Dillon, S. C.**, and Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* **8** (3), 185-95.
- Donlan, R. M.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8** (9), 881-90.
- Dorman, C. J.**, and Deighan, P. (2003). Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **13** (2), 179-84.
- Douglas, C. J.**, Staneloni, R. J., Rubin, R. A., and Nester, E. W. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J Bacteriol* **161** (3), 850-60.
- Dow, J. M.**, Millingan, D. E., Jaison L., Barber, C. E., and Daniels, J. M. (1987). A gene cluster in *Xanthomonas campestris* required for pathogenicity controls excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. *Physiol Mol Plant Pathol* **31**, 261-271.
- Dow, J. M.**, Feng, J. X., Barber, C. E., Tang, J. L., and Daniels, M. J. (2000). Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the rpf gene cluster of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* **146** (Pt 4), 885-91.
- Dow, J. M.**, Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., and Tang, J. L. (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), 10995-1000.
- Dow, J. M.**, Fouhy, Y., Lucey, J. F., and Ryan, R. P. (2006). The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe Interact* **19** (12), 1378-84.
- Drlica, K.**, and Rouviere-Yaniv, J. (1987). Histone like proteins of bacteria. *Microbiol Rev* **51** (3), 301-19.
- Dunlap, J.**, Minami, E., Bhagwat, A. A., Keister, D. L., and Stacey, G. (1996). Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic B-glucan synthesis. *Mol Plant Microbe Interact* **9** (7), 546-55.
- Dunger, G.**, Arabolaza, A., Gottig, N., Orellano, E., and Ottado, J. (2005). Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathology* **54** (8), 781-788.
- Dunger, G.**, Relling, V. M., Tondo, M. L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E. G., and Ottado, J. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch Microbiol* **188** (2), 127-35.
- Dunger, G.**, Guzzo, C. R., Andrade, M. O., Jones, J. B., and Farah, C. S. (2014). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV *Pilus* is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. *Mol Plant Microbe Interact* **27** (10), 1132-47.

- Dylan, T.**, Helinski, D. R., and Ditta, G. S. (1990). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1----2)-glucan. *J Bacteriol* **172** (3), 1400-8.
- Ebel, W.**, Vaughn, G. J., Peters, H. K., 3rd, and Trempy, J. E. (1997). Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179** (21), 6858-61.
- Facincani, A. P.**, Moreira, L. M., Soares, M. R., Ferreira, C. B., Ferreira, R. M., Ferro, M. I., Ferro, J. A., Gozzo, F. C., and de Oliveira, J. C. (2014). Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Funct Integr Genomics* **14** (1), 205-17.
- Fang, X.**, and Gomelsky, M. (2010). A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol* **76** (5), 1295-305.
- Feil, H.**, Feil, W. S., Lindow, S. E. (2007). Contribution of Fimbrial and Afimbrial Adhesins of *Xylella fastidiosa* to Attachment to Surfaces and Virulence to Grape. *Phytopathology* **97**(3), 318-24.
- Fellay, R.**, Krisch, H. M., Prentki, P., and Frey, J. (1989). Omegon-Km: a transposable element designed for in vivo insertional mutagenesis and cloning of genes in gram-negative bacteria. *Gene* **76** (2), 215-26.
- Feng, J. X.**, Song, Z. Z., Duan, C. J., Zhao, S., Wu, Y. Q., Wang, C., Dow, J. M., and Tang, J. L. (2009). The *xrvA* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, encoding an H-NS-like protein, regulates virulence in rice. *Microbiology* **155** (Pt 9), 3033-44.
- Fiedler, W.**, and Rotering, H. (1988). Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* **263** (29), 14684-9.
- Finn, R.**, Griffiths-Jones, S., and Bateman, A. (2003). Identifying protein domains with the Pfam database. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**, Unit 2 5.
- Flemming, H. C.**, and Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* **43** (6), 1-8.
- Flemming, H. C.**, Neu, T. R., and Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189** (22), 7945-7.
- Fouhy, Y.**, Lucey, J. F., Ryan, R. P., and Dow, J. M. (2006). Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res Microbiol* **157** (10), 899-904.
- Furutani, A.**, Tsuge, S., Ohnishi, K., Hikichi, Y., Oku, T., Tsuno, K., Inoue, Y., Ochiai, H., Kaku, H., and Kubo, Y. (2004). Evidence for HrpXo-dependent expression of type II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol* **186** (5), 1374-80.
- Galperin, M. Y.**, Nikolskaya, A. N., and Koonin, E. V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203** (1), 11-21.
- Galperin, M. Y.** (2005). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13** (2), 150-9.
- Geremia, R. A.**, Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J., and Ugalde, R. A. (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), 880-4.
- Girard, V.**, and Mourez, M. (2006). Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol* **157** (5), 407-16.
- Goto, M.** (2012). "Fundamentals of Bacterial Plant Pathology." Academic Press, INC.

