

Objetivos

- Estimación de la frecuencia de transposición en la cepa *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A.
- Evaluación del efecto de las condiciones de crecimiento y de condiciones ambientales estresantes sobre la frecuencia de movilización de elementos transposibles en la cepa 1448A y otras cepas de *P. syringae*.
- Identificación y caracterización de elementos móviles funcionales en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En este trabajo se han utilizado las cepas de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (raza 6) (Teverson, 1991) y 1302A (raza 4) (Taylor *et al.*, 1996), y la cepa *P. syringae* pv. syringae B728a (Loper & Lindow, 1987). El genoma completo de las cepas 1448A y B728a han sido previamente publicados (Joardar *et al.*, 2005)

Escherichia coli DH5 α fue cultivada de forma rutinaria en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) a 37°C y se utilizó para los experimentos de clonación. Las cepas de *P. syringae* se propagaron de forma rutinaria a 25°C en medio King B (KMB) (King *et al.*, 1954) y la frecuencia de transposición se estimó en general, en agar nutritivo (NA, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y NA suplementado con 5% (w/v) de sacarosa (SNA). El medio MG (Keane *et al.*, 1970) fue utilizado como un medio mínimo para evaluar el efecto de la limitación de nutrientes de la transposición. Cuando fue necesario, los medios de propagación se complementaron con tetraciclina (Tc) a una concentración final de 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Captura de secuencias de inserción

Para la captura de secuencias de inserción utilizamos el vector pGEN500 (Ohtsubo *et al.*, 2005). Este vector contiene el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es letal para la bacteria que porta el plásmido en presencia de sacarosa. Por tanto, la selección de bacterias en medio con sacarosa nos permite seleccionar clones en los que *sacB* ha sido inactivado.

Los transformantes de *P. syringae* con pGEN500 fueron seleccionados en KMB más tetraciclina después de la electroporación, se cultivaron en las mismas condiciones en medio líquido y se almacenaron a -80°C en glicerol al 20%. Para evitar la acumulación de inserciones, la frecuencia de inactivación de *sacB* se estimó, en general, a partir de cultivos frescos de transformantes obtenidos del stock a -80°C. Para obtener los transformantes, las células fueron incubadas a 28°C durante 2-4 horas en KMB inmediatamente después de la electroporación y una alícuota de 100 μl fue transferida a 5 ml de KMB+Tc. Después de un crecimiento durante toda la noche, unas alícuotas de este cultivo fueron criopreservadas, mientras que otras se utilizaron directamente para la estimación de la frecuencia de transposición. Para aislar inserciones en *sacB*, los cultivos se cultivaron en SNA+Tc y se analizaron los cambios en la movilidad de pGEN500 en geles de agarosa al 0,8% (Sesma *et al.*, 1998). La ubicación y el tamaño de las inserciones correspondientes se analizaron mediante PCR. La PCR se realizó con parejas de cebadores sacB5L1_sacB5R1, y sacB3L1_sacB3R1 (Tabla 2), diseñados a partir de la secuencia publicada de *sacB* (nº de acceso X02730), los cuales permiten la amplificación completa de la CDS de *sacB* (1422 nt), además de su promotor, en dos

fragmentos solapados. La localización de las inserciones se completó mediante la digestión de los amplicones y secuenciación.

Estimación de la frecuencia de transposición (FT)

Para la estimación de la frecuencia de transposición (FT) se ha utilizado la siguiente fórmula:

$$\frac{(Sac^R Tc^R cfu/ml * 0,92)}{Tc^R cfu/ml}$$

Donde $Sac^R Tc^R$ son el número total de colonias resistentes a sacarosa y Tc^R el total de colonias resistentes a tetraciclina, ambos por unidad de volumen. En esta fórmula, se multiplica por 0,92, ya que un promedio de alrededor del 8,5% de los clones resistentes a sacarosa (Sac^R) de los más de 500 clones analizados contenían pequeñas deleciones o mutaciones puntuales en *sacB*, en lugar de la inserción de un elemento móvil.

Los cinco transformantes de *P. syringae* con pGEN500 se cultivaron durante toda la noche a 25°C en agitación (200 rpm) en medio rico (KMB líquido) o en medio mínimo (MG), ambos medios suplementados con tetraciclina. A la mañana siguiente se recuperaron los cultivos mediante centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en tampón Ringer (Ringer Solution 1/4 strength; Oxoid, Basingstoke, UK). Una vez ajustada la D.O._{600nm} a 0,2 (aprox. 10^8 ufc/ml) las suspensiones se sembraron en placas de NA+Tc y de SNA+Tc para estimar la frecuencia de transposición en diferentes condiciones de crecimiento. Cada experimento se repitió al menos siete veces.

Para la evaluación de la transposición *in planta*, se procedió a la inoculación, con jeringuillas sin aguja, de suspensiones bacterianas con aproximadamente 5×10^8 ufc/ml de clones de Pph 1448A (pGEN500) en las dos primeras hojas de una planta compatible (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen) y en hojas de una planta incompatible (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Estas plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento (Versatile Environmental Test Chamber MLR-350H, SANYO) con un fotoperíodo de 16 h de luz a 20°C y 8h de oscuridad a 18°C, y al 80% de humedad relativa. Seis horas después de la inoculación con la suspensión bacteriana se realizó la valoración de poblaciones sobre 5 discos de hoja de 1cm de diámetro macerados en 10 mM MgCl₂. La FT se evaluó mediante siembra en placas de NA y SNA suplementadas con Tc, para seleccionar nuestra población, y cicloheximida (5 µg/ml), para evitar el crecimiento de hongos. El experimento se repitió al menos tres veces.

