

Universidad Pública de Navarra
Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology

**Regulación global mediada por los
sistemas GacS/GacA y Rsm/Csr en
Pseudomonas syringae pv. phaseolicola y
su impacto en el ciclo de vida de la bacteria**

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor, presentada por:

Diana Ramírez Zapata

Director: Dr. Jesús Murillo Martínez

Catedrático de Universidad
Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology
Universidad Pública de Navarra

Pamplona, 2021

COMITÉ EVALUADOR

Presidente

Dr. Cayo Ramos Rodríguez

Área de Genética
Universidad de Málaga
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y
Mediterránea “La Mayora”
Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC)

Suplente Presidente

Dra. Marta Martín

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Secretaria

Dra. Soledad Sacristan Benayas

Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,
Alimentaria y de Biosistemas
Universidad Politécnica de Madrid
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas
(CBGP)
Universidad Politécnica de Madrid (UPM)—Instituto
Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y
Alimentaria (INIA)

Suplente Secretario

Dr. Iñigo Ruiz de Escudero

Departamento de Agronomía, Biotecnología y
Alimentación
Institute for Multidisciplinary Research in Applied
Biology-IMAB
Universidad Pública de Navarra

Vocal

Dr. Rafael Rivilla Palma

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Suplente Vocal

Dr. Alejandro Toledo-Arana

Instituto de Agrobiotecnología (IdAB)
CSIC-Gobierno de Navarra

Revisores externos

Dr. Rafael Rivilla Palma

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Suplentes Revisores externos

Dra. Marta Martín

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Luis Rodríguez Moreno

Departamento de Biología Celular, Genética y
Fisiología
Universidad de Málaga

Dr. Iñigo Ruiz de Escudero

Departamento de Agronomía, Biotecnología y
Alimentación
Institute for Multidisciplinary Research in Applied
Biology-IMAB
Universidad Pública de Navarra

Dr. JESÚS MURILLO MARTÍNEZ

Catedrático de Universidad en la Universidad Pública de Navarra.

INFORMA:

que la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Regulación global mediada por los sistemas GacS/GacA y Rsm/Csr en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola y su impacto en el ciclo de vida de la bacteria” elaborada por **DIANA RAMÍREZ ZAPATA** ha sido realizada bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Pamplona a 21 de Julio del 2021.

Dr. Jesús Murillo Martínez

Agradecimientos

Ha sido un camino largo, y ahora que ha llegado a su final no se por donde empezar a agradecer. Tampoco se me da bien este tipo de cosas, soy una persona que prefiere demostrar lo que siente por acciones más que con palabras.

Debería empezar agradeciendo a mi director de Tesis, Jesús Murillo, ya que fue él el que me dió la oportunidad de embarcarme en esta aventura (¡y qué aventura!) y ha estado hasta el final, en lo malo y en lo bueno.

Agradecer a cada una de las que han sido o siguen siendo mis compañeras de laboratorio, porque han tenido que hacer la obra titánica de aguantarme. Primero a Miriam, siempre eficiente y resolutiva, no había duda que no pudiera solucionar; Leire, que se convirtió en una gran mentora y fue un pilar en el desarrollo de esta Tesis; a la que fue la novatilla del laboratorio, Miriam, que con su incansable energía y alegría, hacia los días menos grises; y por último pero no menos importante, a Maite, siempre escuchando y apoyando con su sola presencia.

No me puedo olvidar de agradecerle a Cayo Ramos el acogerme en su laboratorio durante mi estancia de tres meses, ni de todos los que entonces formaban parte de su laboratorio: Eloy, Marta, Adrian, Alba y Carla. Me hicieron sentir como en casa, y con ellos guardo momentos increíbles.

Finalmente doy gracias a la vida por la familia que me ha tocado, a mi padre Javier, mi madre Pilar y mi hermana Esther. Porque soy quien soy gracias a ellos, y nunca tendré palabras para expresar todo lo que los quiero, ni 100 vidas bastaran para devolverles todo lo que han hecho y hacen por mi.

Y gracias al que he elegido como familia, mi vida, mi amor Rafa. Sin tí no habría podido termina esta aventura, y ahora juntos cerramos una etapa, y abrimos una nueva.

Gracias a todos los que me han acompañado en esta aventura.

Indice

Resumen	12
1 Introducción	13
1.1 Complejo <i>Pseudomonas syringae</i>	14
1.2 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola	14
1.3 La grasa de la judía	15
1.3.1 Síntomas.....	15
1.3.2 Epidemiología	17
1.4 Ciclo bacteriano	18
1.4.1 Fase epifítica.....	18
1.4.2 Fase patogénica	20
1.4.3 Toxinas antimetabolito	28
1.5 Sistema regulador de dos componentes GacS/GacA.....	30
1.5.1 Mecanismo de acción	31
1.6 Proteínas Rsm	31
1.7 Biología de los plásmidos de <i>P. syringae</i>	34
1.7.1 Sistemas de mantenimiento	35
1.7.2 Genoma de <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 1448A	37
2 Objetivos	40
3 Capítulo I.....	42
3.1 Introducción	43
3.2 Material y Métodos.....	45
3.2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	45
3.2.2 Técnicas moleculares y bioinformática.....	45
3.2.3 Identificación e inactivación de sistemas TA	46
3.2.4 Manipulación del plásmido p1448A-A	47
3.2.5 Incompatibilidad de replicones	47
3.2.6 Curva de crecimiento en medio rico y mínimo.....	47
3.2.7 Expresión de los alelos <i>avrPphE</i> , <i>hopV1</i> y <i>hopAE1</i> de RW60 en Δ pA48	
3.2.8 Evaluación de la patogenicidad.....	48
3.3 Resultados	49
3.3.1 Se identificaron siete posibles sistemas TA en p1448A-A	49
3.3.2 p1448A-A es un plásmido PFP de alta estabilidad.....	51
3.3.3 La inactivación de sistemas TA junto con la incompatibilidad de replicones permite la curación de plásmidos altamente estables.	56

3.3.4	p1448A-A interviene en la virulencia de Pph 1448A pero no es esencial en la producción de la enfermedad.	56
3.3.5	Las cepas ΔpA y RW60 sólo se diferencian en la secuencia de aminoácidos de tres efectores cromosómicos.....	60
3.3.6	El alelo <i>AvrPphE</i> de la cepa RW60 reduce la virulencia de ΔpA	62
3.4	Discusión	63
3.5	Material Suplementario	68
4	Capitulo II.....	75
4.1	Introduction	76
4.2	Materials and Methods.....	79
4.2.1	Bacterial strains, plasmids, and growth conditions	79
4.2.2	Molecular procedures.....	79
4.2.3	Bioinformatics tools	81
4.2.4	Mutagenesis and cloning of <i>rsm</i> genes	81
4.2.5	Pathogenicity assays and autoagglutination.....	82
4.2.6	Assays of motility and biosynthesis of phaseolotoxin	83
4.2.7	Carbon source utilization.....	84
4.3	Results and Discussion.....	84
4.3.1	<i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>phaseolicola</i> contains seven <i>rsm</i> homologues	84
4.3.2	Construction of single and multiple <i>rsm</i> mutants	87
4.3.3	Expression levels of <i>rsm</i> genes.....	88
4.3.4	Genes <i>rsmA</i> and <i>rsmE</i> redundantly control virulence in bean and the expression of the <i>t3ss</i>	89
4.3.5	Genes <i>rsmA</i> and <i>rsmE</i> also redundantly control motility and carbon source utilization	93
4.3.6	<i>RsmA</i> and <i>RsmE</i> redundantly contribute to the activation of phaseolotoxin biosynthesis at 18 °C.....	95
4.4	Conclusions	98
4.5	Supplementary material	100
5	Capitulo III.....	110
5.1	Introducción	111
5.2	Material y métodos.....	112
5.2.1	Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	112
5.2.2	Técnicas moleculares y bioinformática.....	112
5.2.3	Extracción de ARN.....	113
5.2.4	ARNseq y análisis bioinformático	113
5.3	Resultados.....	114
5.3.1	Preparación y evaluación de las muestras.	114

5.3.2	Los genes termorregulados representan el 6 % del genoma de Pph 1448A	115
5.3.3	Genes inducidos a 18 °C.....	118
5.3.4	Genes inducidos a 28 °C.....	123
5.4	Genes termorregulados dependientes de GacA.....	127
5.4.1	GacA controla el 45 % de los genes termorregulados.....	128
5.5	El sistema GacS/GacA regula la expresión de un total de 891 genes.	129
5.5.1	El sistema GacS/GacA controla el patrón de expresión de 732 genes no termorregulados.....	130
5.6	Discusión	131
	Discusión General.....	136
	Conclusiones	142
	Bibliografía.....	146

Resumen

Diversas bacterias fitopatógenas muestran una expresión génica diferencial por temperatura, siendo igualmente este factor determinante en la progresión de enfermedades en planta. *P. syringae* pv. phaseolicola (Pph), agente causal de la grasa de la judía, sintetiza la fitotoxina faseolotoxina a 18 °C, pero no a 28 °C. La regulación de los genes implicados en la producción de esta toxina es compleja, y depende del sistema de reguladores globales GacS/GacA. Este sistema regula otros genes de virulencia en diversos patovares del complejo *P. syringae* mediante la inducción de pequeños ARNs (sARN), que se unen a las proteínas Rsm y modulan su función. Las proteínas Rsm son reguladores de la expresión génica a nivel postranscripcional y participan en la regulación de fenotipos muy diversos en muchas bacterias. Esto sugiere que, además de su posible papel en la regulación de otros fenotipos mediados por GacS/GacA en Pph, las proteínas Rsm estén implicadas en la regulación de la biosíntesis de faseolotoxina por temperatura. Para el desarrollo de esta Tesis, se planteó la obtención de diversos mutantes en los diferentes genes que codifican para proteínas Rsm. En concreto, Pph contiene siete genes *rsm*, tres de ellos localizados en el plásmido A (p1448A-A) de Pph 1448A, por lo que para la construcción de un mutante en estos genes, se abordó la obtención de un derivado curado de este plásmido, ΔpA , permitiendo marcar el primer objetivo de esta Tesis, (1) evaluar la contribución del p1448A-A al ciclo de vida de la bacteria y a la virulencia. p1448A-A contiene 11 genes de efectores del sistema de secreción de tipo III, algunos localizados en una isla de patogenicidad (PAI). La PAI determina el rango de huésped en la cepa Pph 1449B, ya que RW60, una cepa derivada de Pph 1449B curada del plásmido que contiene la PAI, produce una respuesta hipersensible (HR) en variedades de judía susceptibles a la cepa silvestre. Dada la alta estabilidad de p1448A-A, y a la obtención repetida de resultados negativos utilizando técnicas clásicas de curación, hemos aplicado una estrategia de curación que implica la inactivación funcional de posibles sistemas toxina-antitoxina junto con la incompatibilidad de replicones. La cepa ΔpA muestra un fenotipo en vida libre similar al de la cepa silvestre y presenta una virulencia reducida en inoculaciones en vainas de judía. El resto de objetivos que se propusieron en esta Tesis fueron 2) la influencia de las proteínas Rsm en la regulación de fenotipos mediados por GacA, y 3) la identificación del regulón de GacS/GacA a 18 y a 28 °C. Con la generación de mutantes en los diferentes genes *rsm* de Pph 1448A, se demostró que la mutación conjunta de *rsmA* y *rsmE*, pero no otras combinaciones, da lugar a deficiencias en el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, pérdida de virulencia en judía y pérdida de movilidad. Nuestros resultados también mostraron que ambas proteínas influyen en la biosíntesis de faseolotoxina a 18 °C, pero no son imprescindibles y que incluso una cepa mutada en todos los genes *rsm* aún mantiene un patrón termorregulado de biosíntesis de la toxina. Estos resultados sugieren que la regulación génica dependiente del sistema GacS/GacA puede implicar la unión de los sARN a otros reguladores y no es exclusiva de las proteínas Rsm. Por otro lado, mediante un análisis RNAseq de la cepa silvestre y una cepa derivada de Pph 1448A mutante en el gen *gacA*, se estimó que 356 genes de Pph 1448A son dependientes de temperatura, y el 45% de ellos son regulados mediante el sistema GacS/GacA, asociados a fenotipos como la movilidad, la producción de exopolisacaridos o la adquisición de hierro.

1 Introducción

1.1 Complejo *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae es una Gammaproteobacteria cuya denominación se corresponde con un complejo de diversas especies, la mayoría de las cuales producen enfermedades de plantas, y que en conjunto, se considera como el grupo de bacterias fitopatógenas de mayor relevancia científica y económica (Mansfield et al., 2012; Gomila et al., 2017; Dillon, Almeida, et al., 2019). Las especies que conforman el complejo *P. syringae*, además de producir infecciones en multitud de especies vegetales con importancia agronómica, han servido como modelo de estudio para el entendimiento de los procesos moleculares, que se producen durante la interacción planta-patógeno (Preston, 2000; Arnold et al., 2011; McCann et al., 2013; Caballo-Ponce et al., 2017; Xin et al., 2018).

P. syringae agrupa a pseudomonas fluorescentes que pueden ser identificadas con un conjunto simple de pruebas (pruebas LOPAT), pero que debido a presentar características bioquímicas similares no pueden ser separadas en especies con la base de su fenotipo (Young, 2010). Esto conlleva que su taxonomía sea compleja, y esté todavía en revisión. Actualmente, el grupo se compone de 15 especies y, basándose en sus características patogénicas y espectro de huésped, se divide en unos 60 patovares (Dillon, Thakur, et al., 2019). Sin embargo, mediante análisis genéticos (hibridación ADN-ADN o MLSA) y genómicos se ha demostrado la existencia de diferencias genéticas suficientes como para hacer una reclasificación de las bacterias del grupo. Así pues, dependiendo del autor pueden estar clasificadas en nueve genomoespecies (Gardan et al., 1999), 19 especies filogenéticas (Gomila et al., 2017), o 13 filogrupos (Berge et al., 2014; Dillon et al., 2019a; Sarkar & Guttman, 2004). A pesar de las evidencias genéticas, el complejo no se ha dividido formalmente en nuevas especies puesto que, como ya se ha mencionado, no se conocen pruebas fenotípicas que las diferencien. Independientemente de las discrepancias, se acepta que el grupo es un complejo de especies, cuya denominación formal es *P. syringae sensu lato*, aunque en muchos casos, se nombra en la literatura como complejo *P. syringae*.

1.2 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

P. syringae pv. *phaseolicola* (Pph) se sitúa en la genomoespecie 2, junto a las especies *P. savastanoi*, *P. ficuserectae*, *P. meliae*, *P. amygdali*, *P. tremae* y otros 15 patovares de *P. syringae* (Gomila et al., 2017). Este patovar puede encontrarse en la literatura nombrado también como *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, debido a que en 1992 fue clasificado en esta especie (Gardan et al., 1999). En esta tesis, se ha decidido utilizar el nombre *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pph), ya que se considera que el nombre de *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* puede inducir al error de pensar que este patovar está más relacionado filogenéticamente con pv. *savastanoi*, que con otros patovares

clasificados en la misma genomoespecie (Gardan et al., 1999; Gomila et al., 2017).

El espectro de huésped de Pph incluye diversas especies de leguminosas de 13 géneros diferentes, siendo *Phaseolus vulgaris* el huésped mayoritario y de mayor relevancia económica (Taylor et al., 1996; Allen et al., 1998). A su vez, Pph se divide en nueve razas teniendo en cuenta si produce o no síntomas en siete variedades diferenciales de *P. vulgaris* y una de *P. acutifolius* (Tabla 1) (Taylor et al., 1996).

A excepción de las razas 3, 4, 5 y 8, cuya distribución es limitada, el resto presenta una distribución mundial, siendo la más frecuente la raza 6 (Rivas et al., 2005; Bardaji et al., 2018). Esta raza es también la más agresiva, ya que presenta compatibilidad con todas las variedades comerciales analizadas.

Existe un pequeño porcentaje de cepas aisladas de campo que no pueden ser clasificadas en ninguna de las razas hasta ahora definidas. Sus patrones de interacción con las diferentes variedades, sugieren que Pph podría dividirse en al menos 16 razas (Taylor et al., 1996; Marques et al., 2000; Lamppa et al., 2002; Arantza Rico et al., 2003; López, 2004).

1.3 La grasa de la judía

La grasa de la judía está causada por Pph y es una de las enfermedades de mayor relevancia en cultivos de judía común (*P. vulgaris*) (Smith et al., 1992; Allen et al., 1998; Singh & Schwartz, 2010). Presenta una distribución mundial, siendo más agresiva en regiones templadas (18-22 °C), y puede ocasionar grandes pérdidas económicas, llegando a sobrepasar más del 60 % en Europa (Smith et al., 1992). En condiciones experimentales, se han estimado pérdidas de rendimiento de un 43 %, fundamentalmente debido a una reducción en la calidad de las semillas y vainas, la inhibición de la nodulación por rizobios y, en casos de infecciones graves, la muerte de la planta (Smith et al., 1992; Murillo et al., 2010).

1.3.1 Síntomas

El nombre de la enfermedad deriva de los síntomas típicos producidos en hojas y vainas: lesiones hidrópicas de aspecto aceitoso, angulares y húmedas, y frecuentemente rodeadas de un halo ancho de color verde claro o amarillento (Murillo et al., 2010). Este característico halo le otorga su nombre anglosajón “halo blight” (Burkholder, 1926), y se debe a la acción de la faseolotoxina; esta toxina es producida por el patógeno a temperaturas bajas (16-22 °C), pero su síntesis se inhibe a temperaturas superiores, hasta casi desaparecer a 28 °C (Nüske & Fritsche, 1989; Aguilera et al., 2007). Las manchas de grasa suelen derivar en áreas de tejido muerto, que pueden terminar con la caída de la hoja (Figura 1).

Tabla 1. Clasificación de *P. syringae* pv. phaseolicola en razas, según las interacciones observadas en variedades de judía

		Razas / genes <i>avr</i> ^a								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		<i>avrPphF</i>	·	·	·	<i>avrPphF</i>	·	<i>avrPphF</i>	·	<i>avrPphF</i>
		·	<i>avrPphE</i>	·	<i>avrPphE</i>	<i>avrPphE</i>	·	<i>avrPphE</i>	·	·
		·	·	<i>avrPphB</i>	<i>avrPphB</i>	·	·	·	·	·
		·	·	·	·	4	·	·	·	·
		·	5	·	·	·	·	·	5	5
Variedades	Genes de resistencia	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Canadian Wonder	·	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A52 (ZAA54)	·	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Tendergreen	·	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Red Mexican UI3	<i>Pse-1</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-
1072	·	+	-	+	-	-	+	-	+	+
A53 (ZAA55)	·	+	+	-	-	-	+	+	+	+
A43 (ZAA12)	·	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Guatemala 196-B	<i>Pse-1</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	-

^a (+), respuesta susceptible; (-), respuesta de resistencia; (·), gen ausente; aunque *avrPphE* presenta genes homólogos en las 9 razas (Stevens et al., 1998) solo es funcional como gen de avirulencia en las razas señaladas. Genes emparejados avirulencia/resistencia: *avrPphF/Pse-1*; *avrPphE/Pse-2*; *avrPphB/Pse-3* (Tabla adaptada de (Taylor et al., 1996).