- Gottig, N.**, Garavaglia, B. S., Garofalo, C. G., Orellano, E. G., and 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.
- Gottwald, T. R.**, McGuire, R.G., Garran, S. (1988). Asian Citrus Canker: Spatial and Temporal Spread in Simulating New Planting Situations in Argentina. *Phytopathology* **78** (6).
- Gottwald, T. R.**, Graham, J. H., and Schubert, T. S. (2002). Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. *Plant Health Progress*.
- Graham, J. H.**, Gottwald, T. R., Cubero, J., and Achor, D. S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol* **5** (1), 1-15.
- Groll, M.**, Schellenberg, B., Bachmann, A. S., Archer, C. R., Huber, R., Powell, T. K., Lindow, S., Kaiser, M., and Dudler, R. (2008). A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* **452** (7188), 755-8.
- Grove, A.** (2011). Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr Issues Mol Biol* **13** (1), 1-12.
- Gudesblat, G. E.**, Torres, P. S., and Vojnov, A. A. (2009b). *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol* **149** (2), 1017-27.
- Guo, Y.**, Figueiredo, F., Jones, J., and Wang, N. (2011). HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* **24** (6), 649-61.
- Guo, Y.**, Zhang, Y., Li, J. L., and Wang, N. (2012) Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* **25** (2), 165-79.
- Guttenplan, S. B.**, and Kearns, D. B. (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37** (6), 849-71.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166** (4), 557-80.
- He, S. Y.**, Nomura, K., and Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 181-206.
- He, Y. Q.**, Zhang, L., Jiang, B. L., Zhang, Z. C., Xu, R. Q., Tang, D. J., Qin, J., Jiang, W., Zhang, X., Liao, J., Cao, J. R., Zhang, S. S., Wei, M. L., Liang, X. X., Lu, G. T., Feng, J. X., Chen, B., Cheng, J., and Tang, J. L. (2007a). Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol* **8** (10), R218.
- He, Y. W.**, Ng, A. Y., Xu, M., Lin, K., Wang, L. H., Dong, Y. H., and Zhang, L. H. (2007b). *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol* **64** (2), 281-92.
- He, Y. W.**, and Zhang, L. H. (2008). Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* **32** (5), 842-57.
- He, Y. W.**, Wu, J., Cha, J. S., and Zhang, L. H. (2010). Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiol* **10**, 187.

- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7** (4), 263-73.
- Henrichsen, J.** (1972a). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36** (4), 478-503.
- Henrichsen, J.** (1972b). Gliding and twitching motility of bacteria unaffected by cytochalasin B. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* **80** (4), 623-4.
- Henrichsen, J.** (1983). Twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **37**, 81-93.
- Herrera Mendoza, M. T.** (2004). El papel del *biofilm* en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova* **2** (2), 71-80.
- Hervas, A. B.,** Canosa, I., Little, R., Dixon, R., and Santero, E. (2009). NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **191** (19), 6123-35.
- Heydorn, A.,** Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., and Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146** (Pt 10), 2395-407.
- Hickman, J. W.,** and Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69** (2), 376-89.
- Hill, N. S.,** Buske, P. J., Shi, Y., and Levin, P. A. (2013). A moonlighting enzyme links *Escherichia coli* cell size with central metabolism. *PLoS Genet* **9**(7), e1003663.
- Hirschman, J.,** Wong, P. K., Sei, K., Keener, J., and Kustu, S. (1985). Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntrA product is a sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (22), 7525-9.
- Holst, O.,** and Brade, H. (1992). Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In "Bacterial Endotoxins: Lipopolysaccharide" (D. C. M. a. J. C. Ryan, Ed.), pp. 135-170. CRC, Boca Raton, Florida.
- Huang, B.,** Whitchurch, C. B., and Mattick, J. S. (2003). FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185** (24), 7068-76.
- Huang, D. L.,** Tang, D. J., Liao, Q., Li, X. Q., He, Y. Q., Feng, J. X., Jiang, B. L., Lu, G. T., and Tang, J. L. (2009). The Zur of *Xanthomonas campestris* is involved in hypersensitive response and positively regulates the expression of the hrp cluster via hrpX but not hrpG. *Mol Plant Microbe Interact* **22** (3), 321-9.
- Hugouvieux, V.,** Barber, C. E., Daniels, M. J. (1998). Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11** (6), 537-43.
- Hutchison, M. a. G.,** DC (1997). Lipopeptide Phytotoxins Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: Comparison of the Biosurfactant and Ion Channel-Forming Activities of Syringopeptin and Syringomycin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** (3), 347-354.
- Ielpi, L.,** Dylan, T., Ditta, G. S., Helinski, D. R., and Stanfield, S. W. (1990). The ndvB locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of beta-(1----2)-glucan. *J Biol Chem* **265** (5), 2843-51.
- Ingram-Smith, C.,** and Miller, K. J. (1998). Effects of Ionic and Osmotic Strength on the Glucosyltransferase of *Rhizobium meliloti* Responsible for Cyclic beta-(1,2)-Glucan Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **64** (4), 1290-7.