El análisis de los datos de frecuencia de transposición en diferentes condiciones de cultivo se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores ($p < 0,05$).

Evaluación de la transposición en células sometidas a choque térmico

Las células crecieron durante toda la noche en KMB líquido a 25°C en agitación (200 rpm). Por la mañana, las células se recuperaron por centrifugación, se lavaron con un volumen tampón Ringer (Ringer Solution 1/4 strength; Oxoid, Basingstoke, UK) y se resuspendieron en el mismo tampón hasta alcanzar una D.O. _{600nm} de 0,2 (aprox. 10⁸ ufc/ml). Para someterlas a un choque térmico, las suspensiones se colocaron en un baño de agua a 38°C durante 5 minutos, para alcanzar esta temperatura rápida y homogéneamente, y posteriormente se mantuvieron 30 minutos en una incubadora de aire a 38°C y con agitación (200 rpm). Tras el choque térmico, estas suspensiones se guardaron en hielo hasta ser sembradas en placas de NA+Tc y en SNA+Tc. Inicialmente se evaluó el efecto de choques térmicos utilizando temperaturas más elevadas, pero se observó un declive en las poblaciones bacterianas a partir de 40 °C que dificultaba la estimación de las frecuencias de transposición. Por tanto, se decidió utilizar como temperatura de choque térmico 38 °C, ya que el máximo de crecimiento de *P. syringae* es 30 °C.

Técnicas moleculares

Extracción y aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep)

La extracción de ADN plasmídico a pequeña escala se realizó siguiendo el método de lisis alcalina de Zhou *et al.*, (1990). La separación del ADN plasmídico, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa, al 0,8%. Se sometió a un voltaje constante de 60V durante 3-4 horas.

Amplificación de ADN mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando 5 µl de una suspensión de ADN genómico (concentración: 15-20 µg/ml) en un volumen final de 25 µl conteniendo 1x NH₄ Buffer (Bioline), 1,5 mM MgCl₂, 12,5 µM de cada dNTP (Master Mix Bioline), 1 unidad de polimerasa Taq (BioTaq ADN Polimerase Mix; Bioline) y 20 pmol de cada cebador.

Tabla 2: Lista de cebadores empleados en la PCR.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Zona de unión del cebador ^a	Tamaño del amplicón (nt)
Pareja 5'			
sacB5L1	CCCGTAGTCTGCAAATCCTT	171-190	856
sacB5R1	GCCGTAATGTTTACCGGAGA	1008-1027	
Pareja 3'			
sacB3L1	GGTCAGGTTTCAGCCACATTT	951-970	953
sacB3R1	GGCATTTCCTTTTTCGTTTT	1885-1904	

^a Las coordenadas de unión de los cebadores se muestran con relación a la secuencia de *sacB* con número de acceso X02730; en esta secuencia, el gen *sacB*, incluido el promotor, se extiende entre las coordenadas 230-1885.

Se empleó el siguiente programa de amplificación en el termociclador:

- 5 minutos de desnaturalización a 94°C
- 30 ciclos de:
 - 94°C durante 30 segundos.
 - 58°C durante 30 segundos.
 - 72°C durante 3 minutos.
- Un ciclo de extensión de 6 minutos a 72°C.
- Almacenamiento a 4°C.

La verificación de los fragmentos de ADN obtenidos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% utilizando tampón 1xTAE (Sambrook *et al.*, 1989) a voltaje constante 110V durante 40 minutos. Se estimó analíticamente la concentración de ADN por comparación de la intensidad de la fluorescencia de las bandas con la correspondiente a las bandas del marcador Hyperladder I (Bioline).

Previamente a la secuenciación, las muestras de la PCR se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). La secuenciación se realizó siguiendo el método Sanger en la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Korea).

Hibridación de ADN (Southern blot) y análisis de las secuencias

El ADN plasmídico separado en geles de agarosa se transfirió a membranas de nylon (Roche Diagnostics) según procedimientos estándar. Para la preparación de las sondas de hibridación, se amplificó una copia completa de *IS801* de la cepa 1448A utilizando cebadores específicos (Tabla 3). Este fragmento fue clonado en pGEM-T Easy, que se utilizó como molde para la amplificación del ADN. La preparación de sondas marcadas con digoxigenina mediante PCR, hibridación de Southern [54], y la detección de señales de hibridación se llevó a cabo con el kit “DIG DNA labeling and detection” (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Cebadores usados para la amplificación de las secuencias de inserción.

IS (tamaño, nt)	Primer	Secuencia (5'-3')	Posición ^a	Producto tamaño, nt
<i>IS801</i> (1512)	IS801c-F	CGTCCCCTCCGAACTCAT	19521	1555
	IS801.11155_nR	ACGCGACCTGCAGAACAG	21076	

^a Los números corresponden a su posición dentro del genoma de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (nº de acceso P000058).

Para alinear secuencias y obtener una secuencia consenso, se utilizó Contig Express Project 2006 Invitrogen corp. (Components of vector NTI advance 10.3.0. <http://www.invitrogen.com/bioinformatics>).

Para el alineamiento simultáneo de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se utilizó el programa online MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) Para traducir las secuencias se utilizó BLASTn y BLASTx, Basic Local Alignment Search Tool. Para el análisis del ADN y secuencias proteicas se utilizó The Sequence Manipulation Suite, versión 2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>).