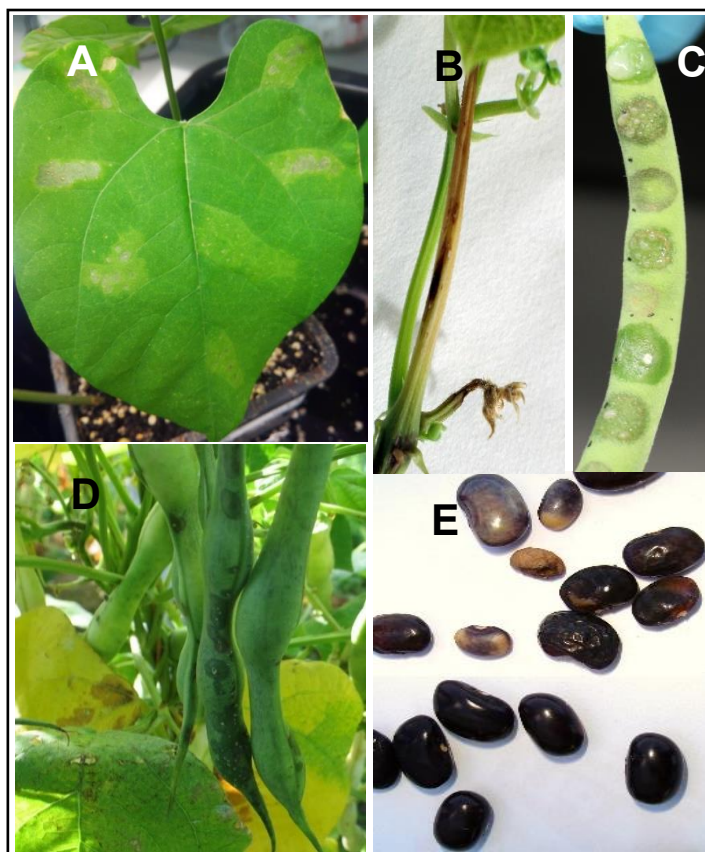


FIGURA 1. Síntomas de la grasa de la judía en diferentes zonas de la planta y semillas. **A)** Síntomas con diferentes grados de necrosis en hoja, por inoculación artificial. **B)** Tallo con necrosis longitudinal. **C) y D)** Síntomas en vaina con producción de exudado, por inoculaciones artificiales o naturales en campo, . **E)** Alteración de tamaño y color en semillas infectadas (arriba) en comparación con las sanas (abajo). Imagen adaptada de Bardaji, L, AJ González y J Murillo. En López et al. (eds.) 2018. Enfermedades de plantas causadas por bacterias. SEF-Bubok, España Copyright ©2018 Sociedad Española de Fitopatología. <http://doi.org/10.5281/zenodo.2798314>

1.3.2 Epidemiología

El inóculo primario procede principalmente de semillas ya infectadas (Taylor et al., 1979; Webster et al., 1983; Allen et al., 1998). Con menor frecuencia, puede derivar de otras fuentes como malas hierbas, ya que Pph puede vivir de forma epifítica. En presencia de agua, la bacteria penetra en la planta por aberturas naturales, como estomas o hidátodos, o por heridas. Es a través de un contacto directo con heridas en vainas, cuando se produce la contaminación de las semillas. Debido a la no existencia de evidencias de que el patógeno se transmita sistémicamente, se asume que las vainas sin lesiones producirán semillas sanas (Taylor, Dudley, et al., 1979; Murillo et al., 2010).

Las salpicaduras de agua, por lluvia o riego, así como el contacto entre plantas húmedas, permiten la dispersión del patógeno que, además, puede verse facilitada por el viento o la actividad humana (Webster et al., 1983). Las lesiones en tallo y peciolas a veces producen una secreción de exudados, cremosos y blanquecinos, que contribuye de forma significativa a la dispersión del patógeno.

Estos exudados se componen de una matriz de polisacáridos bacterianos con un gran número de células embebidas (Murillo et al., 2010).

El control de la enfermedad en campo es difícil debido a que esta puede producirse con bajos niveles de inóculo y a que su velocidad de progresión y diseminación es alta (Allen et al., 1998; Taylor et al., 1979b; Webster et al., 1983). Las estrategias de manejo de la enfermedad se basan generalmente en la utilización de semillas sanas, ya que se ha estimado que con cinco semillas infectadas en un lote de 1.000, se producen epidemias graves en campo, y cuando son cinco entre 10.000 o una en 16.000 se pueden producir importantes pérdidas (Trigalet & Bidaud, 1978). La certificación de semillas suele hacerse por PCR, preferentemente en tiempo real, ya que es el método más sensible (Cho et al., 2010; Palacio-Bielsa et al., 2009; Rico et al., 2006). Otra opción de control es la utilización de variedades resistentes de judía, pero está limitada por la diversidad de razas existentes del patógeno.

1.4 Ciclo bacteriano

1.4.1 Fase epifítica

Como otras especies del complejo *P. syringae*, el ciclo de Pph puede dividirse en dos grandes fases, una epifítica y otra patogénica. Durante la primera fase, la bacteria está expuesta a diferentes factores externos como pueden ser la desecación, la radiación ultravioleta o cambios bruscos de temperatura. El patógeno debe adaptarse y sobrevivir en la superficie de la planta, además de aumentar su densidad poblacional, que suele variar entre 10^6 - 10^7 ufc/cm², hasta que se dan las condiciones idóneas para iniciar el proceso infectivo (Pfeilmeier et al., 2016). Durante esta primera fase, la producción de exopolisacáridos (EPS), sideróforos y la migración del patógeno por la superficie vegetal tienen un papel importante.

1.4.1.1 Expolisacáridos

La producción de expolisacáridos (EPS) contribuye tanto a la adherencia a la superficie foliar como a su colonización; además, los EPS confieren resistencia frente a la desecación y una mayor tolerancia al estrés osmótico, permitiendo mantener la suficiente carga bacteriana para una posterior infección. Pph produce dos tipos de EPS, alginato y levano (Gross & Rudolph, 1987a, 1987b; Hettwer et al., 1995), y se ha identificado en su genoma (Joardar et al., 2005) el operón para la biosíntesis de un tercero, Psl, pero se desconoce si el patógeno lo sintetiza.

El alginato es un polímero acetilado de alto peso molecular, formado por monómeros de L-ácido gulurónico y D-ácido manurónico unidos por enlaces β -1,4 (Evans & Linker, 1973). El operón para su biosíntesis y regulación está

altamente conservado dentro del género *Pseudomonas* (Mann & Wozniak, 2012).

Los levanos forman una cápsula de polisacáridos compuesta por polifruktanos con uniones β -2,6 y con una gran cantidad de ramificaciones β -2,1 y su producción se da exclusivamente en presencia de sacarosa. La formación de este polisacárido se produce cuando una enzima extracelular, denominada levansacarasa, cataliza la hidrólisis de este azúcar. Las cepas productoras de levano dan lugar a colonias con un aspecto mucoso característico, de un color brillante nacarado (Figura 2). La función de los levanos parece estar enfocada más como almacén de nutrientes (Laue et al., 2006; Mann & Wozniak, 2012) que como protección frente a condiciones externas adversas.

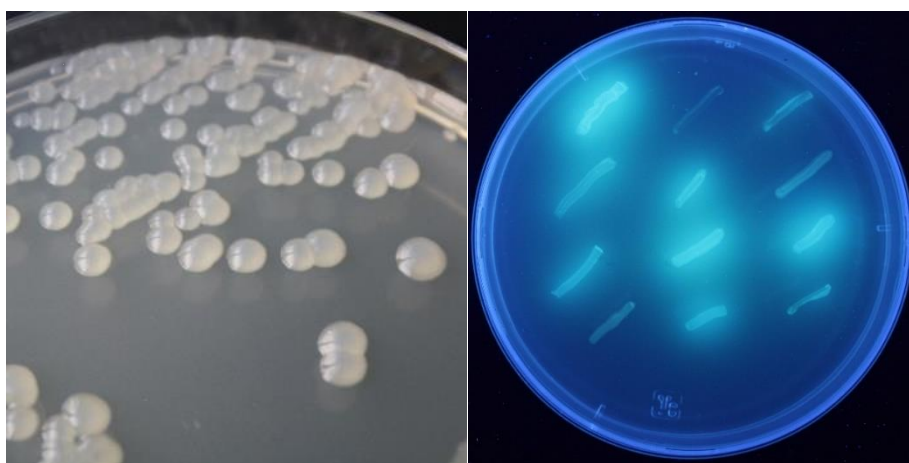


FIGURA 2. Fenotipos característicos de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. **A)** Producción de levanos en un medio con sacarosa. **B)** Visualización de síntesis de sideróforos bajo luz ultravioleta. (Fotos: J. Murillo, UPNA).

1.4.1.2 Síntesis de sideróforos

La adquisición de hierro es esencial para el crecimiento de la población bacteriana, pero este, a pH neutros, se encuentra en forma no soluble, por lo que generalmente su disponibilidad en el medio ambiente es muy baja. Por ello, las bacterias sintetizan moléculas quelantes con alta afinidad por hierro denominadas sideróforos. Estos sideróforos son secretados al medio externo, donde se unen a moléculas de hierro, el cual es transportado al interior de la célula mediante receptores específicos (Braun & Hantke, 2011). La gran mayoría de las especies de *Pseudomonas* presentan una pigmentación amarillenta y fluorescente bajo luz ultravioleta, debido a la producción de un tipo de sideróforo denominado pioverdina. Así mismo, generalmente sintetizan más de un tipo de sideróforo, como en el caso de Pph, la cual sintetiza dos tipos de sideróforos, pioverdinas y acromobactinas (Owen & Ackerley, 2011). Aunque las pioverdinas muestran una mayor eficiencia en la unión de moléculas de hierro que las acromobactinas, ambos tipos contribuyen a la supervivencia epifítica de la

bacteria; sin embargo, y a diferencia de otras *Pseudomonas* (Meyer et al., 1996; Visca et al., 2007), estos sideróforos no parecen participar en el proceso infectivo de Pph en la planta huésped (Owen & Ackerley, 2011).

1.4.1.3 Movilidad

La colonización de la superficie vegetal además de estar mediada por la síntesis de EPS, también lo está por la capacidad de migración del patógeno; sin embargo, este atributo es imprescindible para que el patógeno encuentre posibles aberturas al interior de la planta.

El movimiento bacteriano es un proceso complejo, que implica diversos factores y estructuras. Este es dependiente de la expresión de todos los elementos que componen la estructura del flagelo, el cual, coordinado con señales de quimiotaxis y producción de surfactantes, permiten un movimiento de tipo swarming (Pfeilmeier et al., 2016). El movimiento swarming puede definirse como un movimiento rápido, multicelular, a través de una superficie por rotación del flagelo (Kearns, 2010). Se ha descrito que mutantes de Pph afectados en genes del operón de biosíntesis del flagelo o genes asociados con la quimiotaxis, ven reducida su capacidad de crecimiento en planta (Manoharan et al., 2015).

A su vez, en el momento de la infección, es igual de importante la represión de la síntesis del flagelo para evitar su reconocimiento por los receptores de las células vegetales, y que se produzcan respuestas de defensa por parte de la planta (Kearns, 2010).

1.4.2 Fase patogénica

Una vez que el patógeno accede al interior de la planta, debe bloquear los mecanismos de defensa de esta y obtener nutrientes (Pfeilmeier et al., 2016). Para ello, las bacterias fitopatógenas han desarrollado diversos mecanismos de patogenicidad y virulencia a lo largo de la evolución. La mayoría posee un sistema de secreción de tipo III (T3SS) esencial para la patogénesis y que permite inyectar proteínas, denominadas efectores (T3Es) (Hotinger et al., 2021), al apoplasto o al citoplasma de la célula vegetal (Schreiber et al., 2021). Adicionalmente, numerosas bacterias fitopatógenas producen toxinas o fitohormonas, que generalmente incrementan la virulencia de la bacteria (Arrebola et al., 2011).

El T3SS y los T3Es han sido ampliamente estudiados en Pph y tienen una gran importancia en la patogénesis del microorganismo (Arnold et al., 2011). Además, esta bacteria sintetiza la toxina faseolotoxina solo a temperaturas bajas (18-22 °C), lo que convierte a esta toxina en un excelente modelo de estudio de mecanismos moleculares regulados por temperatura.

1.4.2.1 Sistema de Secreción Tipo 3 (T3SS)

Como ya se ha mencionado, el T3SS es un sistema de secreción de gran importancia en la patogénesis de muchas bacterias Gramnegativas. Mutaciones en genes asociados a este sistema impiden a los patógenos llegar a causar la enfermedad en huéspedes susceptibles (Tang et al., 2006; Hotinger et al., 2021).

Este sistema forma una estructura en forma de jeringuilla (Figura 3), compuesta por dos anillos embebidos en las membranas del patógeno, y un filamento largo extracelular llamado *hrp* pilus, a través del cual el patógeno introduce efectores en la célula huésped (Q. Jin & He, 2001; C. M. Li et al., 2002; Hotinger et al., 2021).

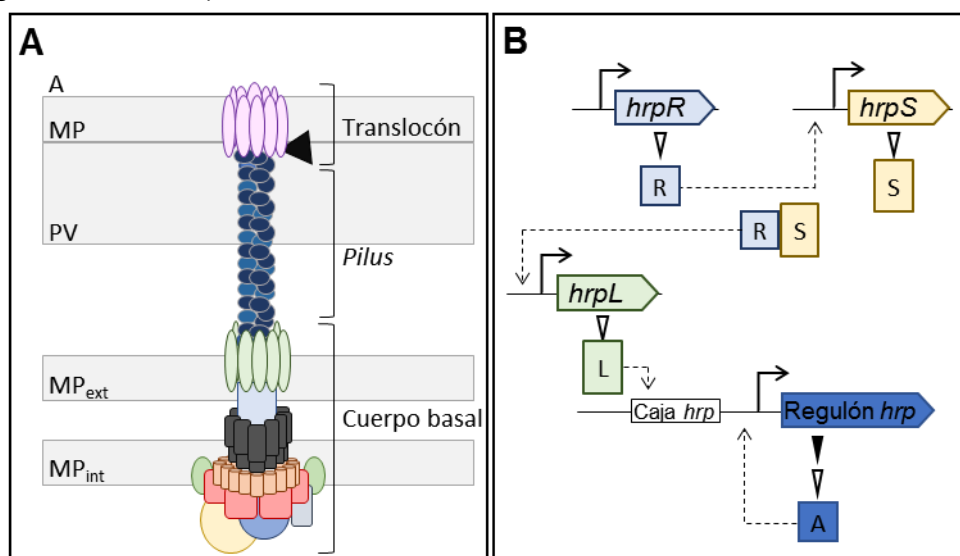


FIGURA 3. Estructura del T3SS y su regulación en *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

A) Esquema de los elementos que componen el T3SS. A, apoplasto; MP, membrana plasmática; PV, pared vegetal; ext, externa; int, interna. **B)** Esquema de la expresión génica de los principales genes reguladores positivos del T3SS. Línea discontinua, inducción de la expresión genética.

Los genes que codifican para el T3SS en *P. syringae* se organizan en diferentes operones, dentro de un gran grupo denominado *cluster hrp* (hypersensitive response and pathogenesis). Se dividen en tres grandes clases, la primera incluye los genes denominados *hrc* (hypersensitive response conserved) que codifican para la base cilíndrica del sistema, y que están muy conservados entre patógenos de animales y de plantas. La segunda clase incluye los genes responsables de la regulación del resto de genes *hrp* (genes *hrpL* y *hrpR/S*), mientras que la tercera clase incluye los genes asociados a la formación del pilus (*hrpA*) (Roine et al., 1997), el ensamblaje de toda la estructura, y la traslocación de proteínas (Tampakaki et al., 2010).

La regulación del T3SS en Pph no difiere mucho de la de otros patovares de *P. syringae*. Los genes *hrpR/S*, *hrpL* y *hrpA* son los principales reguladores

positivos del sistema, siendo *hrpL* el más relevante, ya que es esencial para la expresión del resto de genes *hrp*, a excepción de sí mismo y de los genes *hrpR/S* (Ortiz-Martín et al., 2010; Ferreiro et al., 2018). Así mismo, la expresión de *hrpL* está bajo el control de *hrpR/S*. En Pph, *hrpS* y *hrpR* se encuentran en operones separados, y *hrpR* participa en la activación de la expresión de *hrpS* (Grimm et al., 1995; M. Schuster & Grimm, 2000; Ortiz-Martín et al., 2010) (Figura 3). Por último, *hrpA*, aparte de su función en la formación del pilus, es necesario para la expresión de otros genes *hrp* (Ortiz-Martín et al., 2010).

1.4.2.1.1 Efectores del T3SS

El papel principal de los efectores (T3E) traslocados por el T3SS es suprimir las respuestas defensivas de la planta (PTI y ETI) que se producen durante la infección (Tang et al., 2006) (Figura 4). La PTI (PAMP-Triggered Immunity) se considera la primera línea de defensa de la planta, inducida por PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), estructuras moleculares comunes entre patógenos, las cuales son reconocidas por receptores (PRRs) de la superficie celular del huésped, y desencadena diversos procesos como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En cambio, la ETI (Effector-Triggered Immunity) se corresponde a una segunda línea de defensa inducida a causa del reconocimiento de un efector determinado (Avr) del patógeno, por una proteína específica (R) del huésped (Flor, 1955) (Figura 5). La proteína R lleva a cabo su función bien por unión directa al efector Avr o por detección del efecto final que produce cuando el efector actúa en la célula huésped.

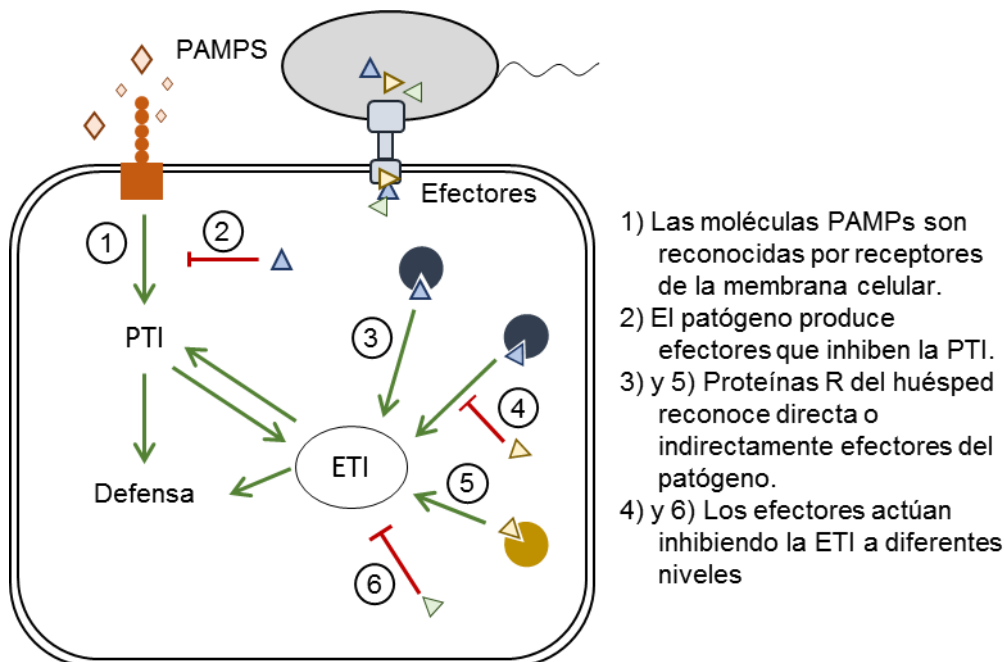


FIGURA 4. Mecanismos de inducción e inhibición de las defensas de la planta. Flechas verdes, se induce la defensa del huésped. Flechas rojas, se inhibe la defensa del huésped. PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns; PTI, PAMP-Triggered Immunity; ETI, Effector-Triggered Immunity

Si bien ambas líneas de defensa son inducidas por elementos diferentes, estas no son independientes la una de la otra y presentan mecanismos de señalización interconectadas, contribuyendo en conjunto en la inmunidad de la planta (Nguyen et al., 2021; Yuan et al., 2021). Así, por ejemplo, mutaciones en determinados PRR comprometen la correcta señalización de la ETI; mientras que la señalización de la ETI conlleva la inducción de componentes clave de la PTI. La señalización de la ETI finaliza con la inducción de una respuesta hipersensible (HR), la cual se caracteriza por la muerte celular programada de la célula infectada y de las que la rodean, restringiendo la dispersión del patógeno por la planta (Arnold et al., 2007) (Figura 4 y 5).