- Iñón de Iannino N.**, B. G., Tolmasky M., Ugalde RA. (1998). Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J Bacteriol* **180** (17), 4392-400.
- Jansson, P. E.**, Kenne, L., and Lindberg, B. (1975). Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* **45**, 275-82.
- Jarrell, K. F.**, and McBride, M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6** (6), 466-76.
- Jenkins, C., and Starr, M. (1982). The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Current Microbiology* **7**(5), 323-326.
- Jha, G.**, Rajeshwari, R., and Sonti, R. V. (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **18** (9), 891-8.
- Jiang, G. F.**, Jiang, B. L., Yang, M., Liu, S., Liu, J., Liang, X. X., Bai, X. F., Tang, D. J., Lu, G. T., He, Y. Q., Yu, D. Q., and Tang, J. L. (2014). Establishment of an inducing medium for type III effector secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Braz J Microbiol* **44** (3), 945-52.
- Josenhans, C.**, and Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291** (8), 605-14.
- Jung, Y.**, Park, H., Cho, E., and Jung, S. (2005). Structural analyses of novel glycerophosphorylated alpha-cyclophosphohexadecaoses isolated from *X. campestris* pv. *campestris*. *Carbohydr Res* **340**(4), 673-7.
- Jurado, S. M.**, Petruccelli (2005). Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Transmisión en el diagnóstico Microbiológico. *ANALECTA VETERINARIA* **1** (25), 18-24.
- Kall, L.**, Krogh, A., and Sonnhammer, E. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338** (5), 1027-36.
- Kametani-Ikawa, Y.**, Tsuge, S., Furutani, A., and Ochiai, H. (2011). An H-NS-like protein involved in the negative regulation of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **319** (1), 58-64.
- Kanehisa, M.** (2000). "Post-genome Informatics." (O. U. Press, Ed.).
- Karatan, E.**, and Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73** (2), 310-47.
- Katzen, F.**, Becker, A., Zorreguieta, A., Puhler, A., and Ielpi, L. (1996). Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *J Bacteriol* **178** (14), 4313-8.
- Katzen, F.**, Ferreira, D. U., Oddo, C. G., Ielmini, M. V., Becker, A., Puhler, A., and Ielpi, L. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol* **180** (7), 1607-17.
- Kawaharada, Y.**, Eda, S., Minamisawa, K., and Mitsui, H. (2007). A *Mesorhizobium loti* mutant with reduced glucan content shows defective invasion of its host plant *Lotus japonicus*. *Microbiology* **153** (Pt 12), 3983-93.
- Kemp, B. P.**, Horne, J., Bryant, A., and Cooper, R. M., 2004 (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis gumD* gene is essential, for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64** (4), 209-218.

- Kennedy, E. P.** (1982). Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (4), 1092-5.
- Kierek-Pearson, K.**, and Karatan, E. (2005). Biofilm development in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **57**, 79-111.
- Kim, C. M.**, Park, R. Y., Chun, H. J., Kim, S. Y., Rhee, J. H., and Shin, S. H. (2007). *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE is essentially required for swarming. *FEMS Microbiol Lett* **269** (1), 170-9.
- Kim, Y. K.**, and McCarter, L. L. (2007). ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **189** (11), 4094-107.
- Kim, S. Y.**, Kim, J. G., Lee, B. M., and Cho, J. Y. (2009). Mutational analysis of the gum gene cluster required for xanthan biosynthesis in *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Biotechnol Lett* **31** (2), 265-70.
- Ko, M.**, and Park, C. (2000). Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **303** (3), 371-82.
- Kodaka, H.**, Armfield, A. Y., Lombard, G. L., and Dowell, V. R., Jr. (1982). Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J Clin Microbiol* **16** (5), 948-52.
- Kovach, M. E.**, Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd, and Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16** (5), 800-2.
- Krogh, A.**, Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305** (3), 567-80.
- Kroos, L.** (2007). The Bacillus and Myxococcus developmental networks and their transcriptional regulators. *Annu Rev Genet* **41**, 13-39.
- Kustu, S.**, Santero, E., Keener, J., Popham, D., and Weiss, D. (1989). Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* **53** (3), 367-76.
- Lacroix, J. M.**, Loubens, I., Tempete, M., Menichi, B., and Bohin, J. P. (1991). The mdoA locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol Microbiol* **5** (7), 1745-53.
- Laia, M. L.**, Moreira, L. M., Dezajacomo, J., Brigati, J. B., Ferreira, C. B., Ferro, M. I., Silva, A. C., Ferro, J. A., and Oliveira, J. C. (2009). New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiol* **9**, 12.
- Lang, B.**, Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C. O., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C. L., Rimsky, S., Stella, S., Babu, M. M., and Travers, A. (2007). High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35** (18), 6330-7.
- Larkin, M. A.**, Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** (21), 2947-8.
- Lawrence, J. R.**, Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., and Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* **173** (20), 6558-67.
- Leduc, J. L.**, and Roberts, G. P. (2009). Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* **191** (22), 7121-2.