Resultados

La frecuencia de transposición es similar en diferentes condiciones de cultivo.

El análisis del genoma de Pph 1448A indica que ha habido eventos únicos e independientes de transposición dentro de 1448A. Para probar la hipótesis de que algunas de estas inserciones provienen de un evento de transposición en el genoma, se estimó la frecuencia de transposición de elementos móviles de ADN de *P. syringae* pv. phaseolicola utilizando el vector trampa pGEN500 (Ohtsubo *et al.*, 2005). Este plásmido contiene *sacB*, gen de *Bacillus subtilis*, que confiere letalidad en presencia de sacarosa en muchas bacterias Gram-negativas, proporcionando así una selección positiva para las inserciones de elementos móviles en *sacB* (Touchon & Rocha, 2007). Se examinó la frecuencia de transposición en transformantes individuales de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A y en poblaciones heterogéneas originadas a partir de experimentos de transformación únicos, que hemos denominado "grupos de transformantes".

La frecuencia global de transposición de los diferentes grupos de transformantes o clones de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (pGEN500), procedentes de experimentos independientes de electroporación, varió entre $2,6 \times 10^{-5}$ y $1,1 \times 10^{-6}$, en función del transformante (Tabla 4). Se observaron frecuencias de electroporación similares después de seis transferencias consecutivas en medio líquido KMB más tetraciclina (datos no mostrados), lo que sugiere que los clones *sac*^R no se acumulan en las poblaciones bacterianas. Igualmente, se encontraron frecuencias comparables de transposición en *P. syringae* pv. phaseolicola cepa 1449, lo que sugiere que los datos obtenidos para la cepa 1448A pueden ser representativos de este patovar.

Se ha documentado que las condiciones ambientales, y sobre todo las condiciones estresantes (Ohtsubo *et al.*, 2005, Valle *et al.*, 2007, Drevinek *et al.*, 2010), pueden influir sobre la frecuencia de transposición en diversas bacterias (Nagy & Chandler, 2004), aunque el efecto parece ser específico para cada tipo de elemento móvil (Mahillon & Chandler, 1998, Nagy & Chandler, 2004). Por tanto, decidimos evaluar las frecuencias de transposición en bacterias sometidas a condiciones potencialmente favorables y estresantes utilizando cinco transformantes independientes de 1448A (pGEN500). No se observaron diferencias significativas entre las frecuencias de transposición estimadas de forma independiente para cada uno de los transformantes y en cada una de las condiciones ensayadas. En consecuencia, los nuevos análisis se realizaron utilizando los datos combinados de todos los transformantes para cada condición. Las frecuencias de transposición media no mostraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones evaluadas, que incluyeron bacterias cultivadas en medio líquido rico (KMB; frecuencia de transposición $7,72 \pm 6,85 \times 10^{-6}$) y medio mínimo (MG; $6,56 \pm 5,73 \times 10^{-6}$), y bacterias recuperadas de hojas de judía cv.

Tendergreen (hospedador compatible; $6,77 \pm 3,51 \times 10^{-6}$) y hojas de tabaco cv. Xanthi (hospedador incompatible, $3,87 \pm 2,31 \times 10^{-6}$) (Figura 1) inoculadas artificialmente. Estos resultados sugieren que las condiciones de crecimiento no influyen significativamente sobre la frecuencia de transposición de elementos móviles de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A.

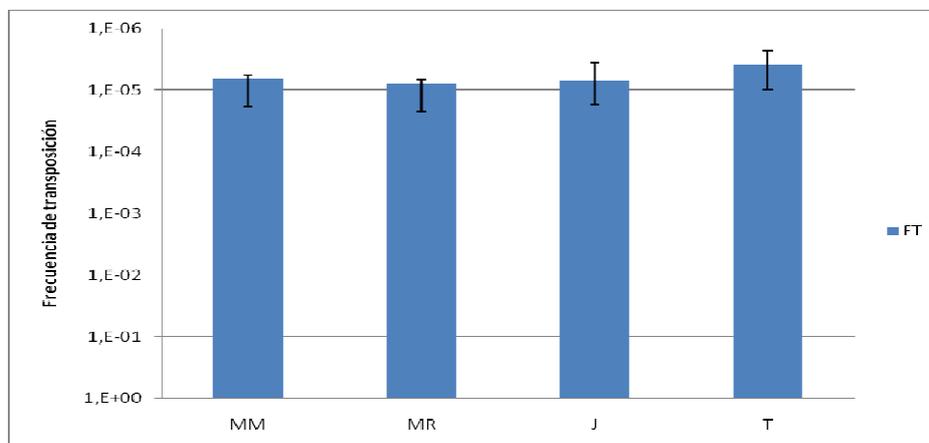


Figura 1: Frecuencias de transposición de clones de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (pGEN500) en medio rico (MR), medio mínimo (MM), planta de judía (J) y planta de tabaco (T). Los datos están representados en columnas, en las que las líneas verticales terminales indican la desviación típica.

Efecto de la temperatura en la frecuencia de transposición

En algunas bacterias se ha documentado la variación de la frecuencia de transposición en relación con la temperatura de crecimiento (Nagy & Chandler, 2004, Ohtsubo et al., 2005). Por ejemplo, en *Burkholderia multivorans* se ha observado un aumento de la frecuencia de transposición de hasta siete veces a 42 °C, aunque no en otras condiciones estresantes (Ohtsubo et al., 2005). Dado que la temperatura es un factor importante durante el crecimiento de *P. syringae* y que regula la expresión de diversos genes implicados en virulencia (Ullrich et al., 2000, Arnold et al., 2011), decidimos evaluar el efecto de la temperatura sobre la movilidad de elementos transponibles en esta bacteria. En el experimento se incluyeron cepas de distintos patovares de *P. syringae* con el fin de evaluar la posibilidad de que existan diferencias de comportamiento entre distintos patovares.