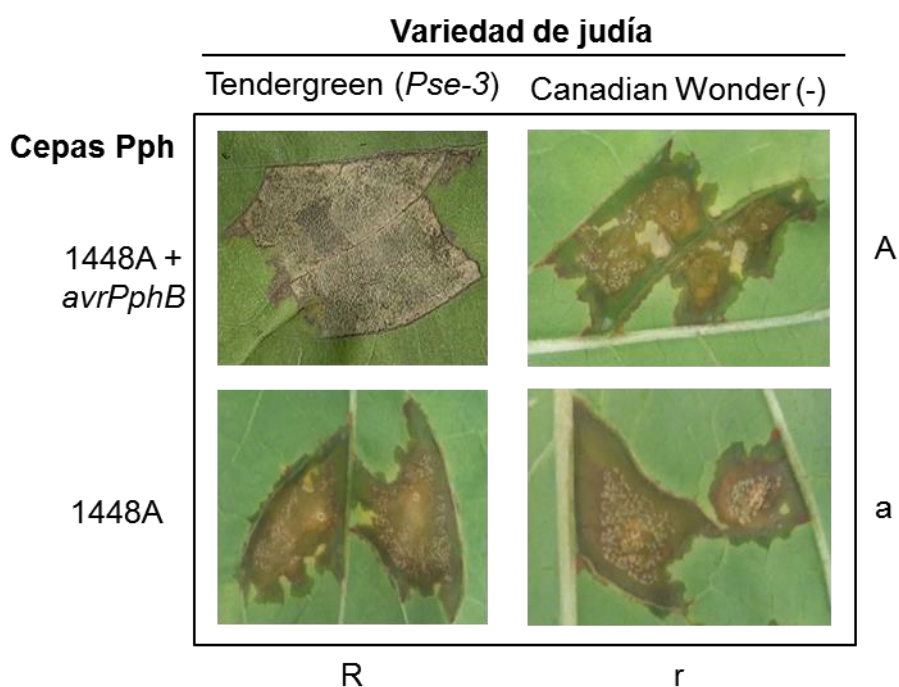


FIGURA 5. Teoría gen a gen. Se produce un efecto de incompatibilidad cuando están presentes a la vez el gen de avirulencia, A, del patógeno y el gen de resistencia, R, del huésped. (A) presencia o (a) ausencia de un gen de avirulencia; (R) presencia o (r) ausencia de un gen de resistencia. (Fotos: J.Murillo y D.Ramirez , UPNA).

Los T3Es puede seguir dos mecanismos de acción: uno directo, al inhibir las proteínas encargadas del reconocimiento de PAMPs y de otros efectores; y otro indirecto, al enmascarar este reconocimiento (Figura 4). Para ello, los T3E pueden actuar inhibiendo proteínas MAPK, que intervienen en la cascada de señalización de la HR; suprimiendo la remodelación de las paredes celulares vegetales, o interfiriendo en la circulación de las vesículas de la célula huésped (Tampakaki et al., 2010). Los T3Es también pueden actuar en procesos que no están directamente conectados con la inmunidad de la planta, e influir en la distribución de nutrientes, el metabolismo y en el desarrollo celular (Macho, 2016). Los efectores están agrupados en numerosas familias de proteínas diferentes. En general, su estructura se divide en un dominio N-terminal encargado de la secreción y translocación del efector y, en su extremo C-

terminal, uno o más dominios que determinan la función del efector en la célula huésped (McCann & Guttman, 2008). Por último, su síntesis está bajo la regulación de HrpL debido a la presencia de un motivo *hrp* en la zona promotora del gen efector. Su denominación formal es Hop (*hrp* outer proteins) (Alfano & Collmer, 1997; Lindeberg et al., 2005), pero también pueden nombrarse Vir (virulencia), o Avr (avirulencia) si hay evidencias científicas de que inducen la HR.

A día de hoy se conocen unas 66 familias de T3Es y unos 764 alelos diferentes en los genomas del complejo *P. syringae*. Estas familias se distribuyen de forma irregular entre las especies del grupo y algunas de ellas están asociadas a elementos genéticos móviles, por lo que la herencia horizontal tiene un papel importante en la adquisición de T3Es (Dillon et al., 2019b; Godfrey et al., 2011; Neale et al., 2016). Aun así, la mayoría son familias ancestrales y proceden de una herencia vertical, lo que sugiere que la variabilidad en el repertorio de T3Es entre las especies del complejo proviene de un proceso de adaptación del patógeno al huésped (Rohmer et al., 2004; Stavrinides et al., 2006; O'Brien et al., 2011). Esta variabilidad se basa en un modelo de coevolución de dos fases (Lindeberg et al., 2012). En este modelo, hay un pequeño número de T3Es (core T3Es) que son indispensables para la virulencia base del patógeno y que, además, suelen estar bien conservados, incluso entre especies filogenéticamente separadas del grupo. El resto de T3Es del conjunto representa la parte variable entre especies y patovares, y estos suelen tener funciones redundantes, por lo que la pérdida de uno de ellos no suele suponer una disminución en la virulencia. Esto permite al patógeno tener una mejor respuesta de adaptación frente a la aparición de nuevos huéspedes resistentes, o una mayor especialización frente a un huésped determinado (Win et al., 2012; Lindeberg et al., 2012). Hay diversos ejemplos de bacterias patógenas que han modificado la expresión, la actividad proteica o la diana específica de sus T3Es, para no ser reconocidos por las proteínas R del huésped (Ma & Guttman, 2008). Con todo, no existe un patrón claro que relacione el conjunto de efectores con la especificidad de los patovares del complejo *P. syringae* (Lindeberg et al., 2012).

1.4.2.1.2 Efectores de Pph

La secuenciación del genoma de la cepa Pph 1448A ha permitido identificar y caracterizar 33 efectores diferentes (Tabla 2) (Chang et al., 2005; Vencato et al., 2006; Macho et al., 2009, 2012; Zumaquero et al., 2010). Macho et al. (2012) hacen una clasificación de 15 efectores según su contribución a la virulencia del patógeno. El grupo I sería el más importante, ya que la mutación individual de cualquiera de estos genes de virulencia conlleva una reducción en la población bacteriana y, en el caso de *hopR1*, una reducción de los síntomas. En este grupo de efectores se encuentran *avrPphC* (*avrB2*) y *virPphA*, los cuales se describieron por primera vez, junto a *avrPphF*, en la isla de patogenicidad (PAI) del plásmido mayor (pAV511) de Pph 1449B (Jackson et al., 1999). Esta misma

PAI está presente también en la cepa Pph 1448A, pero *avrPphF* se ha perdido por el movimiento de un transposón (Figura 6) (Rivas et al., 2005). La función de *avrPphF*, *avrPphC* y *virPphA* se demostró en la cepa RW60, una cepa derivada de Pph 1449B curada de pAV511. En Pph, estos tres efectores tienen como función suprimir la inducción de la HR dependiendo del tipo de variedad de judía (Jackson et al., 1999; Tsiamis et al., 2000).

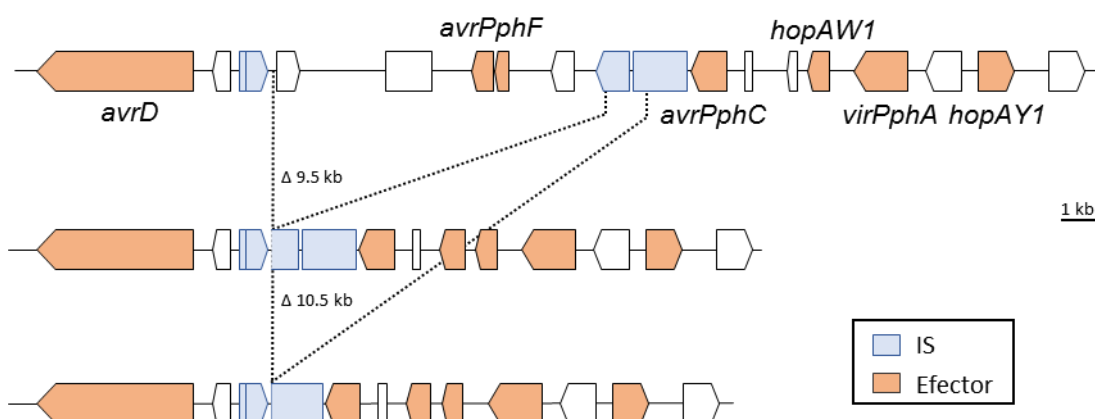


FIGURA 6. Isla de patogenicidad de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Representación de la isla de patogenicidad (PAI) caracterizada en la cepa *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B y las diversas formas delecionadas presentes en otras cepas de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Las deleciones de la isla de patogenicidad se representan con líneas punteadas. Los elementos móviles relevantes en la deleción de la isla se representan con cajas de azul claro y las cajas naranjas representan los genes que codifican para efectores. IS, secuencia de inserción. Figura adaptada de Rivas et al. (2005). Copyright © 2005, American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3778-3785.2005>.

avrPphF (*hopF1*) es uno de los cinco genes de avirulencia que determinan la actual clasificación de Pph en nueve razas. Está presente en las razas 1, 5, 7 y 9, y otorga avirulencia frente al cultivar Red Mexican debido a la presencia del gen de resistencia *R1*. A su vez, en la raza 7, confiere virulencia en la variedad Tendergreen y, cuando no están presentes ni *avrPphC* ni *virPphA*, también en plantas de soja (Tsiamis et al., 2000).

avrPphC (*avrB2*) es un gen homólogo de *avrC* de *P. syringae* pv. *glycinea*, el cual está descrito como un gen de avirulencia en plantas de soja. En Pph 1449B, su presencia es necesaria para suprimir la HR inducida por *avrPphF* en la variedad Canadian Wonder (Tsiamis et al., 2000).

virPphA (*hopAB1*) suprime la HR inducida en las variedades Tendergreen, Canadian Wonder y, si no está presente *avrPphF*, en Red Mexican. Al igual que *avrPphC*, también actúa como un gen de avirulencia en plantas de soja (Jackson et al., 1999). Se han caracterizado genes homólogos de *virPphA* en *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* y *P. syringae* pv. *tomato* (*AvrPtoB*), aunque en este último la similitud en las secuencias de aminoácidos es solo de

un 51%. Cada uno de estos alelos tienen la misma función que el alelo de Pph (Jackson et al., 2002).

Aparte de *avrPphF*, se ha clonado y demostrado la acción de otros dos genes de avirulencia que determinan las razas de Pph. Estos son *avrPphB* (*hopAR1*) y *avrPphE* (*hopX1*) (Jenner et al., 1991; Mansfield et al., 1994). Aún se desconoce cuáles son los efectores que codifican los genes putativos *avr4* y *avr5*, y que definen a las razas 5 (*avr4*), 3, 8, y 9 (*avr5*).

El gen *avrPphB* (*hopAR1*) tiene una distribución limitada entre los patovares de *P. syringae*. En Pph se localiza únicamente en el cromosoma de las razas 3 y 4. Induce HR en plantas no huésped de guisante, soja y *Arabidopsis* (Fillingham et al., 1992; Simonich & Innes, 1995; Pirhonen et al., 1996), y en *P. vulgaris*, en aquellos cultivares que contienen el gen de resistencia definido como *R3*. Este efector pertenece a un grupo de proteasas presente también en patógenos de animales (Shao et al., 2002).

AvrPphE (*HopX*) se describió por primera vez en la raza 4 (Mansfield et al., 1994). En el genoma se localiza junto a *hrpY* formando un mismo operón y adyacente al cluster *hrp*. Todas las razas de Pph presentan un gen homólogo de *avrPphE*, pero solo en las razas 2, 4, 5 y 7 muestran un fenotipo de avirulencia frente a variedades de judía con el alelo de resistencia *R2* (Mansfield et al., 1994). Esto se debe a que en las razas 1, 3, 6, 8 y 9, este efector presenta cambios en su secuencia de aminoácidos que conllevan la pérdida de la capacidad de la inducción de la HR (Stevens et al., 1998; Nimchuk et al., 2007). En cepas de la raza 1, este gen presenta un cambio de aminoácido de carga neutra a uno con carga positiva, en una región presumiblemente hidrofóbica y posiblemente situada en la zona interna de la estructura tridimensional de la proteína, por lo que este cambio puede estar ocasionando una disrupción de la estructura tridimensional de la proteína (Stevens et al., 1998). Además, este cambio se produce entre dos residuos catalíticos de cisteína e histidina, lo que también puede estar provocando una alteración en la función catalítica del efector. Estos dos residuos junto a un tercero, un ácido aspártico, son causantes de inducir la HR en la raza 4 (Nimchuk et al., 2007). En las razas 3 y 6, el cambio de aminoácido se produce en una región hidrofílica, posiblemente situada en la superficie de la proteína y responsable de la interacción con el receptor de la planta (Stevens et al., 1998). En la raza 9, el cambio de aminoácido se sitúa en el extremo C-terminal del tercer residuo catalítico, por lo que puede estar contribuyendo a que no se produzca la inducción de la HR (Stevens et al., 1998; Nimchuk et al., 2007). En la raza 8, debido a la inserción del elemento transponible *MITEPsy1* (Bardaji, Añorga, et al., 2011), el efector es 60 aminoácidos más largo que el resto de sus homólogos en las otras razas, por lo que puede que no se esté translocando a la planta huésped (Stevens et al., 1998). La presencia de diferentes alelos de este efector en diferentes razas de Pph, sugiere que puede no tener un papel principal en la patogénesis, pero sí en

la supervivencia en campo del patógeno. También, la presencia de funciones redundantes entre efectores puede estar enmascarando la importancia real de este efector en virulencia.

Tabla 2. Efectores presentes en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A

Nombre		Tamaño (aa)	Translocación	Virulencia	Avirulencia	Referencias
Oficial	Sinónimo					
Cromosoma						
	<i>avrB4-1</i>	323	+	III		d, g, h
	<i>avrB4-2</i>	323	+	III		g, h
	<i>avrE1</i>	1714	+	ND		d
	<i>hopAA1'</i>	477	-	ND		d
	<i>hopAB2</i>	<i>avrPtoB</i>		ND		
	<i>hopAB3'</i>	396	-	ND		d
	<i>hopAE1</i>	902	+	III		e, h
	<i>hopAF1</i>	284	+	ND		d
	<i>hopAH2</i>	416	+	ND		f
	<i>hopAJ1</i>	413	+	III		f,h
	<i>hopAJ2</i>	445	-	ND		f
	<i>hopAK1</i>	524	+	III		f,h
	<i>hopAN1</i>	429	ND	ND		
	<i>hopAS1</i>	1361	+	II		e, h
	<i>hopAT1</i>	87	+	ND		e
	<i>hopF3</i>	<i>hopF2</i>	198	-	ND	k
	<i>hopG1</i>	515	+	III		h
	<i>hopI1</i>	336	+	I		h
	<i>hopJ1</i>	113	-	ND		f
	<i>hopM1'</i>	745	-	ND		d
	<i>hopR1</i>	1959	+	I		d, h
	<i>hopV1</i>	595	-	ND		d
	<i>hopX1</i>	<i>avrPphE</i>	380	+	ND	Judía j, d

Plásmido p1448A-A						
<i>avrPphC</i>	<i>avrB2-3</i> <i>avrB2</i> <i>avrC</i>	352	+	I	Soja	a,b,c,e,h
<i>avrD</i>	<i>avrDp2</i>	311	+	III		h
<i>avrRps4</i>	<i>hopK</i>	221	+	ND		d
<i>hopAB1</i>	<i>virPphA</i>	539	+	I	Soja	b,d,h
<i>hopAU1</i>		731	+	II		e, h
<i>hopAV1</i>		806	+	ND		d
<i>hopAW1</i>		220	+	III		h
<i>hopAY1</i>	<i>hopPsyL</i> <i>hopL</i>		+	III		f, h
<i>hopD1</i>	<i>avrPphD</i>		+	III	Guisante	i, h
<i>hopQ1</i>		447	+	III		h
<i>hopW1-1</i>		94	+	III		g h
<i>hopW1-2</i>		94	+	III		g, h

(+), translocación o (-), no translocación del efector. **I**, el efector influye en el crecimiento del patógeno durante el proceso de infección; **II**, el efector influye en el crecimiento del patógeno en las fases tardías de la infección; **III**, el efector no influye en el crecimiento del patógeno durante la infección. **ND**, no determinado. **a**, (Yucel et al., 1994); **b**, (Jackson et al., 1999); **c**, (Tsiamis et al., 2000); **d**, (Chang et al., 2005); **e**, (Vencato et al., 2006); **f**, (Macho et al., 2009); **g**, (Zumaquero et al., 2010); **h**, (Macho et al., 2012); **i**, (Arnold et al., 2001); **j**, (Mansfield et al., 1994); **k**, (Lindeberg et al., 2005).

1.4.3 Toxinas antimetabolito

Tradicionalmente, se ha asumido que la secreción de toxinas contribuye a la virulencia de las bacterias mediante la inducción de clorosis y necrosis en la planta. Entre los diferentes tipos de toxina que sintetizan los patovares del complejo *P. syringae* se encuentran las toxinas antimetabolito (Bender et al., 1999; Arrebola et al., 2011), denominadas así porque actúan inhibiendo enzimas que intervienen en diferentes rutas metabólicas. Las más estudiadas son la tabtoxina, la mangotoxina y la faseolotoxina, que inhiben la biosíntesis de diferentes aminoácidos, produciendo una deficiencia de estos y alterando la forma de obtención de nitrógeno por parte del huésped (Figura 7).

Además, la faseolotoxina también inhibe la síntesis de poliaminas (Bachmann et al., 1998). Esta toxina no específica de huésped es sintetizada por los patovares *phaseolicola* (Mitchell, 1976), *actinidae* (Tamura et al., 2002), y *syringae* (Tourte & Manceau, 1995).

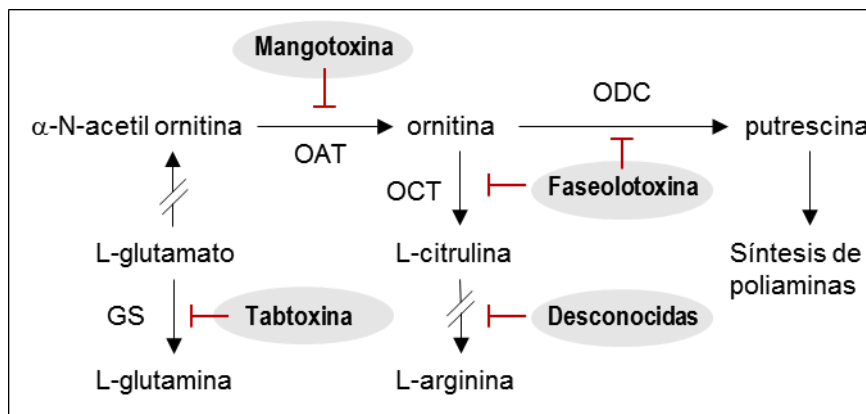


FIGURA 7. Enzimas inhibidas y rutas afectadas por las toxinas antimetabolito de la especie *P. syringae*. GS, glutamina sintetasa; OAT, ornitina N-acetiltransferasa; OCT, ornitina carbamoiltransferasa; ODC, ornitina descarboxilasa.