- Lee, E. C.,** Hales, L. M., Gumport, R. I., and Gardner, J. F. (1992). The isolation and characterization of mutants of the integration host factor (IHF) of *Escherichia coli* with altered, expanded DNA-binding specificities. *EMBO J* **11**, 305-313.
- Lee, S.,** Cho, E., and Jung, S. (2009). Periplasmic glucans isolated from Proteobacteria. *BMB Rep* **42** (12), 769-75.
- Lee, E. R.,** Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N., and Breaker, R. R. (2010). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329** (5993), 845-8.
- Lejeune, P.** (2003). Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol* **11** (4), 179-84.
- Lequette, Y.,** Odberg-Ferragut, C., Bohin, J. P., and Lacroix, J. M. (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), 3695-702.
- Letunic, I.,** Doerks, T., and Bork, P. (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37** (Database issue), D229-32.
- Lewis, D. E.,** Geanacopoulos, M., and Adhya, S. (1999). Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31** (2), 451-61.
- Leyns, F.,** De Cleene, M., Swings, J.G. and DE LEY, J. (1984). The host range of the genus *Xanthomonas*. *Botanical Review* **50**, 308-356.
- Li, J.,** and Wang, N. (2011a). Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One* **6** (7), e21804.
- Li, J.,** and Wang, N. (2011b). The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Mol Plant Pathol* **12** (4), 381-96.
- Li, R. F.,** Lu, G. T., Li, L., Su, H. Z., Feng, G. F., Chen, Y., He, Y. Q., Jiang, B. L., Tang, D. J., and Tang, J. L. (2014). Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ Microbiol* **16** (7), 2053-71.
- Lindgren, P. B.,** Peet, R. C., and Panopoulos, N. J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* **168** (2), 512-22.
- Liu, D.,** Yumoto, H., Murakami, K., Hirota, K., Ono, T., Nagamune, H., Kayama, S., Matsuo, T., and Miyake, Y. (2008). The essentiality and involvement of *Streptococcus intermedius* histone-like DNA-binding protein in bacterial viability and normal growth. *Mol Microbiol* **68** (5), 1268-82.
- Liu, E. T.,** Pott, S., and Huss, M. (2010). Q&A: ChIP-seq technologies and the study of gene regulation. *BMC Biol* **8**, 56.
- Liu, D.,** Chen, Z., Shi, P., Wang, X., and Cai, W. (2011). Analysis of reactive oxygen species in the guard cell of wheat stoma with confocal microscope. *Microsc Res Tech* **74** (9), 795-8.
- Loewus, F. A.** (1952). Improvement in the anthrone method for determination of carbohydrates. *Analytical Chemistry* **24** (1), 219-219.
- Loubens, I.,** Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J. M., and Bohin, J. P. (1993). Homology between a genetic locus (mdoA) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in

*Escherichia coli* and a genetic locus (hrpM) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **10** (2), 329-40.

**Lu, H.**, Patil, P., Van Sluys, M. A., White, F. F., Ryan, R. P., Dow, J. M., Rabinowicz, P., Salzberg, S. L., Leach, J. E., Sonti, R., Brendel, V., and Bogdanove, A. J. (2008). Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in xanthomonas. *PLoS One* **3** (11), e3828.

**Mah, T. F.**, Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., and O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426** (6964), 306-10.

**Mahajan-Miklos, S. T.**, M.W.; Rahme; L.G.; Ausubel, F.M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**(1), 47-56.

**Malamud, F.** (2011). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

**Malamud, F.**, Torres, P. S., Roeschlin, R., Rigano, L. A., Enrique, R., Bonomi, H. R., Castagnaro, A. P., Marano, M. R., and Vojnov, A. A. (2011). The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* **157** (Pt 3), 819-29.

**Malamud, F.**, Homem, R. A., Conforte, V. P., Yaryura, P. M., Castagnaro, A. P., Marano, M. R., do Amaral, A. M., and Vojnov, A. A. (2013). Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Microbiology* **159** (Pt 9), 1911-9.

**Martínez, L. C.**, and Vadyvaloo, V. (2014). Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 38.

**Mattick, J. S.** (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289-314.

**McIntire, F. C.**, Peterson, W.H., and Riker, J.A. (1942). A polysaccharide produced by a crown-gall organism. *J Biol Chem* **143**, 491-496.

**Melotto, M.**, Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126** (5), 969-80.

**Melotto, M.**, Underwood, W., He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 101-22.

**Melotto, M. K.**, B.N. (2013). Virulence Strategies of Plant Pathogenic Bacteria. In "The Prokaryotes - Prokaryotic Physiology and Biochemistry" (E. Rosenberg, Ed.). Springer-Verlag, Berlin.