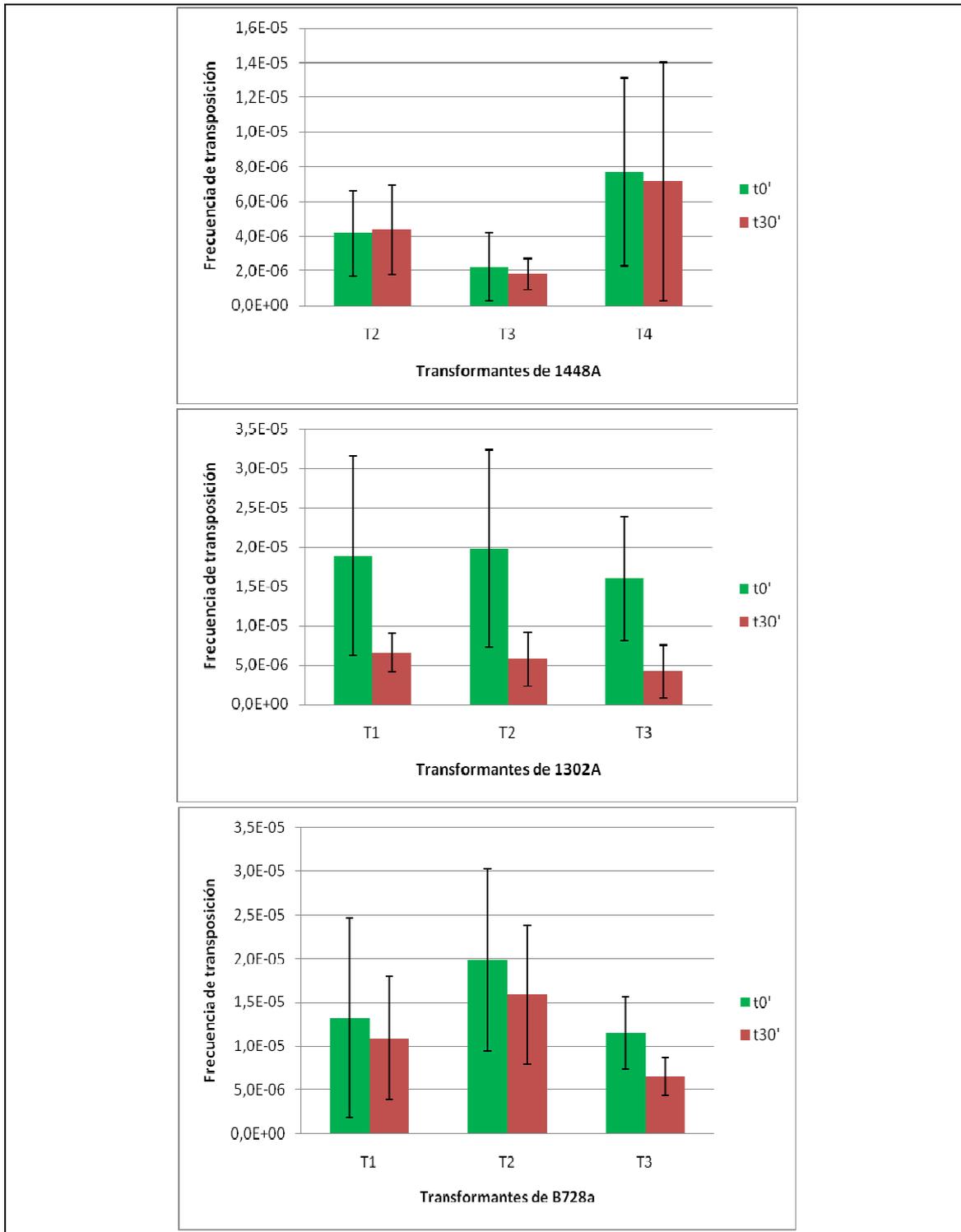


Figura 2: Frecuencias de transposición por cada transformante de 1448A, 1302A y B728a, conteniendo pGEN500, para los tratamientos a tiempo 0 min (no sometidas a estrés) y tiempo 30 min de choque térmico (38°C agitación 200 rpm). T1, T2, T3 y T4 representan los valores medios para clones independientes de cada cepa de *P. syringae*. Las líneas negras en la parte superior de las barras indican la desviación típica.

En Figura 2 se puede observar las variaciones en las frecuencias de transposición en diversos transformantes independiente de las cepas 1448A, 1302A y B728a conteniendo

el vector trampa pGEN500. Las suspensiones bacterianas tenían una concentración inicial de aproximadamente 10^8 ufc/ml. Tras someterlas a un choque térmico (38°C durante 30 minutos) la frecuencia de transposición disminuyó ligeramente, pero al analizar los datos de forma estadística no se observaron diferencias significativas entre las FTs en suspensiones bacterianas que no fueron sometidas a estrés y las FTs expuestas a condición de estrés (alta temperatura). Estos resultados sugieren que el estrés producido por altas temperaturas no implica un aumento apreciable de la frecuencia de transposición.

Identificación funcional de elementos móviles en Pph 1448A.