1.4.3.1 Faseolotoxina

La faseolotoxina se compone de un tripéptido (ornitina, alanina y homoarginina) unido a una parte inorgánica, Nδ-N'-sulfodiaminofosfinilo (Figura 8). La toxina es escindida por peptidasas del huésped generando un compuesto denominado octicina o PSorn, cuya estructura química es análoga a la de un intermediario de reacción formado por carbamoilfosfato unido a ornitina (Figura 8) (Templeton et al., 1984). Este intermediario de reacción es un producto transitorio en la biosíntesis de la arginina y es utilizado por la enzima ornitina carbamoil transferasa (OCTasa) para convertir ornitina en citrulina (Figura 7).

La octicina compite por el sitio de unión del carbamoilfosfato a la OCTasa (Bachmann et al., 1998), de tal forma que la ruta de biosíntesis de la arginina queda bloqueada. Esto conlleva a una acumulación de ornitina y una deficiencia de arginina en la célula huésped. Dentro de la agrupación (*cluster*) de genes de biosíntesis de faseolotoxina, se encuentra un gen que codifica para una ornitina carbamoiltransferasa (ROCT; phaseolotoxin-resistant OCTase) que

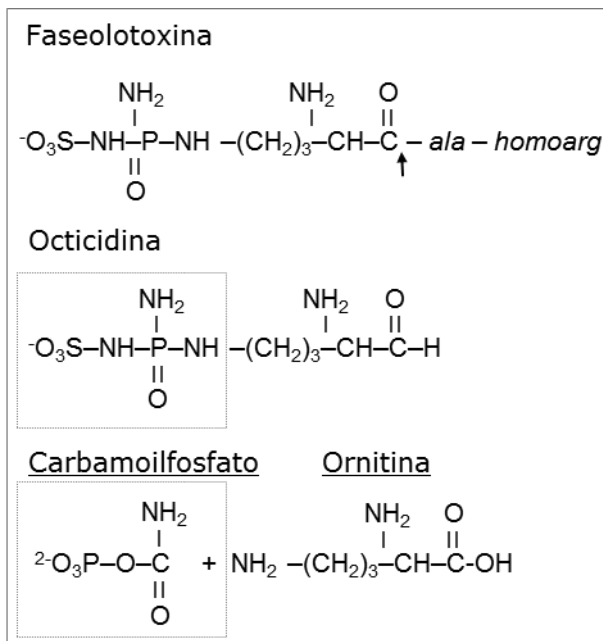


FIGURA 8. Estructura química de la faseolotoxina. La flecha indica el lugar de escisión de la toxina por las peptidasas del huésped.

es insensible al efecto de la faseolotoxina, por lo que la bacteria productora es resistente a esta toxina (Staskawicz et al., 1980; Ferguson et al., 1980).

El *cluster* de la faseolotoxina se compone de 23 genes, divididos en cinco unidades transcripcionales, dos de ellas monocistrónicas y tres policistrónicas. Es necesaria la funcionalidad de casi la mitad de estos genes, más la de un gen (PSPPH_4550) que se encuentra fuera del *cluster*, para la correcta síntesis de la toxina (Aguilera et al., 2007). Además, la regulación del *cluster* es compleja, ya que el

patrón de expresión de las cinco unidades transcripcionales difiere con la temperatura y no es el mismo para todas (Arvizu-Gómez et al., 2011; Aguilera et al., 2012, 2017; González-Villanueva et al., 2014; Chen et al., 2015). La síntesis de la faseolotoxina también depende del sistema regulador global de dos componentes GacS/GacA (De la Torre-Zavala et al., 2011), ya que un mutante Pph en cualquiera de los genes que codifican para este sistema inhibe la síntesis de la toxina a 18 °C.

El papel de la faseolotoxina en el ciclo de la bacteria no está claro. Diferentes estudios han demostrado que la toxina es prescindible para producir la enfermedad y no parece ofrecer ninguna ventaja para la supervivencia de la bacteria (Arantza Rico et al., 2003; San José et al., 2010). En España, la frecuencia de cepas Pph no toxigénicas aisladas en campo es del 68,8 %, y los síntomas que producen estas cepas son comparables a los producidos por cepas toxigénicas (Arantza Rico et al., 2003).

1.5 Sistema regulador de dos componentes GacS/GacA

La capacidad de adaptarse a cambios del medio externo y regular el paso entre las fases epifítica y patogénica de la bacteria, requiere la sincronización de multitud de procesos moleculares, regulados por un gran conjunto de sistemas de dos componentes (TCS).

GacS/GacA es uno de los TCS más ampliamente estudiado y conservado entre una gran diversidad de géneros de bacterias Gramnegativas como son, *Escherichia*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Azotobacter* o *Pseudomonas*. Este sistema influye sobre todo en procesos involucrados en la interacción bacteria-

huésped y, en bacterias patogénicas, es esencial para la regulación de factores de virulencia (Heeb & Haas, 2001; Sobrero & Valverde, 2020). En el complejo *P. syringae*, el regulón de este sistema podría estar formado por más de dos mil genes (Yu et al., 2014), y, aunque difiere entre patovares, en general GacS/GacA se relaciona con la movilidad, la producción de metabolitos secundarios, como toxinas, o la expresión del T3SS (Tabla 3). En Pph es indispensable para la síntesis de faseolotoxina (De la Torre-Zavala et al., 2011) y en la cepa Pph 1448A, GacA parece modular la expresión de *hrpL*, mediante la regulación de la expresión de *hrpR*, así como el desarrollo de la población bacteriana en el momento infectivo.

1.5.1 Mecanismo de acción

Este sistema se compone por GacS, una proteína sensora quinasa transmembranal (HK), y por GacA, una proteína reguladora citoplasmática (RR). La función de GacS es percibir señales ambientales, aunque se desconoce si estas son abióticas o bióticas, mientras que GacA se encarga de regular la expresión de diversos genes, muchos de ellos codificantes de proteínas reguladoras de otros procesos. GacA solo lleva a cabo su función en su forma activa, así que, cuando GacS es activada por una señal, se autofosforila y activa a su vez a GacA, fosforilándola también (Figura 9) (Heeb & Haas, 2001).

GacA promueve la expresión de una serie de pequeños ARNs no codificantes (sARNs), denominados en *Pseudomonas rsmY*, *rsmZ* o *rsmX*. Estos se encargan de inhibir a la proteína reguladora postranscripcional Rsm/Csr (Figura 9) (Heeb & Haas, 2001; Vakulskas et al., 2015).

1.6 Proteínas Rsm

La función principal de las proteínas Rsm es regular la traducción de ARN mensajeros (ARNm). Para ello modifican la estructura del ARNm, permitiendo o no la unión de los ribosomas a este o incrementando su estabilidad (Figura 9) (Vakulskas et al., 2015). Estas proteínas han sido estudiadas en varias especies de *Pseudomonas*, sobre todo en *P. aeruginosa* o *P. fluorescens*, en las que generalmente suele tener un papel represor sobre fenotipos regulados por el sistema GacS/GacA.

Tabla 3. Fenotipos regulados por el sistema GaS/GacA en especies del complejo *P. syringae*

<i>P. syringae</i> patovar	Fenotipos de mutantes en el gen <i>gacA</i>								
	Movilidad swarming	HR	Síntomas en planta	Síntesis de toxinas	Síntesis de EPS	Biofilm	Sideróforos	Proteasa	AHL Referencias
tomato DC3000	+	-.* ++**	-(A) +(T)	ND	ND	ND	+	ND	- a
tabaci 11528	-	ND	-	-(Tab)	ND	ND	++	ND	- b
tabaci 6605	-	++	-	ND	+	+	-	ND	+ h
phaseolicola 1448A	ND	++	+ -***	-(Fas)	ND	ND	ND	ND	ND c,d
syringae B728A	-	++	-	-(Sir)	-	ND	ND	-	- e
syringae BR2R	ND	ND	+	-(Tab)	ND	ND	ND	-	ND f
coronafaciens Pc27R	ND	ND	-	-(Tab)	ND	ND	ND	-	ND f
actinidiae A18	+	-	ND	-(Fas)	+	+	ND	ND	ND g

Las cepas mutadas en el gen *gacA* presentan (++) producción igual (+) reducida o (-) no producción con respecto a la cepa silvestre; *, población inoculada a 10⁷ ufc/ml; **, población inoculada a 10⁸ ufc/ml; ***, población inoculada a 10⁴ ufc/ml. EPS, Exopolisacáridos; AHL, N-acetilhomoserina lactona; (A), inoculación en *Arabidopsis*; (T), inoculación en tomate; ND, no determinado; (Tab), Tabtoxina; (Fas), faseolotoxina; (Sir), siringomicina. Referencias: a, Chatterjee et al., 2003; b, Cha et al., 2012; c, Ortiz-Martín et al. 2010; d, De la Torre-Zavala et al. 2011; e, Rich et al. 1994; f, Barta et al. 1992; g, Zhang et al. 2018; h, Marutani et al., 2008.

En la literatura, estas proteínas pueden ser también nombradas como CsrA (Timmermans & Van Melderren, 2010; Vakulskas et al., 2015).

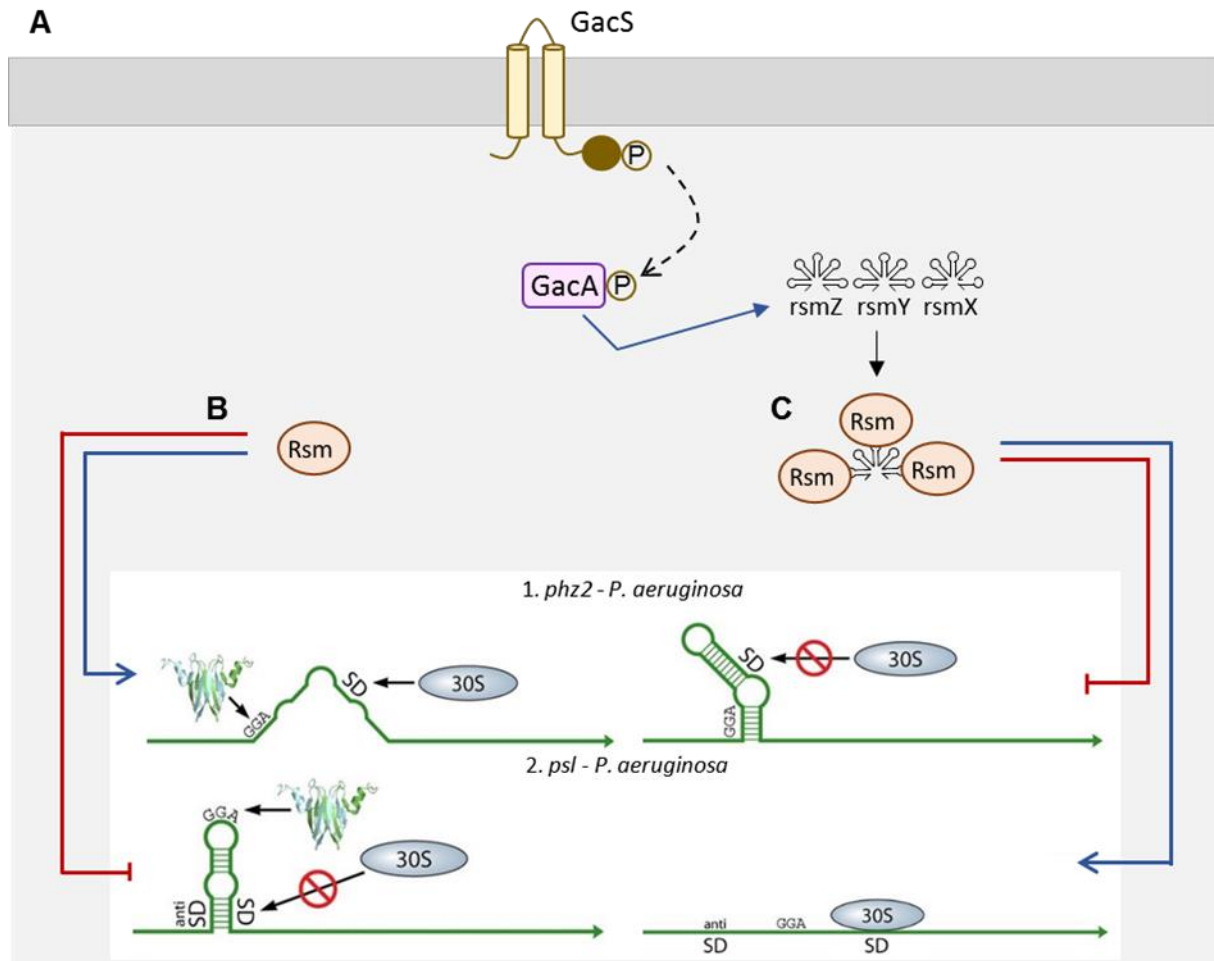


FIGURA 9. Mecanismo de acción del sistema GacA/Rsm y modelos de activación o represión por Rsm **A)** Cuando GacA es activado por GacS, induce la expresión de pequeños ARNs. **B y C)** Rsm reconoce la secuencia GGA en extremo 5' de los ARNm, para inducir o reprimir su traducción al permitir o no el acceso de los ribosomas al sitio de unión (SD). Los pequeños ARNs “secuestran” a Rsm lo que provoca un efecto antagonista de la acción de Rsm. Flecha azul continua representa inducción; flecha roja, represión. Ejemplos expuestos: **1)** Rsm induce la traducción de *phz2* al impedir la formación de estructuras secundarias en forma de horquilla, permitiendo el acceso del ribosoma al sitio de unión SD mientras que **2)** Rsm reprime la traducción de *psl* al estabilizar la estructura en horquilla, bloqueando el acceso del ribosoma. Imágenes tomadas de Vakulskas et al. 2015, Microbiol. Mol. Biol. Rev. doi:10.1128/MMBR.00052-1.

Una proteína Rsm suele estar formada por un dímero de dos subunidades idénticas. Cada subunidad se compone de cinco dominios β -barril, una α -hélice y un extremo C-terminal flexible. En su conformación tridimensional final, los dominios β -barril de ambas subunidades se entremezclan, de tal forma que el primer dominio β -barril de cada subunidad junto al quinto dominio β -barril de la

otra subunidad, forman dos sitios iguales imprescindibles para el reconocimiento y unión de los ARNm diana. Rsm reconoce y se une de forma específica a una secuencia de tres nucleótidos, GGA, localizada en una estructura en bucle al inicio del ARNm. Los pequeños ARN inducidos por GacA, como *rsmY*, presentan esta misma secuencia, pero repetida varias veces en toda su estructura. De esta forma, cada pequeño ARN une con gran afinidad varias moléculas Rsm, quedando así “secuestradas” (Figura 9).

Las especies del género *Pseudomonas* contienen más de un tipo de proteínas Rsm, de tamaño y secuencia variable, llegando a diferenciarse en nueve familias (Sobrero & Valverde, 2020). Las más estudiadas son RsmA, la cual está conservada en diversas bacterias gramnegativas y presente en todas las especies de *Pseudomonas*, RsmE, descrita por primera vez en cepas de *P. fluorescens*, y RsmF (RsmN), característica de cepas de *P. aeruginosa*. En *P. fluorescens*, RsmA (CsrA) y RsmE presentan funciones redundantes y se unen con la misma afinidad y especificidad a los sARNs, pero difieren en su regulación. En el caso de RsmF en *P. aeruginosa*, su estructura tridimensional es diferente, por lo que hay funciones que regula de forma exclusiva. Esto también produce variaciones en su afinidad por los sARNs (Vakulskas et al., 2015).

En el complejo *P. syringae*, existen pocos estudios sobre Rsm y el mecanismo general de regulación GacA/CsrA. En *P. syringae* pv. tomato DC3000 se ha descrito la presencia de cinco alelos diferentes del gen *rsm*, los cuales son denominados como *csrA*. El alelo *csrA3* es el más importante, seguido del alelo *csrA2*, en la regulación de fenotipos controlados por *gacA* (Ferreiro et al., 2018). Aun así, un estudio más reciente (Ge et al., 2019) parece indicar que casi todos los alelos contribuyen en diferente grado a la regulación de estos fenotipos.

1.7 Biología de los plásmidos de *P. syringae*

Los plásmidos son elementos genéticos ampliamente distribuidos en el mundo bacteriano, que se replican de forma autónoma en la célula bacteriana y con una gran capacidad para transferirse entre cepas, incluso de especies y géneros diferentes. Tienen importantes papeles en la patogenicidad, la especificidad de huésped, la producción de toxinas y hormonas, así como en conferir resistencia a bactericidas, como el cobre y diversos antibióticos, o a la radiación UV (Vivian et al., 2001; Jackson et al., 2011).

Los plásmidos presentan un módulo de replicación o replicón, que se define como el fragmento mínimo de ADN necesario para que se dé la replicación de forma autónoma y en el mismo número de copia del plásmido del que proviene (Nordstrom & Austin, 1989). Los replicones suelen componerse de un origen de replicación (*ori*), un gen que codifica para una proteína (Rep) que reconoce el *ori* e inicia la replicación, y un módulo de control de la replicación (Del Solar & Espinosa, 2002). Este módulo se encarga de mantener el plásmido en un número de copias determinado, y puede estar formado por una serie de estructuras

llamadas iterones o por ARNs antisentido que, en coordinación o no con una proteína, reprimen la transcripción de los genes *rep* (Summers, 1996; Del Solar & Espinosa, 2002). Cuando dos plásmidos presentan replicones o módulos de control de la replicación iguales o muy similares, se produce una incompatibilidad que impide la coexistencia de ambos plásmidos en la misma célula (Novick, 1987; Bardaji et al., 2017).

Generalmente, en los plásmidos se produce una mayor acumulación de secuencias de inserción (ISs), transposones y MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) que en el cromosoma, pudiendo llegar a suponer un tercio del tamaño del plásmido (Vivian et al., 2001; Bardaji et al., 2011a; Bardaji et al., 2011b). A menudo, estos elementos genéticos móviles están asociados a genes de virulencia y favorecen su movilidad entre las poblaciones bacterianas (Arnold et al., 2001; Joardar et al., 2005; Sundin & Murillo, 2009; Jackson et al., 2011). Las ISs son fragmentos de ADN, menores de 2.5 kb, que codifican para una transposasa flanqueada por secuencias repetidas e invertidas (IR), las cuales se encargan de movilizar el ADN que se encuentra entre ellas (Chandler & Mahillon, 2013). Los transposones y MITEs tienen una estructura similar a la de las ISs, pero con ciertas diferencias características. Los primeros contienen genes adicionales al de la transposasa, que generalmente están relacionados con resistencias a antibióticos, virulencia y especificidad de huésped (Bennett, 2004). En cambio, los MITEs solo mantienen las IR y su tamaño no supera las 300 pb. Se cree que estos derivan de las ISs, por deleciones internas, y que su movilización se debe al reconocimiento de sus IR por parte de ISs relacionadas (Siguiet et al., 2006; Delilhas, 2008; Bardaji et al., 2011a).