**Meng, Y.**, Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., and Hoch, H. C. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* **187** (16), 5560-7.

**Merritt, J. H.**, Ha, D. G., Cowles, K. N., Lu, W., Morales, D. K., Rabinowitz, J., Gitai, Z., and O'Toole, G. A. (2010). Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylatecyclases. *M Bio* **1** (4) e00183-10.

**Merz, A. J.**, So, M., and Sheetz, M. P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407** (6800), 98-102.

**Mhedbi-Hajri, N.**, Jacques, M. A., and Koebnik, R. (2011). Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae. *Adv Exp Med Biol* **715**, 71-89.

**Micka, B.**, and Marahiel, M. A. (1992). The DNA-binding protein HBSu is essential for normal growth and development in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **74** (7-8), 641-50.

- Miller, K. J.**, Kennedy, E. P., and Reinhold, V. N. (1986). Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231** (4733), 48-51.
- Minsavage, G. V.**, Mudgett, M. B., Stall, R. E., and Jones, J. B. (2004). Importance of *opgHXcv* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **17** (2), 152-61.
- Monds, R. D.**, and O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* **17** (2), 73-87.
- Moorthy, S.**, and Watnick, P. I. (2004). Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* **52**(2), 573-87.
- Morgan, J. L.**, McNamara, J. T., and Zimmer, J. (2014). Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol* **21**(5), 489-96.
- Murga, R.**, Stewart, P. S., and Daly, D. (1995). Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnol Bioeng* **45**(6), 503-10.
- Nambu, T.**, and Kutsukake, K. (2000). The Salmonella FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* **146** (Pt 5), 1171-8.
- Nealson, K. H.**, and Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43** (4), 496-518.
- Newell, P. D.**, Yoshioka, S., Hvorecny, K. L., Monds, R. D., and O'Toole, G. A. (2011). Systematic analysis of diguanylatecyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol* **193** (18), 4685-98.
- Newman, M. A.**, Dow, J. M., Molinaro, A., and Parrilli, M. (2007). Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* **13** (2), 69-84.
- Nguyen, L. C.**, Taguchi, F., Tran, Q. M., Naito, K., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Chiku, K., Ishii, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2012). Type IV pilin is glycosylated in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 and is required for surface motility and virulence. *Mol Plant Pathol* **13** (7), 764-74.
- Nishida, S.**, Mizushima, T., Miki, T., and Sekimizu, K. (1997). Immotile phenotype of an *Escherichia coli* mutant lacking the histone-like protein HU. *FEMS Microbiol Lett* **150** (2), 297-301.
- Noël, L.**, Thieme, F., Gabler, J., Buttner, D., and Bonas, U. (2003). XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **185** (24), 7092-102.
- Oberto, J.**, Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., and Rouviere-Yaniv, J. (2009). The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One* **4** (2), e4367.
- Onsando, J. M.** (1992). Black rot crucifers. In "Diseases of Vegetables and Oli Seed Crops" (H. S. Chaube, Kurman, J., Mukhopadhyay, A.N., Singh U.S., Ed.), Vol. II, pp. 243-252. Prentice Hall, New Jersey.
- O'Toole, G. A.**, and Kolter, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30** (2), 295-304.
- O'Toole, G. A.**, and Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28** (3), 449-61.

- O'Toole, G. A.**, Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., and Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**, 91-109.
- O'Toole, G.**, Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- Page, F.**, Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J. M., Robert-Baudouy, J., and Bohin, J. P. (2001). Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J Bacteriol* **183** (10), 3134-41.
- Painbeni, E.**, Caroff, M., and Rouviere-Yaniv, J. (1997). Alterations of the outer membrane composition in *Escherichia coli* lacking the histone-like protein HU. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (13), 6712-7.
- Pallen, M. J.**, Bailey, C. M., and Beatson, S. A. (2006). Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Sci* **15**(4), 935-41.
- Paster, B. J.**, Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., and Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183** (12), 3770-83.
- Paul, R.**, Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18** (6), 715-27.
- Paul, R.**, Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H., and Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem* **282** (40), 29170-7.
- Paul, K.**, Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F., and Harshey, R. M. (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38** (1), 128-39.
- Peñaloza-Vazquez, A. S., A.**; Bender, C. L. (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), 1452-67.
- Poplawsky, A. R.**, and Chun, W. (1997). pigB determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **179** (2), 439-44.
- Poplawsky, A. R.**, and Chun, W. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. *Mol Plant Microbe Interact* **11** (6), 466-75.
- Poplawsky, A. R.**, Urban, S. C., and Chun, W. (2000). Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl Environ Microbiol* **66** (12), 5123-7.
- Poplawsky, A. R.**, Walters, D. M., Rouviere, P. E., and Chun, W. (2005). A gene for a dioxygenase-like protein determines the production of the DF signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Pathol* **6** (6), 653-7.
- Pratt, L. A.**, Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30** (2), 285-93.
- Puvanesarajah, V.**, Schell, F. M., Stacey, G., Douglas, C. J., and Nester, E. W. (1985). Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **164** (1), 102-6.
- Qi, Y.**, Rao, F., Luo, Z., and Liang, Z. X. (2009). A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in AxDGC2 from *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry* **48** (43), 10275-85.