Para la identificación de elementos móviles funcionales en Pph 1448A hemos utilizado el vector trampa pGEN500, que porta el gen *sacB*. El procedimiento empleado consistió en seleccionar clones que crecían en placas con sacarosa, evaluar la presencia de inserciones en *sacB* por cambios en la movilidad electroforética de los plásmidos, e identificar las correspondientes inserciones mediante hibridación y secuenciación.

Se analizaron los perfiles plasmídicos de 460 colonias *sac*^R, obtenidas a partir de tres poblaciones de transformantes (PT), mediante hibridación de Southern y utilizando una sonda específica *IS801*. Sólo el 10,7% de los plásmidos de los clones *sac*^R no hibridaron con *IS801* (Tabla 4). La secuenciación del gen *sacB* en estas cepas reveló que, o bien contenían inserciones de *MITEPsyI* (2,2% de los plásmidos) o tenían deleciones o mutaciones puntuales en *sacB* (8,5%).

El resto de clones con pGEN500, lo que representa un 89,3%, contenían ADN que mostró hibridación cruzada con la sonda *IS801* (Tabla 4). Sin embargo, los plásmidos que hibridaron con *IS801* mostraban distintos retrasos de movilidad lo que sugiere que portaban inserciones de distinto tamaño. El análisis de estos clones mediante PCR y secuenciación mostró que podían ser de distintos tipos. El 65% de estos plásmidos contenían insertos de un tamaño compatible con la longitud completa de *IS801* (1512 nt), mientras que el resto de los plásmidos contenían inserciones derivadas de *IS801* de 229 nt, 360 nt, 679 nt, y más de 1,5 Kb (Figura 3), como se verificó por secuenciación. Los derivados más pequeños, que representan el 26,3% del número total de inserciones de *IS801*, son el resultado de una transposición terminal (one-ended transposition).

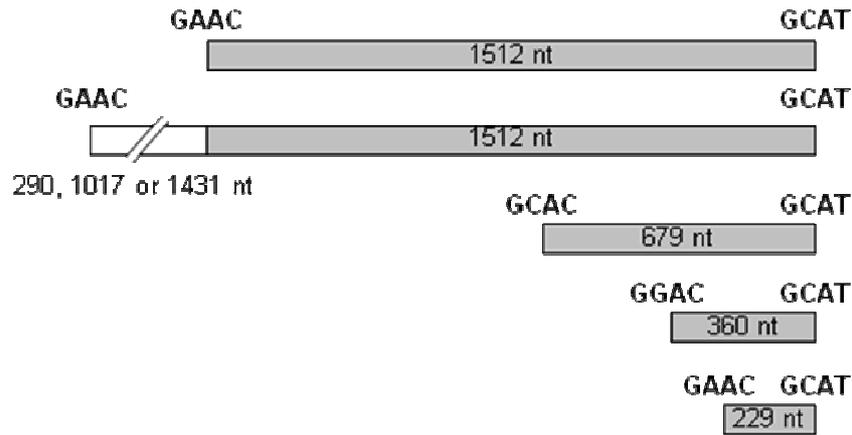


Figura 3. Estructura y terminación de *IS801* e inserciones derivadas de *IS801*. Las cajas grises indican el elemento *IS801* silvestre (1512 nt) y las secuencias miniatura derivadas del elemento completo, con su tamaño indicado en el interior de la caja; todos ellos comparten la misma terminación derecha. La caja blanca rota indica los tres fragmentos diferentes del gen P_{SPPH0008}/P_{SPPH0017} que fueron movilizados por *IS801* en tres experimentos diferentes, con sus respectivos tamaños. Los dibujos están a escala.

Tabla 4. Tipo y número de elementos móviles atrapados en tres poblaciones de transformantes (PT) y cuatro transformantes individuales (T1 a T4) de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A que contienen el vector trampa pGEN500

Elemento móvil	Tamaño (kb)	Número de plásmidos portadores de un elemento móvil								Total	% de plásmidos Sac ^R	% de inserciones ^a
		PT1	PT2	PT3	T1	T2	T3	T4				
Frecuencia de transposición ($\times 10^{-6}$)		26.0 \pm 3.0	3.7 \pm 1.2	3.8 \pm 0.6	13.0 \pm 2.4	1.1 \pm 0.5	9.8 \pm 0.8	9.6 \pm 0.8				
IS801	>1.5	1	0	0	1	0	0	1	3	0.7	0.7	
	1.5	69	62	56	25	30	31	27	300	65.2	71.2	
	0.679	19	13	25	6	4	1	3	71	15.4	16.9	
	0.360	0	0	0	0	1	0	1	2	0.4	0.5	
	0.229	6	15	8	2	0	3	1	35	7.6	8.3	
MITE _{PsyI}	0.1	1	0	4	1	1	1	2	10	2.2	2.4	
None	-	4	9	8	5	4	4	5	39	8.5		
Total no.		100	99	101	40	40	40	40	460			