La mayoría de los plásmidos pertenecientes a *P. syringae* pertenecen a la familia de pPT23A (PFP), uno de los grupos de plásmidos mejor caracterizados de bacterias fitopatógenas (Murillo & Keen, 1994; Gibbon et al., 1999). Los plásmidos PFP se caracterizan por compartir grandes regiones homólogas y presentar replicones altamente conservados, pero que, a pesar de ello, permiten la coexistencia de más de un plásmido PFP diferente en la misma célula (Sesma et al., 1998; Vivian et al., 2001).

1.7.1 Sistemas de mantenimiento

A pesar de que los plásmidos generalmente aportan beneficios adicionales a la bacteria portadora, estos no son esenciales para el ciclo vital de la bacteria. Su mantenimiento puede conllevar un gasto metabólico considerable, sobre todo para elementos grandes o con un elevado número de copia (Guynet & de la Cruz, 2011). Por ello, no es de extrañar que en la naturaleza surjan cepas libres de plásmidos, o curadas. Para asegurar su herencia vertical en la población bacteriana, los plásmidos utilizan tres tipos de mecanismos: la resolución de multímeros, los sistemas de partición y los sistemas toxina-antitoxina (TA) (Figura 10).

1.7.1.1 Resolución de multímeros

Los multímeros se producen por recombinación homóloga de dos o más copias del mismo plásmido. Esto conlleva a una disminución del número de copias disponible del plásmido, aumentando las probabilidades de que no se transmita a las células hijas (Austin et al., 1981; Summers & Sherratt, 1984; Nordstrom & Austin, 1989). Las Mrp (multimer resolution protein) son las enzimas encargadas de “resolver” estos multímeros en monómeros previamente a la división celular, aumentando así el número de moléculas del plásmido (Sherratt et al., 1995; Zielenkiewicz & Ceglowski, 2001).

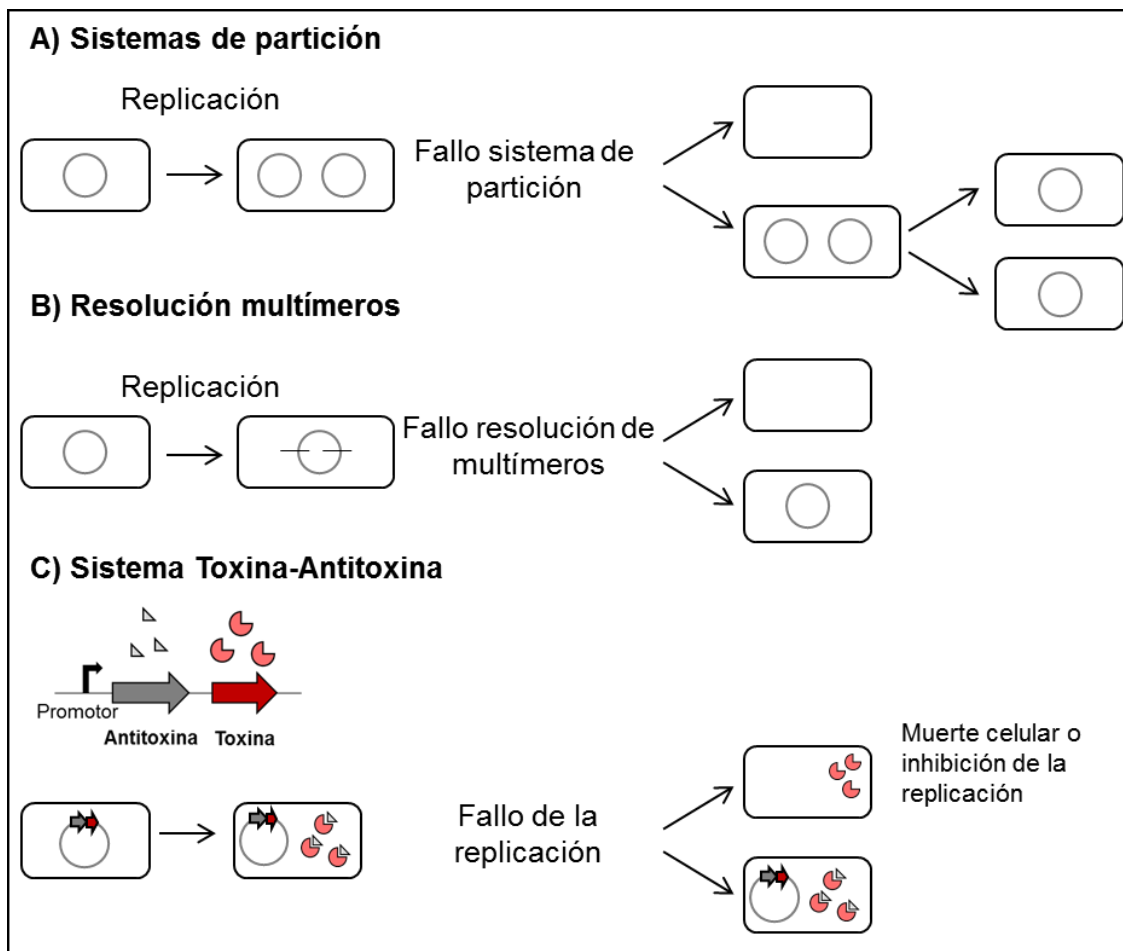


FIGURA 10. Sistemas de mantenimiento de los plásmidos. La replicación del plásmido duplica el número de plásmidos en cada célula. **A)** Tras la replicación, los plásmidos se someten a partición, asegurando que tras la división celular cada célula hija contenga al menos, una copia del plásmido. **B)** En algunos casos las células contienen dímeros que se han formado por recombinación. Estos se reducen a monómeros mediante el sistema de resolución de multímeros. **C)** A veces la replicación no funciona correctamente y la división celular produce una célula que contiene un plásmido y una que no tiene copia de plásmido. Los sistemas Toxina-Antitoxina aseguran que la población mayoritaria resultante mantendrá el plásmido en cuestión. Figura adaptada de Añorga (2017). *Biología de plásmidos y dinámica génica en el complejo *Pseudomonas syringae**, tesis doctoral_Universidad Pública de Navarra, Pamplona.

1.7.1.2 Sistemas de partición

Los sistemas de partición son especialmente importantes en plásmidos que, por su tamaño, suelen suponer una carga metabólica para la célula y que se mantienen en un bajo número de copia. Estos sistemas se encargan de que las pocas copias del plásmido no se distribuyan al azar, y que cada célula hija reciba al menos una copia (Guynet & de la Cruz, 2011).

1.7.1.3 Sistemas toxina-antitoxina (TA)

Los sistemas TA se encuentran ampliamente distribuidos en plásmidos y cromosomas de células procariontes, y se componen de una toxina estable y una antitoxina lábil, codificadas por genes incluidos en un mismo operón (Gerdes et al., 2005; Leplae et al., 2011). Las toxinas actúan inhibiendo mecanismos celulares esenciales, como por ejemplo la replicación del ADN (Jiang et al., 2002), la traducción (Yamaguchi & Inouye, 2009; Y. Zhang & Inouye, 2011), la síntesis de peptidoglucanos (Mutschler et al., 2011) o la división celular (Tan et al., 2011). La antitoxina se encarga de impedir la acción de la toxina y su expresión debe ser constante porque se degrada con facilidad (Buts et al., 2005; C. F. Schuster & Bertram, 2013). Así pues, cuando un sistema TA se pierde, el remanente de la antitoxina desaparece antes que el de la toxina. Esta se activa y da como resultado el inicio de la muerte celular o la formación de células persistentes (persisters) (Paul et al., 2019). Una célula persistente entra en un estado de “hibernación” en el que no se produce la división celular. En la naturaleza, este estado permite que una parte de la población pueda sobrevivir, por ejemplo, ante condiciones de estrés ambiental (Kussell et al., 2005) o altas dosis de antibióticos (Lewis, 2010).

Generalmente, se ha aceptado que los productos del sistema TA son solo citosólicos. Sin embargo, hay ejemplos de sistemas TA en los que la toxina sí es secretada al medio (Shidore & Triplett, 2017). Así pues, cuando una de las células hijas resultantes de la división celular, no hereda una copia del plásmido con sistemas TA, son las toxinas producidas por la segunda célula hija, que sí mantiene el plásmido, las que actúan sobre la primera célula hija. Ya sea por muerte celular o formación de persisters, la población mayoritaria resultante mantendrá el plásmido en cuestión.

1.7.2 Genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A

El genoma de Pph 1448A se compone por un único cromosoma circular y dos plásmidos PFP, el mayor de 130 kb (p1448A-A) y el menor de 52 kb (p1448A-B) (Joardar et al., 2005). En total, en su genoma se han identificado 5.353 genes, de los cuales casi el 59 % corresponde a familias parálogas, lo que indica la cantidad de genes duplicados que contiene. El grupo más grande lo componen aquellos genes con un papel biológico relacionado con la unión y transporte de

proteínas. Además, aproximadamente el 10 % de los genes tiene un papel en la regulación, lo que facilita la adaptación de Pph 1448A a diferentes tipos de ambientes durante su ciclo vital. La gran mayoría de los genes identificados tienen un alto grado de conservación con otras *Pseudomonas*, especialmente con *P. syringae*, y solo el 7 %, que incluye genes relacionados con la definición del espectro de huésped, es exclusivo de Pph (Joardar et al., 2005).

El genoma de Pph 1448A está compuesto por elementos genéticos móviles, presentes sobre todo en el plásmido p1448A-A (25.8 %) (Bardaji, Añorga, et al., 2011). En las diferentes razas de Pph, estos elementos móviles están directamente relacionados con la alteración o inactivación de efectores, siendo dos claros ejemplos la delección de *avrPphF* por el movimiento de un transposón (IS), o la generación de un nuevo alelo *avrPphE* por la inserción de un MITE en el caso de la raza 8 (Stevens et al., 1998; Rivas et al., 2005).

Un tipo de ISs presente en p1448A-A y que ha sido caracterizado funcionalmente en esta cepa, es la IS801 y sus diversas isoformas (Bardaji et al., 2011a). Este elemento tiene una alta frecuencia de transposición, entre 10^{-5} y 10^{-6} (Bardaji et al., 2011a), y la capacidad de movilizar ADN adyacente en el momento de transponerse (Bardaji et al., 2019). La transposición se produce de forma unidireccional y se inicia en el extremo 3' del elemento, cuando la transposasa reconoce el origen de transposición (*ori801*). Luego, continúa hacia el extremo 5', hasta llegar a una secuencia de terminación de la transposición (*ter801*) (Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2002). En ocasiones, este proceso es ineficaz y la transposición no termina en su correspondiente secuencia *ter801*(GAAC) sino que continúa hasta encontrar otra secuencia igual o similar como GGAC, CAAG, CGAC, y GCAC. A este proceso se le conoce como transposición terminal (one-ended transposition) y es cuando se produce la movilización del ADN adyacente al extremo 5' de la IS (Mendiola et al., 1994; Richter et al., 1998; Bardaji et al., 2011a). En la cepa Pph1448A la transposición *in vivo* de IS801 del elemento completo es del 65 % de las inserciones, y la de fragmentos derivados de la IS, que oscilan entre 229 y 679 nt, se produce en un 25,7 %. Con menor frecuencia (0,7 %) se produce la movilización de ADN adyacente (Bardaji et al., 2011a).

2 Objetivos

El sistema GacS/GacA-Rsm interviene en la regulación de diversos fenotipos asociados con la virulencia en diversas especies Gramnegativas, modulando así el cambio entre un modo de vida no patogénico y uno patogénico. La identificación de siete genes *rsm* en el genoma de Pph sugiere la existencia de funciones redundantes y diferentes grados de especialización para estas proteínas. Así mismo, el sistema GacS/GacA en Pph está implicado en la termorregulación de la biosíntesis de faseolotoxina; en consecuencia, es posible que el sistema GacS/GacA pueda participar asimismo en la termorregulación de otros genes de la bacteria. Para el desarrollo de esta Tesis se propuso la obtención de mutantes simples y múltiples en los genes *rsm*, localizándose tres de ellos, junto a 11 T3Es, en el plásmido mayor (p1448A-A) de Pph. Así pues, se elaboraron los siguientes objetivos:

1. Evaluación de la importancia del plásmido pPph1448A-A en la virulencia de Pph 1448A mediante la eliminación de 11 T3Es, y de los genes *rsm* plasmídicos, a través de la obtención de una cepa curada de este plásmido.
2. Estudiar la implicación de las proteínas Rsm en la regulación de fenotipos mediados por GacA, particularmente de fenotipos que puedan estar termorregulados.
3. Estudiar la influencia de la temperatura y del sistema GacS/GacA en el transcriptoma de Pph 1448A, así como la relación entre ambos factores.

3 Capítulo I

Influencia del plásmido A de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A en la virulencia y la patogénesis de la bacteria

3.1 Introducción

Durante el proceso de infección, es muy importante por parte del agente patógeno evitar o inhibir los sistemas de señalización de defensa de la planta. Para ello, las bacterias patógenas han desarrollado diferentes estrategias siendo una de las más importantes la mediada por el sistema de secreción tipo 3 (T3SS) (Tang et al., 2006). Mediante este sistema, se libera una serie de proteínas en el interior de la célula huésped denominadas efectores (T3Es). El número de T3Es es muy variable entre distintas cepas (Mudgett, 2005; S. R. Grant et al., 2006; Xin et al., 2018), aunque existe un reducido número de ellos (T3Es core), que son esenciales para la patogénesis y el desarrollo de la enfermedad, mientras que el resto presentan funciones redundantes que respaldarían la acción o función de los T3Es core (Lindeberg et al., 2012; Dillon, Almeida, et al., 2019; Laflamme et al., 2020). Los genes que codifican para el repertorio de los T3Es se localizan, generalmente, en el cromosoma, pero también pueden estar en plásmidos. Los plásmidos, ampliamente distribuidos en el mundo bacteriano, son elementos genómicos con capacidad para transferirse entre cepas, por lo que la herencia horizontal es un proceso importante en la adquisición de T3Es (Newberry et al., 2019; Dillon, Almeida, et al., 2019).

La mayoría de los plásmidos del complejo *P. syringae* pertenecen a la familia pPT23A (PFP), los cuales se caracterizan por tener replicones altamente conservados que, debido a su plasticidad, permiten la coexistencia de varios de estos plásmidos en la misma célula (Murillo & Keen, 1994; Murillo et al., 1994; Sesma et al., 1998). Las cepas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pph), agente causal de la grasa de la judía, suelen contener más de un plásmido PFP de diferente tamaño. En concreto, la cepa Pph 1448A contiene un plásmido grande (p1448A-A) de 132 kb, y un plásmido pequeño (p1448A-B) de casi 52 kb (Joardar et al., 2005), localizándose en p1448A-A 11 de los 31 T3Es identificados en el genoma de dicha cepa (Chang et al., 2005; Vencato et al., 2006). Así mismo, este plásmido posee una región de unas 4.2 kb en doble copia, que contiene el T3E *hopW1*, así como una isla de patogenicidad (PAI) donde se localizan otros cuatro T3Es, entre ellos *avrPphC* y *virPphA*. La caracterización e importancia de la PAI, así como la primera descripción de *virPphA* en Pph, se realizó gracias a la obtención de la cepa RW60. Esta bacteria es una cepa derivada de Pph 1449B y curada del plásmido pAV511, en el que se localiza la PAI (Jackson et al., 1999; Tsiamis et al., 2000; Rivas et al., 2005). RW60 induce una respuesta hipersensible (HR) en las variedades de judía que son susceptibles a la cepa silvestre (Jackson et al., 1999; Tsiamis et al., 2000), y solo es posible restaurar la virulencia del patógeno mediante la complementación con la región entera de la PAI, o con la región que contiene solo *virPphA*.

El papel en virulencia del repertorio de los T3Es de la cepa Pph 1448A, ha sido estudiado utilizando mutantes simples en 15 T3Es, 9 de ellos plasmídicos. Su evaluación, mediante ensayos de infecciones mixtas (CI) en planta, muestra

que únicamente seis de estos 15 T3Es, (*hopR1*, *hopI1*, *hopAS1*, *avrPphC*, *virPphA* y *hopAU1*), influyen en el crecimiento de la población bacteriana durante la infección, y que tan solo un mutante en el gen *hopR1*, muestra diferencias fenotípicas en la inducción de síntomas (Macho et al., 2009, 2012; Zumaquero et al., 2010). Los nueve T3Es restantes presentan funciones redundantes, por lo que su evaluación solo sería posible mediante el análisis de mutantes múltiples, y el uso de infecciones mixtas modificadas denominadas *cancelled-out index* (COI). Estos resultados parecen sugerir que, al igual que en Pph 1449B, sería necesario eliminar una cantidad relevante de T3Es para que se pudiese observar un cambio fenotípico.

La curación de plásmidos *in vitro* pueden llevarse a cabo con diversas técnicas de laboratorio (Bender et al., 1994; Vivian et al., 2001; Pérez-Martínez et al., 2008), siendo una de ellas los procesos de incompatibilidad (Murillo & Keen, 1994; Murillo et al., 1994; Sesma et al., 1998; Bardaji et al., 2019). Estos procesos de incompatibilidad se producen cuando en la misma célula se encuentran dos replicones exactamente idénticos, o cuando sus módulos de regulación de la replicación son muy parecidos. Otros trabajos han puesto de manifiesto que la presencia de sistemas de mantenimiento mediados, entre otros, por sistemas toxina-antitoxina (TA), aumentan la estabilidad de los plásmidos, imposibilitando su eliminación mediante técnicas convencionales (Bardaji et al., 2019). Los sistemas TA codifican para una toxina y una antitoxina, las cuales actúan a nivel postsegregacional (Gerdes et al., 2005; Leplae et al., 2011). La antitoxina se degrada más rápido que la toxina, de tal forma, que en aquellas células hijas que no hayan heredado el plásmido en cuestión, la toxina actúa induciendo la muerte, o la inhibición de la replicación celular (Buts et al., 2005; C. F. Schuster & Bertram, 2013; Paul et al., 2019).

En este estudio se propone como objetivo obtener una cepa derivada de Pph 1448A curada del plásmido p1448A-A y evaluar su comportamiento en planta. Para la consecución de este objetivo, y teniendo en cuenta las características de p1448A-A, se aplicó una estrategia basada en la inactivación de sistemas toxina-antitoxina, que ha demostrado ser exitosa para la curación de plásmidos nativos (Añorga et al., 2021). Dada la alta estabilidad del replicón de p1448A-A, fue necesario complementar esta estrategia con la curación por incompatibilidad de replicones. La generación de una cepa curada de este plásmido, cepa ΔpA , nos permitió evaluar el papel en virulencia del plásmido p1448A-A en Pph 1448A, y junto a la identificación de los T3Es diferenciales entre Pph 1448A y Pph 1449B evaluar cuales de estos T3Es podrían estar involucrados en la inducción de la HR causada por RW60 en ciertas variedades de judía.