- Qian, W.**, Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., Lu, L. F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D. J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B. L., Zeng, S., Gu, W. Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G. P., Tang, J. L., and He, C. (2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15** (6), 757-67.
- Quandt, J.**, and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127** (1), 15-21.
- Rajagopal, L.**, Sundari, C. S., Balasubramanian, D., and Sonti, R. V. (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Letters* **415** (2), 125-128.
- Rajagopal, S.**, Eis, N., and Nickerson, K. W. (2003). Eight gram-negative bacteria are 10,000 times more sensitive to cationic detergents than to anionic detergents. *Can J Microbiol* **49**(12), 775-9.
- Rajeshwari, R.**, Jha, G., and Sonti, R. V. (2005). Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* **18**(8), 830-7.
- Rao, F.**, Qi, Y., Chong, H. S., Kotaka, M., Li, B., Li, J., Lescar, J., Tang, K., and Liang, Z. X. (2009). The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol* **191** (15), 4722-31.
- Ray, S. K.**, Rajeshwari, R., and Sonti, R. V. (2000). Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (4), 394-401.
- Rigano, L. A.**, Payette, C., Brouillard, G., Marano, M. R., Abramowicz, L., Torres, P. S., Yun, M., Castagnaro, A. P., Oirdi, M. E., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J. M., Bouarab, K., and Vojnov, A. A. (2007a). Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell* **19** (6), 2077-89.
- Rigano, L. A.**, Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P. S., Questa, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A., and Marano, M. R. (2007b). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* **20** (10), 1222-30.
- Roden, J.**, Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y., and Mudgett, M. B. (2004). Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* **17** (6), 633-43.
- Rolin, D. B.**, Pfeffer, P. E., Osman, S. F., Szwergold, B. S., Kappler, F., and Benesi, A. J. (1992). Structural studies of a phosphocholine substituted beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim Biophys Acta* **1116**(3), 215-25.
- Romling, U.**, Galperin, M. Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77** (1), 1-52.
- Roset, M. S.**, Ciochini, A. E., Ugalde, R. A., and Inon de Iannino, N. (2004). Molecular cloning and characterization of *cgt*, the *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan transporter gene, and its role in virulence. *Infect Immun* **72** (4), 2263-71.
- Ross, P.**, Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325** (6101), 279-81.

- Rumley, M. K.**, Therisod, H., Weissborn, A. C., and Kennedy, E. P. (1992). Mechanisms of regulation of the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267** (17), 11806-10.
- Ryan, R. P.**, Fouhy, Y., Lucey, J. F., Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P., and Dow, J. M. (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (17), 6712-7.
- Ryan, R. P.**, Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., and Dow, J. M. (2009). HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **11** (5), 1126-36.
- Ryan, R. P.**, McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C. S., Armitage, J. P., and Dow, J. M. (2010). Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (13), 5989-94.
- Ryjenkov, D. A.**, Tarutina, M., Moskvina, O. V., and Gomelsky, M. (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187** (5), 1792-8.
- Ryu, J. H.**, Kim, H., Frank, J. F., and Beuchat, L. R. (2004). Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett Appl Microbiol* **39** (4), 359-62.
- Sandkvist, M.** (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **69** (6), 3523-35.
- Sarkar, M. K.**, Paul, K., and Blair, D. (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (20), 9370-5.
- Sauer, K.** (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4** (6), 219.
- Sawai, H.**, Yoshioka, S., Uchida, T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ishimori, K., and Aono, S. Molecular oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase (HemDGC) for the synthesis of cyclic di-GMP. *Biochim Biophys Acta* **1804** (1), 166-72.
- Schaad, N. W.**, Alvarez, A. (1993). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: cause of black rot of crucifers. In "Xanthomonas" (J. G. Swings, Civerolo, E. L., Ed.), pp. 399. Chapman & Hall, Madison.
- Schaad, N. W.**, Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. (2005). Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **28** (6), 494-518.
- Schellenberg, B.**, Ramel, C., and Dudler, R. (2010). *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Mol Plant Microbe Interact* **23** (10), 1287-93.
- Schmidt, A. J.**, Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187** (14), 4774-81.