Discusión

La variabilidad en la abundancia de IS en los genomas de procariotas es muy grande y no se puede explicar fácilmente ya que el análisis de más de 200 genomas indicó que aparentemente no está relacionada con la patogenicidad o las tasas de transferencia horizontal de genes, siendo el tamaño del genoma el único indicador significativo de abundancia y diversidad (Touchon & Rocha, 2007). El genoma de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A contiene 102 copias de IS completos, que es casi el doble del número que se podría esperar dado su tamaño del genoma (Touchon & Rocha, 2007). En este caso, es probable que el complemento de genes de virulencia presentes en la cepa 1448A sea en parte responsable de esta abundancia, dada la estrecha relación entre los genes de virulencia y elementos móviles, y en particular con IS801 (Kim et al., 1998, Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2002, Lindeberg *et al.*, 2008). Los elementos móviles pueden contribuir fácilmente a la transferencia horizontal de genes de virulencia y promover la recombinación, lo que facilita la evolución de las nuevas especificidades (Yan *et al.*, 2008, Lindeberg *et al.*, 2009). Además, los elementos genéticos móviles también participan en la inactivación y la variación alélica de genes efectores que inducen una respuesta de resistencia en la planta hospedadora, lo que facilita la rápida adaptación del patógeno a los constantes cambios en los mecanismos de vigilancia y resistencia de la planta (Rivas *et al.*, 2005, Stevens *et al.*, 1998). Por lo tanto, la abundancia de elementos móviles en la cepa 1448A podría ser un reflejo tanto de la adquisición de genes de virulencia como de las repercusiones que tienen al facilitar la plasticidad genómica y la adaptación a nuevos nichos.

La frecuencia de transposición de la cepa 1448A varió aproximadamente entre 10^{-5} y 10^{-6} , según el clon. Posiblemente esta variación se debe a un fenómeno que tiene efecto general, ya que existe una proporción similar de los distintos tipos de inserción entre los diferentes transformantes analizados (Tabla 4). Una explicación obvia es que, para cada transformante, hay una diferencia de nivel de toxicidad de los vectores trampa en ausencia de sacarosa. Esto previsiblemente causaría la muerte prematura de las células, a pesar de que no estén expuestas a la sacarosa, y se traduciría en un aumento artificial de la tasa aparente de transposición, de hecho, en algunos clones se observó una falta de correspondencia entre la densidad óptica del cultivo y el número esperado de unidades formadoras de colonias (no mostrado). Sin embargo, la frecuencia de transposición se mantuvo estable para cada clon en todas las condiciones de crecimiento analizadas, incluyendo las transferencias en cultivos repetidos, que apoyan la validez del método de análisis comparativos.

El análisis de las frecuencias de transposición no mostró diferencias significativas en distintas condiciones de crecimiento (Fig. 1). Así, se estimaron frecuencias similares en células obtenidas de plantas compatibles y en células recuperadas de plantas incompatibles. Dado que la interacción con una planta incompatible genera unas importantes condiciones de estrés, como la exposición a sustancias tóxicas para el

patógeno, era de esperar que se generara una respuesta SOS en el patógeno y un aumento en la transposición de elementos móviles. Igualmente, tampoco se observó un aumento de la transposición en células crecidas en un medio mínimo o sometidas a estrés térmico, que también suponen condiciones estresantes para la bacteria (Figuras 1 y 2). Estos resultados son hasta cierto punto inesperados, y sugieren que la transposición de elementos móviles en *P. syringae* no está influida por el tipo de interacción con la planta huésped o por las condiciones medioambientales. Sin embargo, no podemos descartar que haya un aumento de la transposición de elementos cuya frecuencia de salto es menor que el límite de detección en las condiciones experimentales de este trabajo, o que se produzca una variación en la selección de las dianas de inserción. Dado que se han examinado distintas cepas, pertenecientes a diversos patovares, estos resultados podrían ser generalizables a todas las bacterias del complejo *P. syringae*.

El uso de un vector trampa en un ensayo funcional, ha permitido la identificación de dos elementos móviles activos: IS801 y MITE $PsyI$, a pesar de que *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A alberga por lo menos diecinueve tipos de elementos móviles. Sorprendentemente, se observó la movilización de secuencias miniatura que corresponden a fragmentos truncados de IS801 y que, junto con MITE $PsyI$, representaron alrededor del 28% de los elementos movilizados en la cepa 1448A. Entre los 500 clones analizados no se observó la incorporación de ninguno de los otros tipos de elementos móviles que se encuentran en la cepa 1448A, lo que indica que se podrían movilizar a una frecuencia inferior a 10^{-8} o que se han fijado en el genoma.

La distribución de IS801 está limitada a la especie *P. syringae*, y está estrechamente asociada a los genes de virulencia (Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2002). A menudo este elemento aparece como un elemento truncado de varios tamaños, y cuyos orígenes no están claros (Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2002, Joardar *et al.*, 2005). La identificación en este trabajo de secuencias miniatura derivadas de IS801 podría indicar que estas secuencias parciales de IS801 que se encuentran en los genomas de *P. syringae* se han generado por transposición. Sin embargo, un análisis retrospectivo de las secuencias parciales de IS801 presentes en genomas completos de plásmidos y cromosomas de *P. syringae* sugiere que la mayoría de ellos se originaron por recombinación, en vez de por una transposición terminal (Bardaji *et al.*, 2011). Por consiguiente, nuestros resultados sugieren que IS801 y los correspondientes fragmentos miniatura derivados por transposición, preferentemente podrían contribuir a la generación de regiones de recombinación en torno a los genes de virulencia en lugar de servir como elementos de transporte. De hecho, las secuencias de inserción se sabe que juegan un papel importante en la flexibilidad del genoma, y la variación entre los aislamientos de *P. syringae* parece deberse más a la recombinación que a la mutación (Stavrinides *et al.*, 2006, Yan *et al.*, 2008).