3.2 Material y Métodos

3.2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla S1. Las cepas de *Pseudomonas* se propagaron de forma rutinaria a 26 °C en medio B de King (KMB) (King et al., 1954) o, cuando fue requerido, en agar nutritivo (NA; Oxoid) suplementado con un 5% (p/v) de sacarosa (medio SNA). *Escherichia coli* NEB10 β (New England BioLabs) se utilizó para los experimentos de clonación, y fue cultivada de forma rutinaria a 37 °C en medio Lysogeny Broth modificado (LB) (Bertani, 1951; Sambrook et al., 1989). Para la realización de las curvas de crecimiento, se utilizó como medio rico LB y como medio mínimo Hoitink y Sinden modificado (HSC) (Palmer & Bender, 1993). Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con los siguientes antibióticos (concentraciones finales expresadas en $\mu\text{g ml}^{-1}$ para las cepas de *Pseudomonas/E. coli*), kanamicina (Km) 25/50, gentamicina (Gm) 10, tetraciclina (Tc) 12.5, ampicilina (Amp) 100 y nitrofurantoína (Nf) 100. Para las cepas de *Pseudomonas* portadoras del transposón Tn5-GDYN1, la concentración de kanamicina utilizada fue de 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

3.2.2 Técnicas moleculares y bioinformática

La extracción del ADN plasmídico de las cepas de *Pseudomonas* se realizó mediante lisis alcalina (Zhou et al., 1990), mientras que los plásmidos de *E. coli* se extrajeron siguiendo la técnica de lisis por hervido (Holmes & Quigley, 1981) o utilizando un kit comercial (Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare). Para la realización de perfiles plasmídicos, los plásmidos sin digerir de *Pseudomonas* se separaron mediante electroforesis a 90 V durante aproximadamente 150 min, en geles de agarosa al 0.8 % (Sesma et al., 1998). Los plásmidos digeridos de *Pseudomonas* y *E. coli* se separaron por electroforesis a 120 V, 40 min en geles de agarosa al 0.8 %. Se utilizó el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) para purificar los fragmentos de interés. Los plásmidos se transfirieron a *Pseudomonas* o *E. coli* mediante electroporación (Choi et al., 2006).

La amplificación de ADN se realizó mediante PCR utilizando una polimerasa estándar (BIOTaq, Bioneer, UK), excepto para los experimentos de clonación, en cuyo caso la amplificación se llevó a cabo utilizando una polimerasa de alta fidelidad (PrimeStar HS, Takara Bio Inc., Japan). Los amplicones se separaron por electroforesis a 120 V 40 min en geles de agarosa al 0.8 %, y cuando fue necesario se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Para experimentos de clonación, los amplicones purificados fueron clonados en el vector pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit; Thermo Scientific). La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó siguiendo el método Sanger en la empresa Macrogen Inc. (Amsterdam).

El ADN genómico de la cepa Pph RW60 se extrajo empleando el kit comercial Jet Flex Extraction (Genomed; Löhne, Germany), y se secuenció en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Las secuencias se visualizaron y manipularon empleando los programas informáticos Artemis y ACT (Carver et al., 2008). Las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se realizaron empleando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mediante los algoritmos de la herramienta BLAST. Los alineamientos de secuencias se realizaron utilizando el programa online MultAlin (Corpet, 1988) (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>), o las herramientas del servidor del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Los cebadores fueron diseñados a través del software Primer3plus (Untergasser et al., 2012).

3.2.3 Identificación e inactivación de sistemas TA

Para la identificación de posibles sistemas TA, en primer lugar se revisó manualmente la secuencia del plásmido p1448A-A, para la búsqueda de CDSs anotadas con los términos de estabilidad, toxina, y formas relacionadas, o CDSs anotadas con dominios asociados a toxinas o a antitoxinas de sistemas TA. Posteriormente, se seleccionaron aquellos operones que presentaban una puntuación significativa en la herramienta bioinformática RASTA-bacteria (Sevin & Barloy-Hubler, 2007).

La inactivación funcional de los sistemas TA se basó en la neutralización de las toxinas por la expresión constante de sus respectivas antitoxinas (Kopfmann et al., 2016; Añorga et al., 2020), clonadas en *trans* en el vector de amplio espectro pRK415. Para ello, se diseñó la síntesis de un fragmento de ADN con los promotores y secuencias concatenadas de las siete posibles antitoxinas identificadas (Tabla 4). Cuando fue necesario, y para poder escindir cada antitoxina con su respectivo promotor de forma individual, se añadieron secuencias específicas de diferentes enzimas de restricción. De esta forma, la antitoxina 1 se escinde con Apal, la antitoxina 2 con AvrII, la antitoxina 3 con BclI, la antitoxina 4 con SpeI, la antitoxina 5 con StuI, la antitoxina 6 con XhoI y la antitoxina 7 con SalI. Se añadieron al inicio y al final del fragmento dos sitios de restricción pertenecientes a EcoRV y BamHI, para la escisión de todo el fragmento en conjunto. Este fragmento fue sintetizado por la empresa GenScript (GenScript HK Limited, Hong Kong) y clonado en el vector de *E. coli* pCC1, resultando el clon pA7. El inserto de pA7 fue escendido usando la enzima de restricción BamHI, y clonado en el vector pRK415, detrás del promotor P_{lac} constitutivo del vector y en dirección de la transcripción, resultando el clon pRKA7.

3.2.4 Manipulación del plásmido p1448A-A

El plásmido p1448A-A fue marcado al azar con el transposón Tn5-GDYN1 (Flores et al. , 1993) obteniéndose la cepa UPN974. Dicho transposón contiene el gen *sacB*, lo que permite identificar posibles derivados curados del plásmido por selección en un medio con sacarosa (NAS). El transposón se introdujo en Pph 1448A por conjugación, empleando como cepa donadora *E. coli* S17.1. Los transconjugantes se sembraron en medio KMB suplementado con kanamicina y nitrofurantoína. Las colonias resultantes se inocularon en medio líquido KMB, y se dejaron crecer durante 16 horas para realizar una extracción plasmídica. Examinando el perfil plasmídico, se seleccionaron aquellas colonias que mostraban un retraso en la migración de p1448A-A por la presencia del transposón. Para conocer los sitios de inserción de Tn5-GDYN1 de las colonias seleccionadas, las extracciones plasmídicas fueron digeridas con la enzima EcoRI. Los fragmentos obtenidos fueron purificados y clonados en el vector pJET 1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit; Thermo Scientific), y se seleccionaron aquellas colonias que contenían el casete de resistencia a gentamicina perteneciente al transposón. Estos fragmentos fueron secuenciados utilizando el cebador IS50_F que anilla en el transposón, y que está dirigido hacia el ADN que lo flanquea (Tabla S2).

3.2.5 Incompatibilidad de replicones

Para la amplificación, por PCR, de la región del plásmido p1448A-A que contiene el replicón, limitada entre las coordenadas 131834 y 1655, se diseñaron los cebadores RepA_p1448A_A_F y RepA_p1448A_A_R. El amplicón obtenido se clonó en el vector pJET 1. 2, y fue escindido usando la enzima de restricción SpeI. El inserto se clonó en el vector pKMAG (Km^R) en el sitio de restricción SpeI del vector, obteniéndose el clon pKMAG-AA.

Las cepas UPN1141 y UPN1194 se transformaron con el vector pKMAG-AA (Tabla S1) por electroporación, y como medio de selección, se utilizaron placas de medio LB suplementadas con kanamicina y tetraciclina. La pérdida del plásmido de las colonias resultantes se comprobó mediante su visualización por geles de agarosa, así como, por amplificación mediante PCR, del replicón de p1448A-A, utilizando los cebadores RepA_p1448A_A_R y repA-ext_F (Tabla S2). repA-ext_F anilla de forma específica en el plásmido p-1448A-A y no en la construcción pKMAG-AA.

3.2.6 Curva de crecimiento en medio rico y mínimo

Se evaluó la capacidad de crecimiento de Pph 1448A y Δ pA en un medio rico y en un medio mínimo, empleando LB como medio rico y HSC como medio mínimo. Se utilizaron microplacas de 48 pocillos con 450 μ l del medio a analizar y la densidad poblacional (DO₆₀₀) de partida fue de 0.01, equivalente a 5×10^6 ufc/ml. La toma de lecturas se realizó cada 30 min a 28 °C, sin agitación, en una

multi-Detection Microplate Reader (Synergy™ HT; Biotek® Instruments, Winooski, USA). La media y desviación típica para la realización de la curva se extrajeron de un ensayo con seis réplicas biológicas por medio ensayado.

3.2.7 Expresión de los alelos *avrPphE*, *hopV1* y *hopAE1* de RW60 en ΔpA

Se diseñaron cebadores específicos (Tabla S2) para la amplificación de los genes *avrPphE*, *hopV1*, y *hopAE1* pertenecientes a la cepa RW60, con sus respectivos promotores. A estos se les añadieron dianas para las enzimas de restricción KpnI, KpnI- BamHI, y EcoRI, respectivamente. Puesto que *avrPphE* se localiza junto a *hopY* detrás de un mismo promotor, se decidió clonar el operón entero. Así mismo *hopV1* fue clonado junto a su chaperona *schV*. Primero, los amplicones fueron clonados en pJET 1. 2, y después, los insertos liberados con las enzimas ya mencionadas, fueron clonados en la región del polilinker del vector pME6041(Km^R) (Heeb et al., 2000), obteniéndose los clones pMEhopYX60, pMEhopV60 y pMEhopAE60 (Tabla S1). Posteriormente, pMEhopYX60, pMEhopV60 o pMEhopAE60 se introdujeron en ΔpA por electroporación, y los transformantes se sembraron en medio KMB con kanamicina. La comprobación de la presencia de pMEhopYX60, pMEhopV60 o pMEhopAE60, en las colonias resultantes, se realizó mediante una PCR con cebadores específicos del vector pME6041. pME6041 no contiene un promotor propio y se encuentra en un bajo número de copia, de tal forma que los genes clonados en él se expresarán debido a su propio promotor. Finalmente, se seleccionó una colonia de cada transformación, obteniéndose los clones $\Delta pAhopYX_{60}$, $\Delta pAhopV1_{60}$ y $\Delta pAhopAE1_{60}$ (Tabla S1).

3.2.8 Evaluación de la patogenicidad

Se realizaron ensayos de patogenicidad de las bacterias mediante su inoculación en vainas y plantas de judía de las variedades Canadian Wonder y Tendergreen, siguiendo esencialmente procedimientos ya descritos (Harper et al., 1987).

La inoculación en vainas se realizó, bien infiltrando con una jeringuilla una suspensión bacteriana en solución Ringer's (1/4 de fuerza; Oxoid, Basingstoke, UK), o bien con la inoculación de masa celular mediante el uso de palillos de madera (Harper et al., 1987; Jackson et al., 1999). La preparación de las suspensiones bacterianas se realizó cogiendo una o varias colonias crecidas en placa, y suspendiéndolas en 1 ml de Ringer's hasta ajustar a una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.1, equivalente a 5x10⁷ ufc/ml. También se hicieron inoculaciones en vainas de la variedad comercial Helda, infiltrando suspensiones bacterianas correspondientes a 10⁵ cfu/ml y 10⁷ cfu/ml. Las vainas inoculadas se mantuvieron en cajas de plástico cerradas (tipo Tupperware), con papel húmedo en el interior, a temperatura ambiente (22 °C) (Harper et al., 1987). Previamente, estas cajas fueron esterilizadas mediante un proceso de inmersión en una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (lejía) al 1%, durante 5 minutos. En la medida de lo

posible, se realizaron dos inoculaciones de cada cepa en la misma vaina utilizando al menos tres vainas diferentes. De esta manera, se obtuvieron 6 réplicas técnicas (inoculaciones) por suspensión bacteriana preparada, y al menos se realizaron tres ensayos diferentes e independientes. Los síntomas se observaron a los 2, 4 y 6 días después de la inoculación.

Para examinar la producción de síntomas en hoja, así como, estimar el crecimiento de las poblaciones bacterianas en planta, se prepararon suspensiones bacterianas de 2×10^8 ufc/ml (DO_{600} , 0.4), las cuales se inocularon en las dos hojas primeras de cada planta, mediante el uso de una jeringuilla sin aguja. Se procedió a la inoculación de tres plantas diferentes cuando estas tenían entre 7 y 10 días de edad, y se mantuvieron en una cámara de plantas con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 25 °C, y 8 horas de oscuridad a 16 °C. Los síntomas se observaron a las 48 y 96 horas post-inoculación (Jackson et al., 1999). Para el recuento poblacional bacteriano, se extrajo, mediante un sacabocados de 6 mm de diámetro, una muestra de tejido foliar por hoja inoculada, a las 48 y 96 horas post-inoculación (Jackson et al., 1999). De esta forma, se obtuvo por planta y cepa, dos discos de tejido foliar que se homogenizaron en 1 ml de solución Ringer's. Una vez machados los discos de tejido foliar, se prepararon diluciones seriadas, y se sembraron, por duplicado, gotas de 10 μ l de cada dilución en placas de medio rico LB. Para realizar el conteo de colonias, las placas se incubaron durante dos días a 26 °C. La media y distribución estándar de las poblaciones bacterianas se estimó de tres réplicas biológicas. Los análisis estadísticos, ANOVA y Test Duncan ($P=0.05$) se realizaron utilizando el software R Project 3.3.3 (The R Development Core Team, 2008); Vienna, Austria).

3.3 Resultados

3.3.1 Se identificaron siete posibles sistemas TA en p1448A-A

En ensayos previos realizados en nuestro laboratorio ya se intentó, aunque sin éxito, la obtención de una cepa derivada de Pph 1448A curada del plásmido p1448A-A, mediante incompatibilidad de replicones. Debido a esta falta de éxito, se decidió examinar e identificar la posible existencia de sistemas TA localizados en p1448A-A, que pudieran estar interviniendo en el mantenimiento del plásmido en la bacteria.

Se encontraron siete posibles sistemas TA diferentes anotados en la secuencia de p1448A-A. Cada TA está compuesto por dos secuencias de codificación (CDSs) detrás de un mismo promotor (Tabla 4) (Figura 11).

Tabla 4. Posibles sistemas toxina-antitoxina identificados en p1448A-A

Sistema TA	Locus Tag	Producto deducido (Familia InterPro)
TA1 ^a	PSPPH_RS26505/ PSPPH_RS26790	Proteína hipotética (IPR011433)
	PSPPH_RS26510/ PSPPH_RS26795	Familia de toxinas RelE/ParE (IPR007712)
TA2	PSPPH_RS26635	Familia de toxinas VapC, con un dominio PIN (IPR002716)
	PSPPH_RS26640	Familia de antitoxinas VapB (IPR019239)
TA3	PSPPH_RS26710	Proteína tipo Arc (IPR013321) con un dominio ribbon-helix-helix (IPR031914)
	PSPPH_RS26715	Componente de un posible sistema toxina-antitoxina con un dominio PIN (IPR002850)
TA4	PSPPH_RS26790	Proteína hipotética
	PSPPH_RS26795	Familia de toxinas RelE/ParE (IPR007712)
TA5	PSPPH_RS26905	Familia de antitoxinas Phd/YefM (IPR036165)
	PSPPH_RS26910	Familia de toxinas RelE/ParE (IPR007712)
TA6	PSPPH_RS26940	Proteína hipotética
	PSPPH_RS26945	Familia RelE/StbE (IPR007712)
TA7	PSPPH_RS27110	Familia de toxinas PemK/MazF (IPR003477)
	PSPPH_RS27115	Familia de proteínas MazE (IPR021558)

^a TA1 presenta dos copias en el plásmido, localizadas en diferentes regiones.

El sistema TA1 está presente en doble copia, puesto que se localiza en la región duplicada del plásmido. Por tanto, en p1448A-A se localizan en total ocho posibles sistemas TA. Los productos deducidos anotados en el genoma para las CDSs de las toxinas, a excepción del sistema TA3, han sido clasificados en diversas familias de toxinas de los sistemas TA tipo II. El tipo II de los sistemas TA es la clase más abundante y estudiada en procariontes, el cual se caracteriza porque tanto la toxina como la antitoxina son proteínas. La antitoxina suele poseer dos dominios, uno de unión proteína-proteína y otro de unión al ADN. La unión de la antitoxina a la toxina inhibe la actividad de esta última formándose un complejo TA. Debido a el dominio de unión al ADN de la antitoxina, este complejo TA se une al promotor del operón del sistema TA, inactivando su propia transcripción (Wen et al., 2014; A. Kumar et al., 2019; Fraikin et al., 2020). Posiblemente, la toxina del sistema TA3 también pueda ser incluida en este grupo, ya que está anotado como proteína hipotética y presenta un dominio PIN característico de esta clase (Makarova et al., 2009).. A diferencia de las toxinas, sólo las antitoxinas de los sistemas TA2, TA5 y TA7 se encuentran anotadas

transposición terminal (Mendiola et al., 1994; Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2002), en el cual la transposición ineficaz de isoformas de IS801 (Bardaji, Añorga, et al., 2011) puede conllevar la movilización de ADN adyacente a estas isoformas además del propio transposon. Para que estos plásmidos deletados permanezcan en la célula es necesario que mantengan un replicón. Se decidió comprobar si se había producido la pérdida del plásmido, realizando una PCR con cebadores específicos para el gen *rsmH3*. Dicho gen, está presente en doble copia, ya que se localiza en la región duplicada del plásmido (Figura 11), y la primera copia se localiza a 3.7 kb del extremo 3' del gen *repA*. *repA* forma parte del replicón ya que codifica para la proteína iniciadora de la replicación del plásmido, por lo que un resultado negativo en la PCR sólo podría deberse, bien a la pérdida del plásmido, o bien a la formación de una deleción plasmídica que incluyera las dos copias de este gen (100 kb) y por tanto, con la consecuente pérdida de un gran número de T3Es. De esta forma, nos permite seleccionar colonias de interés para el desarrollo de este estudio.

La PCR con los cebadores específicos del gen *rsmH3*, dio lugar a un amplicón específico en 98 de las 100 colonias examinadas, siendo negativa para dos de ellas. El perfil plasmídico de 50 de las 100 colonias mostró la aparición de una banda correspondiente a p1448A-B y de una segunda que correspondería a p1448A-A. En al menos 31 colonias, esta segunda banda se situaba claramente por debajo a la correspondiente a la de la cepa silvestre, indicativo de que se habían producido deleciones plasmídicas en p1448A-A. Dentro de este grupo de 31 colonias se encontraban las dos colonias que habían dado negativo en la prueba PCR. Estos resultados mostraron que el 100 % de las colonias mantenían el plásmido p1448A-A, y que al menos en un 62 % de estas, el plásmido se mantenía en la célula con deleciones plasmídicas de tamaños que variaban aproximadamente entre 10 kb a 100 kb. Con el fin de analizar con mayor detalle el contenido genético que se mantenía de p1448A-A, y sobre todo, el número de T3Es aún presentes, de las 100 colonias, se seleccionaron siete, que presentaban diferentes tamaños de p1448A-A (Figura 12). Estas siete colonias analizadas, mostraron diferencias en cuanto a contenido y cantidad de T3Es que aún mantenían (Tabla 5 y Tabla S2). UPN1334 fue la cepa que menos T3Es había perdido; por el contrario, UPN1335 fue la cepa que más perdió, únicamente manteniendo una de las copias de *hopW1* y *avrRps4*; sin embargo, la mayor deleción plasmídica se produjo en UPN1141. Las cepas UPN1335, UPN1337 y UPN1338, a diferencia del resto, no mantenían ninguno de los T3Es pertenecientes a la PAI.