- Schreiber, K. J.**, and Desveaux, D. (2011). AlgW regulates multiple *Pseudomonas syringae* virulence strategies. *Mol Microbiol* **80** (2), 364-77.
- Schroter, K.**, Flaschel, E., Puhler, A., and Becker, A. (2001). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* secretes the endoglucanases ENGXCA and ENGXCB: construction of an endoglucanase-deficient mutant for industrial xanthan production. *Appl Microbiol Biotechnol* **55** (6), 727-33.
- Schultz, J.**, Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (11), 5857-64.
- Sherwood, R. T.**, and Huisingsh, D. (1970). Calcium Nutrition and Resistance of Alfalfa to *Ditylenchus dipsaci*. *J Nematol* **2** (4), 316-23.
- Siciliano, F.**, Torres, P. S., Sendín, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellice, G., Ramallo, J., Castagnaro, A., Vojnov, A., and Marano, M. R. (2006). Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in *Citrus limon*. *Electronic Journal of Biotechnology* **9** (3).
- Sidhu, V. K.**, Vorholter, F. J., Niehaus, K., and Watt, S. A. (2008). Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol* **8**, 87.
- Singh, P. K.**, Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., and Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407** (6805), 762-4.
- Slater, H.**, Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J., and Dow, J. M. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **38** (5), 986-1003.
- Snoeijers, S.**, Pérez-García, A, Matthieu H.A.J. Joosten, Pierre J.G.M. De Wit (2000). The Effect of Nitrogen on Disease Development and Gene Expression in Bacterial and Fungal Plant Pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **106** (6), 493-506.
- Sole, M.**, Scheibner, F., Hoffmeister, A. K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M., and Buttner, D. (2015). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Secretes Proteases and Xylanases via the Xps Type II Secretion System and Outer Membrane Vesicles. *J Bacteriol* **197** (17), 2879-93.
- Solovyev, V.**, and Salamov, A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In "Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies" (R. W. Li, Ed.), pp. 61-78. Nova Science Publishers.
- Sondermann, H.**, Shikuma, N. J., and Yildiz, F. H. (2012). You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol* **15** (2), 140-6.
- Stanfield, S. W.**, Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R., and Ditta, G. S. (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for beta-(1----2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J Bacteriol* **170** (8), 3523-30.
- Starr, M.** (1981). The Genus *Xanthomonas*. In "The Prokaryotes", pp. 742-763. Springer Berlin Heidelberg.
- Staskawicz, B.**, Dahlbeck, D., Keen, N., and Napoli, C. (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169** (12), 5789-94.

- Stoodley, P.**, Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., and Costerton, J. W. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* **67** (12), 5608-13.
- Stoodley, P.**, Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S., and Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29** (6), 361-7.
- Studholme, D. J.**, and Dixon, R. (2003). Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185** (6), 1757-67.
- Sudarsan, N.**, Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H., and Breaker, R. R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321** (5887), 411-3.
- Sun, Q. J.**, Hu, J., Huang, G. X., Ge, C., Fang, R. X., and He, C. Z. (2005). Type II secretion pathway structural gene *xpsE*, xylanase and cellulase secretion and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *Plant Pathology* **54**, 15-21.
- Sutherland, J.** (1993). Xanthan. In "Xanthomonas" (C. E. Swings JG, Ed.), pp. 363-388
- Sutherland, I.** (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147** (Pt 1), 3-9.
- Swinger, K. K.**, Lemberg, K. M., Zhang, Y., and Rice, P. A. (2003). Flexible DNA bending in HU-DNA cocystal structures. *EMBO J* **22** (14), 3749-60.
- Szczesny, R.**, Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Coge, V., Bonas, U., and Buttner, D. (2010). Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* **187** (4), 983-1002.
- Taguchi, F.**, and Ichinose, Y. (2011). Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol Plant Microbe Interact* **24** (9), 1001-11.
- Talaga, P.**, Fournet, B., and Bohin, J. P. (1994). Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* **176** (21), 6538-44.
- Talaga, P.**, Stahl, B., Wieruszkeski, J. M., Hillenkamp, F., Tsuyumu, S., Lippens, G., and Bohin, J. P. (1996). Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans. *J Bacteriol* **178** (8), 2263-71.
- Talaga, P.**, Coge, V., Wieruszkeski, J. M., Stahl, B., Lemoine, J., Lippens, G., and Bohin, J. P. (2002). Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem* **269** (10), 2464-72.
- Tang, J. L.**, Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C., and Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet* **226** (3), 409-17.
- Tang, X.**, Xiao, Y., and Zhou, J. M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **19** (11), 1159-66.
- Tarutina, M.**, Ryjenkov, D. A., and Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281** (46), 34751-8.
- Thomas-Chollier, M.**, Defrance, M., Medina-Rivera, A., Sand, O., Herrmann, C., Thieffry, D., and van Helden, J. (2011). RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **39** (Web Server issue), W86-91.