Al igual que ocurre con IS91 (Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2002), hemos observado que IS801 también puede movilizar DNA adyacente, aunque con baja frecuencias. En tres eventos independientes, hemos observado la movilización de diferentes fragmentos

parciales del mismo gen, PSPPH_0008/PSPPH_0017 que codifica para la subunidad alfa de la oxidoreductasa de molibdopterina y que en todos los casos se iniciaba en un tetranucleótido idéntico al extremo 5' de IS801, GAAC (Figura 2). Como existen dos copias de IS801 asociadas a dos copias idénticas del gen, no podemos deducir si el gen movilizado es PSPPH_0008 o PSPPH_0017. En cualquier caso, no tenemos aún una explicación satisfactoria por esta preferencia en la movilización de DNA, que posiblemente no se deba a que este gen confiera un fenotipo seleccionable, ya que la inserción de IS801 ha eliminado hasta 350 aa del extremo 3' de cada gen, mientras que faltan al menos 153 nt del extremo 5' del locus PSPPH_0008. Estas deleciones posiblemente han conducido a que ambos loci sean inactivos. Sin embargo, nuestros resultados confirman que IS801 podría movilizar por transposición los genes de virulencia con los que frecuentemente está asociada. A pesar de que la movilización de ADN adyacente por IS801 se produjo a baja frecuencia en nuestras condiciones experimentales, es posible que la interacción con las plantas hospedadoras ofrezca un ambiente altamente selectivo que favorezca el intercambio de genes de efectores y otros genes de virulencia movilizados por IS801.

Un resultado notable de este trabajo es la identificación de un MITE funcionalmente activo en la cepa 1448A, que hemos designado MITE P_{sy1} . Aunque este tipo de elementos son comunes en bacterias, y hay evidencias indirectas de su movilidad (Zhou *et al.*, 2008, Robertson *et al.*, 2004), esta es la primera vez que se demuestra la movilización espontánea de un MITE en su huésped natural, abriendo el camino para probar funcionalmente los requisitos y mecanismos moleculares para su transposición. La inserción de MITE P_{sy1} en una CDS implica un cambio en el marco de lectura, porque el elemento es de 100 nt de longitud y produce una duplicación de 4 nt, que puede conducir a la inactivación de genes o a la generación de nuevos alelos. De hecho, la inserción de una secuencia de 104 nt (identificado aquí como MITE P_{sy1} además de la duplicación de 4 nt) en el extremo 3' del gen efector *avrPphE* (sin. hopX1) en una cepa de *P. syringae* pv. phaseolicola condujo a la generación de un nuevo alelo que ya no indujo la respuesta de hipersensibilidad en las variedades de judía resistentes, causando la ampliación de su espectro de huéspedes (Stevens *et al.*, 1998). Por lo tanto, será importante examinar cuidadosamente los genes de efectores en diferentes bacterias fitopatógenas para detectar la presencia de secuencias repetidas internas o flanqueantes que podrían participar en su movilidad o alterar su secuencia codificante, ya que pueden representar nuevos elementos móviles en miniatura. Ejemplos de este tipo de pequeñas secuencias repetidas ya se han encontrado en el cromosoma y en plásmidos de diferentes cepas de *P. syringae* (Joardar *et al.*, 2005) al igual que se han encontrado modificando el espectro de huéspedes de *Ralstonia solanacearum* y permitiendo la generación de genotipos altamente virulentos del patógeno (Robertson *et al.*, 2004).

Conclusiones

- Mediante la utilización de un vector trampa, se ha establecido que la frecuencia de transposición en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A varía entre $2,6 \times 10^{-5}$ y $1,1 \times 10^{-6}$, dependiendo del clon.
- No se han observado diferencias significativas en la frecuencia de transposición en bacterias sometidas a diferentes condiciones de crecimiento, o inoculadas en plantas compatibles o incompatibles, lo que sugiere que las condiciones de crecimiento no afectan significativamente a la variabilidad de la frecuencia de transposición.
- Igualmente, no se han observado variaciones en las frecuencias de transposición en diferentes cepas de *P. syringae* tras someterlas a un choque térmico, lo que sugiere que las condiciones de estrés no modifican la frecuencia de transposición en esta bacteria.
- El uso del vector trampa pGEN500 ha permitido la identificación de dos elementos móviles funcionales en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A: IS801 y la secuencia miniatura MITE*PsyI*.

Bibliografía

- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W. and Mansfield, J. W. (2011) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel. *Mol. Plant Pathol.*, 12, 617-627.
- Arnold, D. L., R. W. Jackson, A. J. Fillingham, S. C. Goss, J. D. Taylor, J. W. Mansfield, and A. Vivian. (2001). Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *Microbiology* 147:1171-1182.
- Bardaji, L., Añorga, M., Jackson, R. W., Martínez-Bilbao, A., Yanguas, N. and Murillo, J. (2011) Miniature transposable sequences are frequently mobilized in the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS ONE*, pending decision.
- Buell, CR., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, IT., *et al.*, (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 10181-10186.
- Craig, NL., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, AM., editors (2002) *Mobile DNA II*. Washington, D.C.: ASM Press.
- Delilhas N (2008) Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. *Molecular Microbiology* 67: 475-481.
- Drevinek, P., Baldwin, A., Lindenburg, L., Joshi, L. T., Marchbank, A., Vosahlikova, S., *et al.* (2010) Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 34-40.
- Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F. (2002) Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 42, 303-313.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., Kado, C.I., (1985) Positive selection procedure for the entrapment of insertion sequences elements in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 164: 918-921.
- González, A. J., Landeras, E., and Mendoza, M.C. (2000b). Pathovars of *Pseudomonas syringae* causing bacterial brown spot and halo blight in *Phaseolus vulgaris* L. are distinguishable by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:850-854.
- Jackson, RW., Vinatzer, B., Arnold, DL., Murillo, J. (2011) The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile Genetic Elements*, in press.

- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M., *et al.* (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J. Bacteriol.*, 187, 6488-6498.
- Keane, PJ., Kerr, A., New, PB. (1970) Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal of Biological Sciences* 23: 585-595.
- Kim, J. F., A. O. Charkowski, J. R. Alfano, A. Collmer, and S. V. Beer. 1998. Transposable elements and bacteriophage sequences flanking *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1247-1252.
- King, EO., Ward, NK., Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., Collmer, A. (2009) The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires. *Molecular Plant Pathology* 10: 767-775.
- Lindeberg, M., Myers, CR., Collmer, A., Schneider, DJ. (2008) Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21: 685-700.
- Loper, J. E. & Buyer, J. S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol Plant-Microbe Interact* 4, 5-13.
- López-López, K., Hernández-Flores, J. L., Cruz-Aguilar, M. and Alvarez-Morales, A. (2004) In *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, expression of the *argK* gene, encoding the phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase, is regulated indirectly by temperature and directly by a precursor resembling carbamoylphosphate. *J. Bacteriol.*, 186, 146-153.
- Mahillon, J. and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 725-774.
- Mansfield, JW. (2009) From bacterial avirulence genes to effector functions via the *hrp* delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology* 10: 721-734.
- McEvoy, CRE., Falmer, AA., van Pittius, NCG., Victor, TC., van Helden, PD., *et al.* (2007) The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 87: 393-404.

- Nagy, Z. and Chandler, M. (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Res. Microbiol.*, 155, 387-398.
- Oguiza, J. A., A. Rico, L. A. Rivas, L. Sutra, A. Vivian, and J. Murillo. 2004. *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. *Microbiology* 150:473-482.
- Ohtsubo, Y., Genka, H., Komatsu, H., Nagata, Y. and Tsuda, M. (2005) High-temperature-induced transposition of insertion elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1822-1828.
- Richter, GY., Björklöf, K., Romantschuk, M., Mills, D. (1998) Insertion specificity and *trans*-activation of IS801. *Mol Gen Genet* 260: 381-387.
- Rico, A., López, R., Asensio, C., Aizpún, M., Asensio-S.-Manzanera, C., and Murillo, J. 2003b. Nontoxigenic strains of *P. syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology* En prensa.
- Rivas, LA., Mansfield, J., Tsiamis, G., Jackson, RW., Murillo, J. (2005) Changes in race-specific virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are associated with a chimeric transposable element and rare deletion events in a plasmid-borne pathogenicity island. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3778-3785.
- Robertson, A. E., Wechter, W. P., Denny, T. P., Fortnum, B. A. and Kluepfel, D. A. (2004) Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17, 1376-1384.
- Sambrook, nJ., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sarkar, SF., Gordon, JS., Martin, GB., Guttman, DS. (2006) Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* 174: 1041-1056.
- Sarkar, SF., Guttman, DS. (2004) Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1999-2012.
- Sesma, A., Sundin, GW., Murillo, J., (1998) Closely related replicons coexisting in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* show a mosaic organization of the replication region and altered incompatibility behavior. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3948-3953.
- Siguiet, P., Filee, J., Chandler, M. (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology* 9: 526-531.

- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M. (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research* 34: D32-D36.
- Stavrinos, J., Ma, W. and Guttman, D. S. (2006) Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens. *PLoS Pathogens*, 2, e104.
- Stevens, C., M. A. Bennett, E. Athanassopoulos, G. Tsiamis, J. D. Taylor, and J. W. Mansfield. 1998. Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* lead to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. *Mol. Microbiol.* 29:165-177.
- Sundin, GW., Murillo, J. (2009) Gene traders: characteristics of native plasmids from plant pathogenic bacteria. In: Jackson RW, editor. *Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology*. Cambs: Caister Academic Press. pp. 295-310.
- Sundin, GW., (2007) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annu Rev Phytopathol* 45: 129-151.
- Szabo, LJ., Mills, D., (1984) Integration and excision of pMC7105 in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: involvement of repetitive sequences. *J Bacteriol* 157: 821-827.
- Taylor, J. D., Teverson, D. M., Allen, D. J., and Pastor-Corrales, M. A. 1996. Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathol.* 45:469-478.
- Teverson, DM. (1991) Genetics of pathogenicity and resistance in the halo-blight disease of beans in Africa [Ph. D. Thesis]. Birmingham, UK: University of Birmingham.
- Touchon, M., Rocha, EPC., (2007) Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution* 24: 969-981.
- Ullrich, M. S., Schergaut, M., Boch, J. and Ullrich, B. (2000) Identification and characterisation of novel temperature-responsive genetic loci in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Microbiology*, 146, 2457-2468.
- Valle, J., Vergara-Irigaray, M., Merino, N., Penades, J. R. and Lasa, I. (2007) regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J. Bacteriol.*, 189, 2886-2896.
- Yan, S., Liu, H., Mohr, T. J., Jenrette, J., Chiodini, R., Zaccardelli, M., *et al.* (2008) Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen

Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000, a very atypical tomato strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 3171-3181.

Young, JM., (2010) Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 92:S5-S14.

Zhou, F., Tran, T., Xu, Y., (2008) Nezha, a novel active miniature inverted-repeat transposable element in cyanobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365: 790-794.