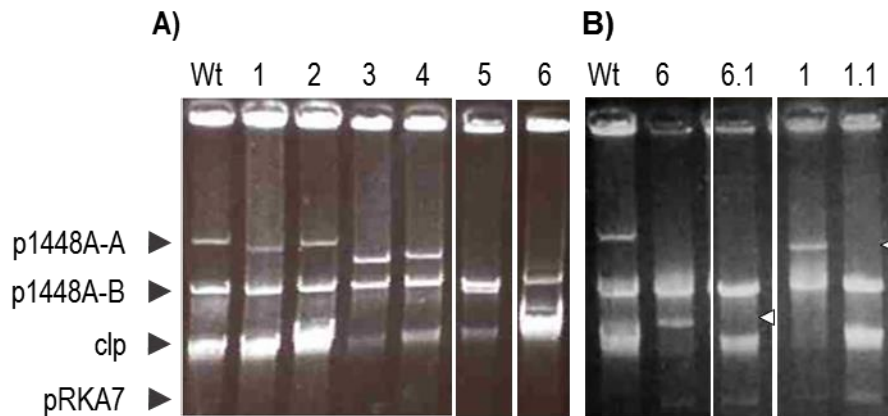


Figura 12. Representación de perfiles plasmídicos tras la inactivación de los sistemas TA del p1448A-A (A) y tras la inactivación de los sistemas TA junto a la incompatibilidad de replicones (B). **A)** Algunas colonias obtenidas tras la inactivación de los sistemas TA mostraron tamaños diferentes del plásmido p1448A-A debido a deleciones genéticas. Wt, Pph 1448A; 1, UPN1194; 2, UPN1338; 3, UPN1337; 4, UPN1336; 5, UPN1335; 6, UPN1141. **B)** La inactivación de sistemas TA y la incompatibilidad de replicones permitió la pérdida p1448A-A (◁). 6.1, UPN1162 (Δ pA); 1.1, UPN1195 son cepas derivadas de las cepas UPN1141 (6) y UPN1194 (1). p1448A-A, plásmido mayor (132 kb); p1448A-B, plásmido menor (52 kb) y clp, ADN cromosómico y plásmidos linealizados de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A.

Se sabe que en la cepa RW60, la región de la PAI y en concreto *virPphA*, son esenciales para la patogénesis de la bacteria (Jackson et al., 1999); en cambio, en Pph 1448A, mutaciones simples en *virPphA* (Macho et al., 2012) o en otros T3Es localizados en la PAI (Macho et al., 2012), no conllevan una diferencia en la virulencia o en la patogénesis. Esto podría deberse a la existencia de T3Es que pudieran tener funciones redundantes. Por ello, se analizó la capacidad de estas cepas de producir síntomas, inoculándolas en vainas de la variedad comercial Helda (cv. Helda), a una densidad poblacional relativamente alta (5×10^7 ufc/ml), lo que permitiría observar, tanto la producción gradual de dichos síntomas, como la inducción de una respuesta hipersensible. Cabría esperar que las cepas UPN1335, UPN1337 o UPN1338, mostrarían un fenotipo diferencial, ya que no mantenían ninguno de los T3Es pertenecientes a la PAI, pero sobre todo UPN1335, la cual solo mantenía tres T3Es, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron, que todas las cepas producían síntomas equiparables a los de la cepa silvestre (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido genético y patogenicidad de cepas derivadas de *P. syringae* pv phaseolicola 1448A (p1448A-A::Tn5GDYN1) con variantes delecionadas del plásmido p1448A-A^a

Gen ^b	Cepas con deleciones de p1448A-A							
	Pph1448A	UPN1141	UPN1334	UPN1335	UPN1336	UPN1337	UPN1338	UPN1194
Tamaño (kb)	130 kb	31 kb	110 kb	45 kb	82 kb	82 kb	108 kb	101 kb
<i>avrPphC</i> *	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>hopAW1</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>hopAB1</i> **	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>hopAY1</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>xopAD</i>	+	+	+	-	+	-	+	+
TA6	+	+	+	+	+	-	+	+
TA7	+	+	+	+	+	ND	+	+
Replicón	+	+	+	+	+	+	+	+
TA1	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>rsmH3-1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>hopW1-1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>hopD1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>hopQ1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>hopAU1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+
TA2	+	-	+	-	-	+	+	+
TA3	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>hopAV1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+
TA1-2	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>rsmH3-2</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>hopW1-2</i>	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabla 5. Contenido genético y patogenicidad de cepas derivadas de *P. syringae* pv phaseolicola 1448A (p1448A-A::Tn5GDYN1) con variantes deletcionadas del plásmido p1448A-A^a

Gen ^b	Cepas con deletcciones de p1448A-A							
	Pph1448A	UPN1141	UPN1334	UPN1335	UPN1336	UPN1337	UPN1338	UPN1194
<i>avrRps4</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
TA4	+	-	ND	ND	-	-	ND	-
TA5	+	-	ND	ND	-	-	ND	-
<i>csrA6</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>avrD1</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
Patogenicidad ^c	+	+	+	+	+	+	+	+

^a(ND) no determinado, (+) presencia o (-) ausencia de cada gen, determinadas mediante PCR con cebadores específicos (ver Tabla S2). **avrPphC* también nombrado *avrB2*, ***hopAB1* también nombrado *virPphA*. En naranja se señalan los sistemas TA localizados en el plásmido; los genes presentes en doble copia se enmarcan en un recuadro negro.

^bSe indican genes de relevancia de p1448A-A, ordenados según su localización física; para facilitar la visualización de las deletcciones, se listan los genes desde *avrPphC* (posición 102433)

^cLas cepas se inocularon a una densidad poblacional de 5×10^7 ufc/ml en vainas de judía cv. Helda y los síntomas se visualizaron cuatro días postinoculación; +, producción se síntomas comparables a los de la cepa silvestre.

3.3.3 La inactivación de sistemas TA junto con la incompatibilidad de replicones permite la curación de plásmidos altamente estables

Debido a los resultados obtenidos se procedió a emplear una estrategia por incompatibilidad de replicones manteniendo la inactivación de los sistemas TA. Se diseñaron cebadores específicos del replicón de p1448A-A y se clonó en la diana Spel del vector de clonación pKMAG, obteniéndose el clon pKMAG-AA (Km^r). Los resultados previos en nuestro laboratorio (Bardaji et al., 2017) han mostrado que un replicón PFP clonado en esta diana da lugar a un vector significativamente más inestable que cuando se clonaba en el polilinker. Esto permite posteriormente, eliminar más fácilmente el vector de la bacteria al ser propagada esta en un medio rico sin antibióticos. Para comprobar la eficiencia de la técnica independientemente del tamaño del plásmido, pKMAG-AA se transfirió a las cepas UPN1141 y UPN1194, debido a que estas presentan un fragmento pequeño y un fragmento grande de p1448A-A, respectivamente. Los transformantes se sembraron en medio LB con kanamicina (pKMAG-AA) y tetraciclina (pRKA7), y de entre las colonias resultantes se seleccionaron dos clones por cepa para analizar. El perfil plasmídico de las cuatro colonias examinadas mostró la desaparición de la banda correspondiente a la variante delecionada de p1448A-A (Figura 12). Así mismo, se realizó una PCR con cebadores específicos de p1448A-A, la cual fue negativa en todas las colonias seleccionadas. Estos resultados indican que el plásmido p1448A-A ha sido eliminado de estas colonias. Uno de estos clones se retuvo y se propagó dos veces en medio KMB sólido sin antibióticos, obteniéndose una cepa sin los vectores pRKA7 y pKMAG-AA, a la cual se denominó ΔpA .

ΔpA es, después de RW60, la segunda cepa Pph descrita hasta ahora, curada del plásmido que contiene la PAI.

3.3.4 p1448A-A interviene en la virulencia de Pph 1448A pero no es esencial en la producción de la enfermedad

Debido a que la presencia de plásmidos puede contribuir a la supervivencia de las bacterias, primero se analizó la capacidad de crecimiento de la cepa ΔpA frente a la de la cepa silvestre, tanto en medio rico como en medio mínimo (Figura 13).

Ambas cepas mostraron una curva de crecimiento similar, aunque en medio mínimo, ΔpA llegó a valores mayores de DO₆₀₀. Esto podría deberse, precisamente por no contener p1448A-A, ya que la replicación de los plásmidos para asegurar su herencia en las células hijas supone un gasto energético para la bacteria, el cual aumenta cuanto mayor sea el tamaño de estos (Guynet & de la Cruz, 2011). Con esta prueba se asegura, que los resultados que se obtengan en posteriores análisis en patogénesis, no serán dependientes de la capacidad de la bacteria para duplicarse.

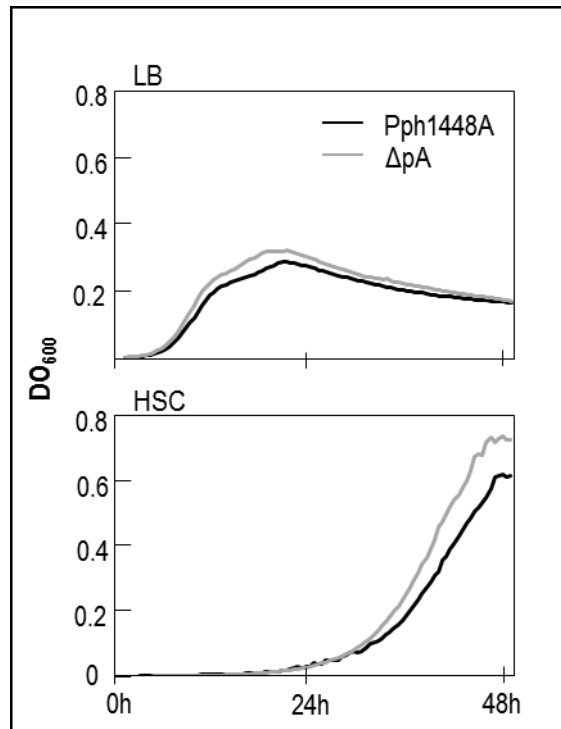


Figura 13. Dinámica de crecimiento (DO_{600}) de Pph1448A y su derivada curada de p1448A-A, ΔpA . Se partió de un inoculo de inicio de DO_{600} 0.01 tanto en LB (medio rico Luria-Bertani) como en HSC (medio mínimo Hoitink y Siden modificado). Las células se cultivaron en placas de 48 pocillos a 28 °C en agitación. Las lecturas se obtuvieron cada 30 minutos de seis réplicas biológicas.

Para observar el efecto de la pérdida de los T3Es del plásmido p1448A-A en la virulencia o la patogénesis de Pph 1448A, se inocularon suspensiones bacterianas a 10^5 ufc/ml y 10^7 ufc/ml de Pph 1448A y ΔpA , en vainas de la cv. Helda. Solo en el caso de bajas densidades poblacionales, ΔpA mostró un fenotipo diferencial con respecto a la cepa silvestre, manifestado por la aparición de pequeñas manchas rojizas (Figura 14). Este resultado indicó que, a pesar de la pérdida de los T3Es del plásmido, la bacteria aún posee los elementos necesarios para producir la enfermedad, aunque para ello, debe encontrarse en un a alta densidad poblacional.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la presencia de la PAI en RW60 mostró ser esencial en la patogénesis de la bacteria (Jackson et al., 1999), sin embargo, los resultados obtenidos en vainas cv. Helda, parecen indicar que no ocurre lo mismo en ΔpA . Para realizar una comparativa más precisa entre ambas cepas, se decidió inocular ΔpA , RW60, y sus respectivas cepas silvestres, en vainas y hojas de judía de las variedades Canadian Wonder (cv. CW) y Tendergreen (cv. TG), ya que RW60 induce una respuesta hipersensible (HR) en estas variedades.

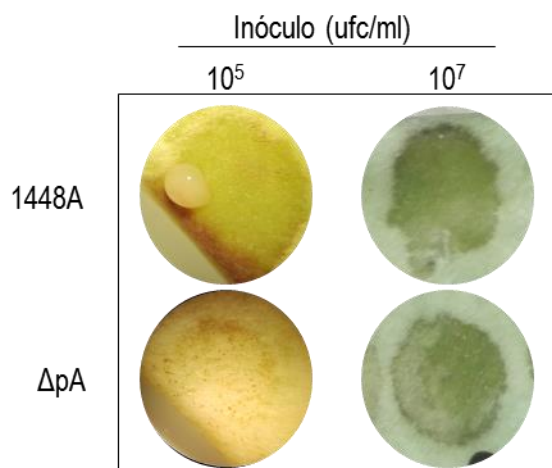


Figura 14. Contribución en la virulencia de los T3Es del plásmido p1448A-A en la cepa Pph 1448A (raza 6). Se inocularon las cepas 1448A y ΔpA a dos densidades poblacionales diferentes en vainas de judía cv. Helda. ΔpA, es una cepa derivada de la cepa 1448A sin el plásmido p1448A-A. Las fotos de los síntomas se tomaron entre 4 y 6 días post-inoculación

En vaina de ambas variedades, RW60 causa una característica HR, mientras que ΔpA, si bien en cv. TG induce claros síntomas de enfermedad (*water soaking*), en cv. CW, a pesar de que comienza mostrando síntomas de enfermedad, a los cuatro días de inoculación acaba mostrando en los bordes un ligero halo de color marrón. Esto podría ser indicio de una posible inducción de la HR en fases tardías (Figura 15).

Estos resultados obtenidos en vaina difieren a los obtenidos en las inoculaciones en hoja. Así pues, en cv. CW, ΔpA y RW60 no muestran apenas diferencias fenotípicas y ambas cepas inducen HR. En cv. TG, ΔpA visualmente no induce síntomas tan claros como en vaina, y parece causar o una infección leve, o una HR leve con respecto a RW60, la cual muestra una HR más clara (Jackson et al., 1999).

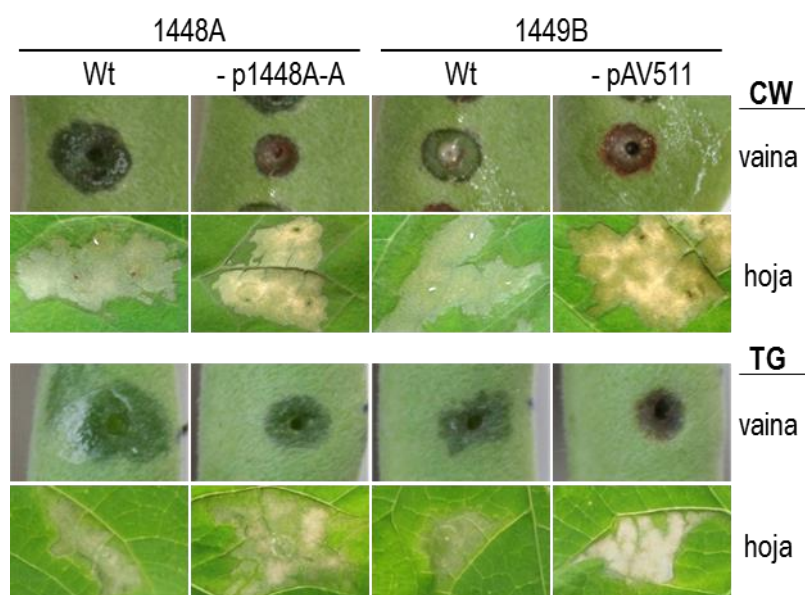


Figura 15. El plásmido nativo que contiene la PAI contribuye de forma diferente a la virulencia de la cepa 1449B (raza 7) y de la cepa 1448A (raza 6). Se inocularon vainas y hojas de dos variedades de judía con cuatro cepas diferentes de *P. syringae* pv phaseolicola. -p1448A-A es ΔpA , cepa derivada de 1448A sin el plásmido p1448A-A. -pAV511 es RW60, cepa derivada de 1449B sin el plásmido pAV511. Las cepas se inocularon pinchando vainas con masa celular, mientras que en hoja se infiltraron suspensiones bacterianas de 10^8 ufc/ml. Las fotos fueron tomadas a las 96 horas post-inoculación. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas biológicas en cada uno. RW60 (-pAV511) induce una HR en ambas variedades, mientras que ΔpA (-p1448A-A) produce enfermedad o HR leve. CW, variedad de judía Canadian Wonder; TG, variedad de judía Tendergreen.

Estas observaciones fenotípicas se acompañaron con datos de recuento poblacional en hoja (Figura 16), los cuales mostraron que, tanto en cv. CW como en cv. TG, ΔpA y RW60 presentan poblaciones significativamente menores que sus respectivas cepas silvestres. Así mismo el recuento de poblaciones de RW60 fue menor que el de ΔpA , lo que parece indicar que RW60 puede inducir una HR más agresiva que ΔpA .

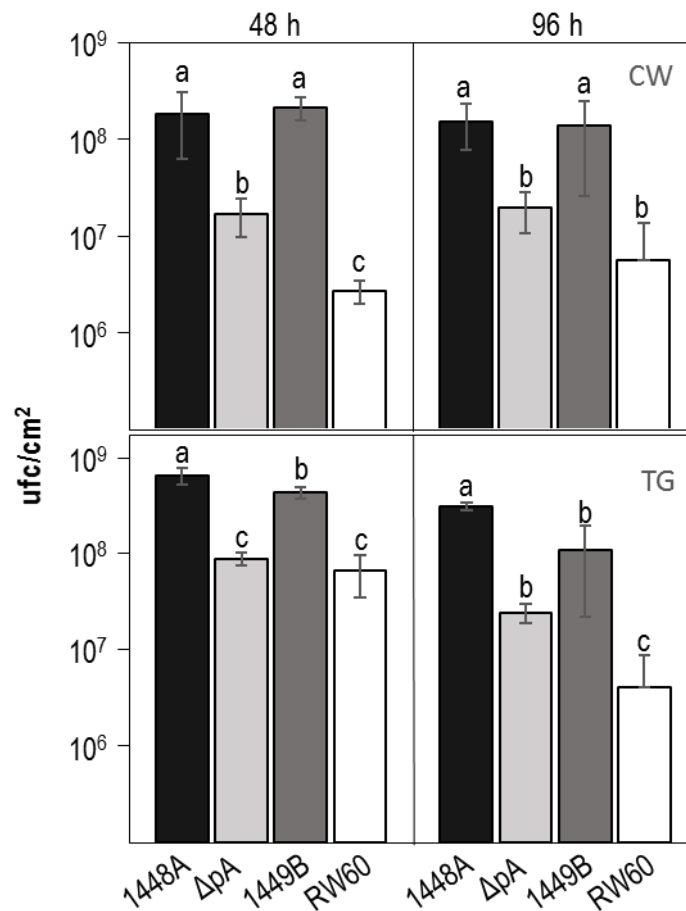


Figura 16. Dinámica de poblaciones de *P. syringae* pv *phaseolicola* en planta. Se infiltraron suspensiones bacterianas a 10^8 ufc/ml en hojas de dos variedades diferentes de judía. Se obtuvo dos discos de material vegetal, de 0.6 cm de diámetro, por planta y por cepa, para el conteo de poblaciones. La media y desviación típica corresponden a un ensayo con tres réplicas biológicas. Se realizaron análisis estadístico Anova y test de Duncan (p -value \leq 0.05), y las diferencias significativas se representan con letras diferentes. CW, variedad de judía Canadian Wonder; TG, variedad de judía Tendergreen.