- Tian, Y.**, Zhao, Y., Xu, R., Liu, F., Hu, B., and Walcott, R. R. (2014). Simultaneous Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* in Rice Seed Using a Padlock Probe-Based Assay. *Phytopathology* **104** (10), 1130-7.
- Tondo, M. L.**, Petrocelli, S., Ottado, J., and Orellano, E. G. (2010). The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. *PLoS One* **5** (5), e10803.
- Torres, P. S.**, Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M., and Vojnov, A. A. (2007). Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol* **9** (8), 2101-9.
- Tsai, C. M.**, and Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119** (1), 115-9.
- Tu, Y.** (2013). Quantitative modeling of bacterial chemotaxis: signal amplification and accurate adaptation. *Annu Rev Biophys* **42**, 337-59.
- Tuckerman, J. R.**, Gonzalez, G., Sousa, E. H., Wan, X., Saito, J. A., Alam, M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2009). An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* **48** (41), 9764-74.
- Van Golde, L. M. G.**, Schulman, H., Kennedy, E. P. (1973). Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1368-1372.
- Varga, J. J.**, Therit, B., and Melville, S. B. (2008). Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* **76** (11), 4944-51.
- Vivian, A.**, and Arnold, D. (2000). Bacterial Effector Genes and their Rol in the Host Pathogen Interaction. *Journal of Plant Pathology* **82**, 163-178.
- Vojnov, A. A.**, Zorreguieta, A., Dow, J. M., Daniels, M. J., and Dankert, M. A. (1998). Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* **144** (Pt 6), 1487-93.
- Vojnov, A. A.**, Slater, H., Newman, M. A., Daniels, M. J., and Dow, J. M. (2001). Regulation of the synthesis of cyclic glucan in *Xanthomonas campestris* by a diffusible signal molecule. *Arch Microbiol* **176** (6), 415-20.
- von Bodman, S. B.**, Dietz Bauer, W., and Coplin, D. L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Plant Science Articles* (Paper 16).
- Wan, X.**, Tuckerman, J. R., Saito, J. A., Freitas, T. A., Newhouse, J. S., Denery, J. R., Galperin, M. Y., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A., and Alam, M. (2009). Globins synthesize the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol* **388** (2), 262-70.
- Wang, H.**, Zhong, Z., Cai, T., Li, S., and Zhu, J. (2004a). Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*. *Arch Microbiol* **182** (6), 520-5.
- Wang, L. H.**, He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X., and Zhang, L. H. (2004b). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* **51** (3), 903-12.
- Wang, L.**, Rong, W., and He, C. (2008). Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, PghAxc and PghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **21** (5), 555-63.

- Wang, G.**, Lo, L. F., and Maier, R. J. (2012). A histone-like protein of *Helicobacter pylori* protects DNA from stress damage and aids host colonization. *DNA Repair (Amst)* **11** (9), 733-40.
- Wang, G.**, and Maier, R. J. (2015). Bacterial histone-like proteins: roles in stress resistance. *Curr Genet* **61** (4), 489-92.
- Wang, L.**, Vinogradov, E. V., and Bogdanove, A. G. (2013). Requirement of the Lipopolysaccharide O-Chain Biosynthesis Gene *wxocB* for Type III Secretion and Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Journal of Bacteriology* **195** (9), 1959–1969.
- Waters, C. M.**, and Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-46.
- Watnick, P. I.**, and Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* **34** (3), 586-95.
- Webb, J. S.**, Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185** (15), 4585-92.
- Wengelnik, K.**, and Bonas, U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **178** (12), 3462-9.
- Wengelnik, K.**, Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (1996). HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact* **9** (8), 704-12.
- Wieruszkeski, J. M.**, Bohin, A., Bohin, J. P., and Lippens, G. (2001). In vivo detection of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* by high-resolution magic angle spinning NMR. *J Magn Reson* **151** (1), 118-23.
- Williams, P. H.** (1980). Black rot: A Continuing Threat to World Crucifers. *Plant Disease* **64**, 736-742.
- Williams, P.**, Winzer, K., Chan, W. C., and Camara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362** (1483), 1119-34.
- Wolfe, A. J.**, and Visick, K. L. (2008). Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190** (2), 463-75.
- Yamazaki, A.**, Hirata, A., and Tsuyumu, S. (2008). HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 138-150.
- Yang, X.**, Beyenal, H., Harkin, G., and Lewandowski, Z. (2000). Quantifying biofilm structure using image analysis. *J Microbiol Methods* **39** (2), 109-19.
- Yang, T. C.**, Leu, Y. W., Chang-Chien, H. C., and Hu, R. M. (2009). Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. *J Bacteriol* **191** (7), 2266-75.
- Yasuzawa, K.**, Hayashi, N., Goshima, N., Kohno, K., Imamoto, F., and Kano, Y. (1992). Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. *Gene* **122** (1), 9-15.
- Yildiz, F. H.**, and Schoolnik, G. K. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (7), 4028-33.

- York, W. S.** (1995). A conformational model for cyclic beta-(1-->2)-linked glucans based on NMR analysis of the beta-glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* **278** (2), 205-25.
- Young, G. M.**, and Miller, V. L. (1997). Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol Microbiol* **25** (2), 319-28.
- Yun, M. H.**, Torres, P. S., El Oirdi, M., Rigano, L. A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Dankert, M. A., Bouarab, K., and Vojnov, A. A. (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol* **141** (1), 178-87.
- Zhang, L. H.**, and Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* **53** (6), 1563-71.