3.3.5 Las cepas ΔpA y RW60 sólo se diferencian en la secuencia de aminoácidos de tres efectores cromosómicos

Para entender las diferencias encontradas en la producción de síntomas en planta entre las cepas RW60 y ΔpA, se secuenció el genoma de RW60 y se realizó una comparativa de secuencias genómicas de T3Es. El análisis mostró, que ambas cepas contenían en su cromosoma el mismo número de genes T3Es, y únicamente mostraban alelos diferentes para tres de ellos, *hopX/avrPphE*, *hopV1* y *hopAE1*. Las diferencias entre estos alelos se deben al cambio de uno o dos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (Figura 17)

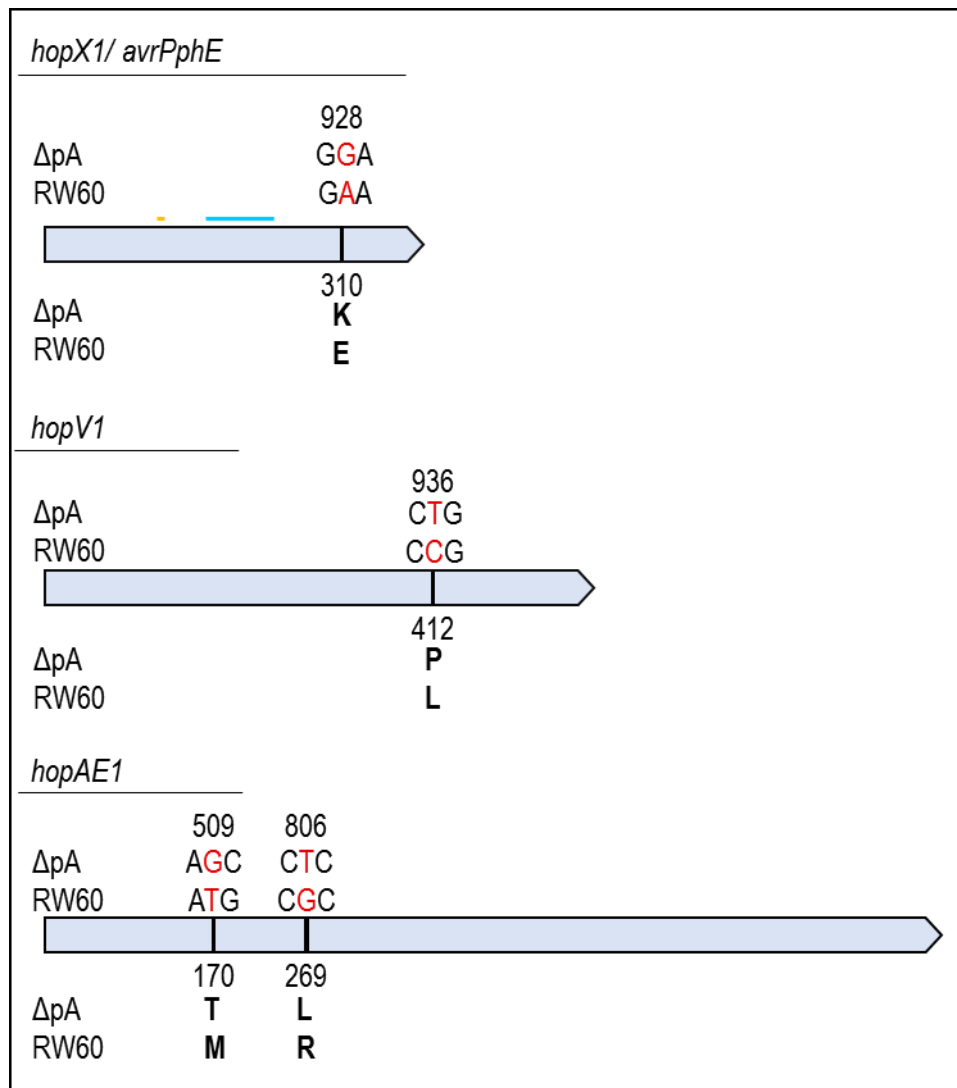


Figura 17. Representación a escala de los genes de los efectores cromosómicos diferentes entre ΔpA y RW60. En rojo se marcan las bases diferentes entre cepas. Las letras en negrita corresponden a los aminoácidos lisina (K); ácido glutámico (E); prolina (P), leucina (L); treonina (T); metionina (M); arginina (R). En número se indica la posición del nucleótido o aminoácido diferencial entre ambas cepas. Para *hopX1*, las líneas naranja y azul marcan el dominio A y el dominio catalítico, respectivamente, altamente conservados en diversos patovares de *P. syringae*.

En el caso de AvrPphE, el aminoácido en la posición 310, derivaba de una lisina (K) en ΔpA , a un ácido glutámico (E) en RW60. En HopV1, cambia el aminoácido en la posición 410, de una prolina (P) en ΔpA , a una leucina (L) en RW60. Por último, HopAE1 presenta dos cambios de aminoácido, el primero en la posición 170, de una treonina (T) en ΔpA , a una metionina (M) en RW60, y el segundo cambio, se produce en la posición 269, de una leucina (L) en ΔpA , a una arginina (R) en RW60 (Figura 17). Se desconoce si las diferencias observadas afectan a algún dominio importante para la funcionalidad o translocación de los efectores.

3.3.6 El alelo *AvrPphE* de la cepa RW60 reduce la virulencia de ΔpA

Para comprobar, cuál de los T3Es diferenciales entre ΔpA y RW60, pudiera ser el causante de las diferencias fenotípicas entre ambas cepas, los alelos *avrPphE*, *hopV1* y *hopAE1* de RW60 se transfirieron a ΔpA . Para ello, se clonaron estos genes con su respectivo promotor (Figura 18) en el vector pME6041. Puesto que *avrPphE* se localiza junto a *hopY*, posiblemente bajo la expresión de un mismo promotor, ambos genes se clonaron juntos.

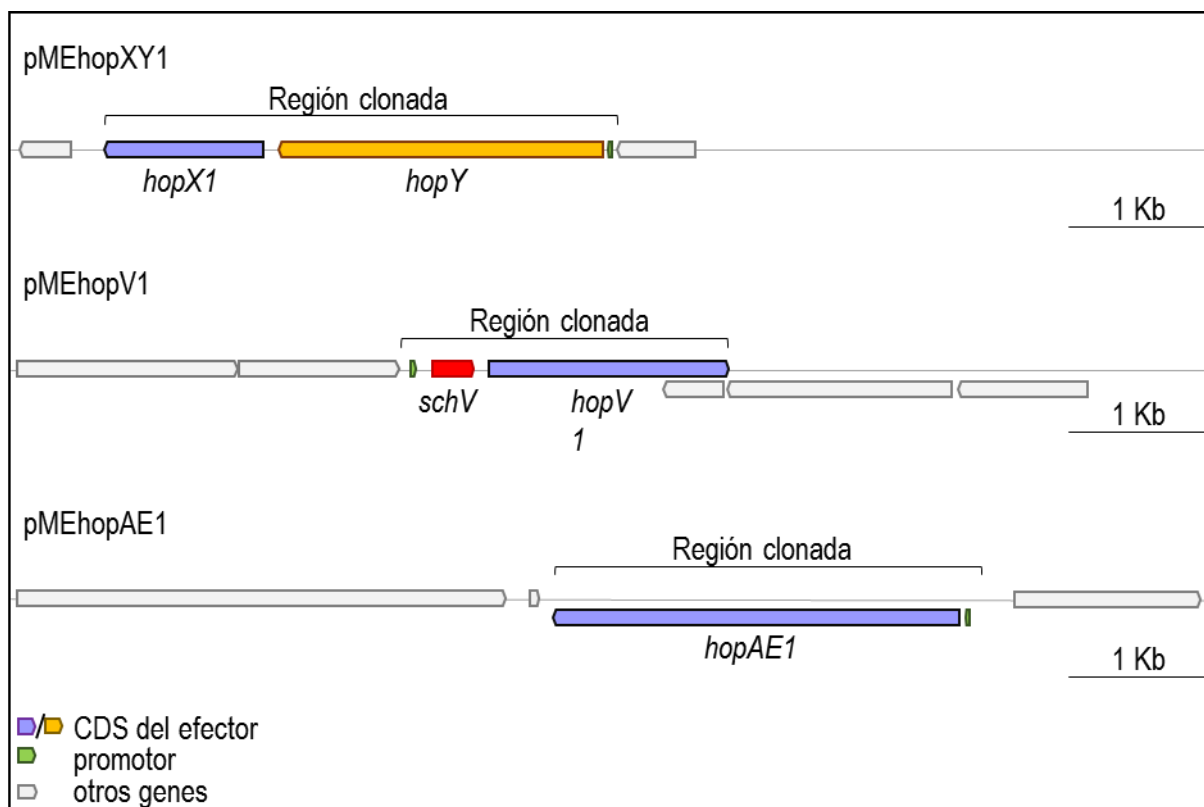


Figura 18. Representación a escala del contexto genético de los T3Es diferenciales entre ΔpA y RW60. Se amplificó una región que contuviera la CDS del efector en cuestión junto a su promotor, y esta se clonó en el vector pME6041.

El vector pME6041 es un vector que no presenta un promotor asociado a la región múltiple de clonaje y se encuentra en un bajo número de copia. Esto lo hace ideal para analizar genes que solo se deben expresar bajo determinadas condiciones, como los T3Es. De esta forma se evita, en la medida de lo posible, los efectos indeseados derivados bien por la sobreexpresión de dichos genes, o bien por la expresión de estos cuando no se precisan (Heeb et al., 2000). Finalmente, se obtuvieron tres cepas derivadas de ΔpA , con los alelos *avrPphE*, *hopV1* y *hopAE1* de RW60 ($\Delta pA_{hopYX60}$, $\Delta pA_{hopV160}$, $\Delta pA_{hopAE160}$) (Tabla S1) y se realizaron ensayos de patogenicidad y virulencia, en vainas de cv. CW y TG.

Independientemente de la variedad de judía, $\Delta pA_{hopV1_{60}}$ y $\Delta pA_{hopAE1_{60}}$ no se diferenciaron fenotípicamente de la cepa parental en ninguno de los ensayos. En cambio, $\Delta pA_{hopYX_{60}}$ si presentó variaciones fenotípicas. Con una frecuencia 1/10 se observaron la formación de áreas ligeramente marrones, similares a la inducción de una HR leve, mientras que con una frecuencia 7/10 indujo síntomas más atenuados que la cepa parental (Figura 19). Aun así, ninguna de las cepas ensayadas presentó un fenotipo semejante al mostrado por RW60.

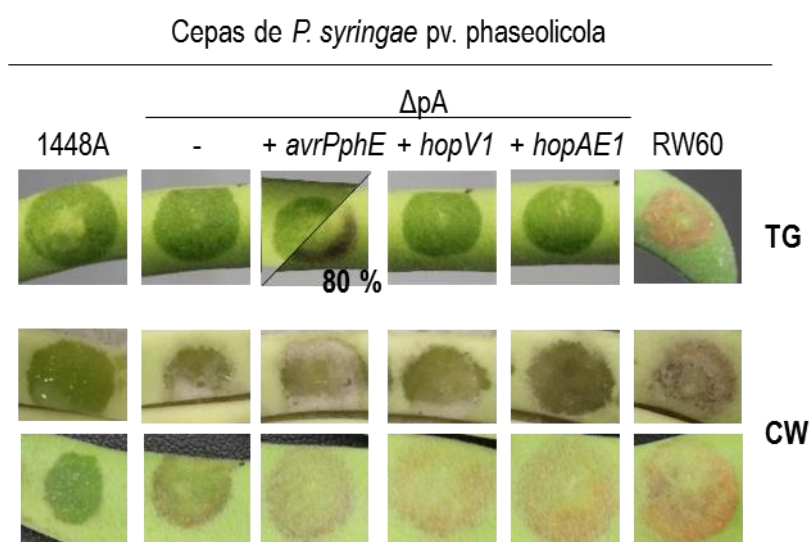


Figura 19. Síntomas en vainas de Tendergreen y Canadian Wonder de las cepas derivadas de ΔpA con los alelos *avrPphE* ($\Delta pA_{hopYX_{60}}$), *hopV1* ($\Delta pA_{hopV1_{60}}$) y *hopAE1* ($\Delta pA_{hopAE1_{60}}$) de RW60. Las vainas de la variedad Canadian Wonder (CW) y Tendergreen (TG) fueron inoculadas con suspensiones bacterianas de 10^7 ufc/ml. Los síntomas se observaron a los 6 días post-inoculación.

3.4 Discusión

El repertorio de efectores T3Es de un patógeno contribuye de forma conjunta a la virulencia de este. La presencia o ausencia de determinados T3Es puede influir en el espectro de huésped del patógeno, e incluso determinar la clasificación de un patovar en razas (O'Brien et al., 2011; Lindeberg et al., 2012). Pph se clasifica en 9 razas, definidas por la presencia o ausencia de cinco genes de avirulencia (*avr*) (Taylor et al., 1996). Pph 1448A pertenece a la raza 6, raza considerada más virulenta por su capacidad de producir enfermedad en todas las variedades diferenciales de judía analizadas hasta ahora. Esta raza no contiene ninguno de los genes *avr* conocidos y caracterizados hasta ahora que definen las razas Pph, a excepción de *avrPphE*. En Pph 1448A este gen presenta una mutación, con el consecuente cambio de un aminoácido en su secuencia que permite no inducir HR en aquellas variedades de judía que presentan el gen de resistencia *R2* (Mansfield et al., 1994; Stevens et al., 1998; Chang et al., 2005).

Pph 1448A contiene en total 33 T3Es, 11 de ellos localizados en su plásmido mayor p1448A-A (Tabla 2) (Chang et al., 2005; Vencato et al., 2006). Cuatro de estos T3Es plasmídicos, se localizan en una isla de patogenicidad (PAI), presente también en plásmidos de otras razas Pph. Hasta ahora, la contribución a la virulencia por parte de los T3Es de Pph 1448A, solo se ha ensayado mediante la construcción de mutantes simples (Zumaquero et al., 2010; Macho et al., 2012) (Tabla 2). A excepción de una cepa con mutaciones en el efector *hopR1*, ninguno de los mutantes obtenidos en estos trabajos mostró cambios en la producción de síntomas en planta (Macho et al., 2012). Esto puede deberse a que generalmente los T3Es presentan funciones redundantes, y que solo existe un reducido número de T3Es esenciales para la patogénesis (Lindeberg et al., 2012). Así pues, para observar cambios en la virulencia o patogénesis de la cepa Pph 1448A, puede que se requiera la eliminación de un número relevante de T3Es, como ocurre en Pph 1448B y su cepa derivada sin el plásmido pAV511, RW60.

Durante el proceso de la obtención de ΔpA , se obtuvieron cepas con formas delecionadas de p1448A-A, las cuales habían perdido una cantidad variable de T3Es. Algunas de estas cepas, UPN1335, UPN1337 y UPN1338 (Tabla 5), habían perdido la PAI entera. La PAI se caracterizó por primera vez en la cepa Pph1449B, localizada en el plásmido pAV511, gracias a la obtención de RW60 (Jackson et al., 1999; Tsiamis et al., 2000; Rivas et al., 2005). Esta PAI contiene los genes *avrPphF*, *avrPphC*, *virPphA*, *hopAW1* y *hopAY1*, pero la PAI presente en p1448A-A presenta una deleción de 9 kb, con la consecuente ausencia de *avrPphF* (Rivas et al., 2005). RW60 es una cepa que pierde la capacidad de producir enfermedad en variedades de judía susceptibles a la cepa silvestre, y a su vez, no induce una HR en plantas no huésped de Pph 1449B, como la soja (*Glycine max* cv. Osumi) (Jackson et al., 1999). Con esta cepa se demostró que la PAI era esencial para la patogénesis de Pph1449B y que los T3Es *virPphA*, *avrPphC* y *avrPphF* eran determinantes en su espectro de huésped (Jackson et al., 1999; Tsiamis et al., 2000). Sin embargo, en nuestros resultados, ninguna de las cepas obtenidas con formas delecionadas de p1448A-A mostró cambios en la producción de síntomas, incluida UPN1335, que únicamente mantenía dos T3Es plasmídicos. Finalmente, con la obtención de la cepa ΔpA se observó que la pérdida de la PAI así como del resto de T3Es de p1448A-A, no tiene la misma repercusión en Pph 1448A como en Pph 1449B. ΔpA no manifiesta un fenotipo diferencial en vainas de la cv. Helda con respecto a la cepa silvestre, salvo cuando se inocula con densidades poblacionales bajas, de 10^5 ufc/ml, en cuyo caso no produce enfermedad. Esto puede deberse, sobre todo, a la ausencia de *avrPphC*, *virPphA* y *hopAU1*, ya que la mutación simple de estos T3Es en Pph 1448A mostró que eran necesarios para la duplicación del patógeno durante el proceso infectivo (Macho et al., 2012). Igualmente, estos resultados pondrían de manifiesto que el plásmido p1448A-A contribuye a la virulencia de la cepa Pph 1448A, pero no parece ser necesario para la patogénesis de esta. Aun así, para

realizar una comparativa más precisa entre RW60 y ΔpA , se decidió inocular ambas cepas con sus respectivas cepas silvestres, en las variedades de judía CW y TG, donde según Jackson et al. (1999), RW60 induce la HR.

En vainas de ambas variedades de judía se presentaron diferencias fenotípicas entre RW60 y ΔpA , aunque estas se difuminan cuando las cepas son inoculadas en hoja, sobre todo en cv. CW. Es además en esta variedad, donde ΔpA parece inducir una reacción más fuerte de la defensa de la planta. Con todo, las poblaciones bacterianas obtenidas de RW60 indicarían que esta cepa induce una HR más agresiva que ΔpA en ambas variedades de judía. Teniendo en cuenta estos resultados, tanto fenotípicos como el recuento de poblaciones bacterianas, estos no nos permiten esclarecer hasta qué punto la pérdida de p1448A-A interviene en la patogénesis y rango de huésped de Pph 1448A. Sin embargo, las diferencias observadas entre las cepas sin plásmido, sugieren la existencia de otros efectores que pudieran estar interviniendo. En RW60, se demostró que los T3Es *avrPphF*, *avrPphC* y *virPphA*, parecen actuar enmascarando el reconocimiento de algún efector cromosómico por parte de las proteínas R del huésped (Jackson et al., 1999; Tsiamis et al., 2000). En concreto, se ha descrito genes ortólogos de *virPphA* en diferentes patovares de *P. syringae* que actúan suprimiendo las defensas de diferentes especies de plantas (Jackson et al., 1999; De Torres et al., 2006). HopAB2 (AvrPtoB) de *P. syringae* pv. tomato DC3000 contiene un dominio de E3 ubiquitina ligasa en el C-terminal de la proteína (Janjusevic et al., 2006). Este dominio se encarga de promover la degradación de la proteína quinasa Fen de la planta, evitando así el reconocimiento del dominio N-terminal del efector por esta misma proteína, y se produzca la activación de las defensas de la planta (Rosebrock et al., 2007). De la misma forma, VirPphA contiene un putativo dominio E3 ubiquitina ligasa en el C-terminal (Macho et al., 2012).

Las interacciones entre proteínas Avr y proteínas R, suelen ejercer una presión de selección negativa sobre los efectores *avr*, lo cual puede inducir a la pérdida directa del efector, o a un cambio en su estructura proteica, evitando así el reconocimiento del efector (Ma & Guttman, 2008). Por ello, se decidió realizar una comparativa de los genomas de ΔpA y RW60. Con este análisis se identificaron alelos diferentes para tres efectores *avrPphE*, *hopV1* y *hopAE1*. Las diferencias observadas se deben al cambio de un solo nucleótido, que se traduce en la diferencia de uno (*avrPphE* y *hopV1*) o dos aminoácidos (*hopAE1*). Los alelos de RW60 de estos tres efectores, fueron clonados y transferidos de forma independiente a la cepa ΔpA , y se comprobó su comportamiento en vaina. Tan solo la cepa $\Delta pAhopYX_{60}$, que contenía el gen de *avrPphE* mostró un claro fenotipo diferencial con respecto a ΔpA ; la cual mostraba o una inducción de la HR débil, o una virulencia disminuida, lo cual se repetía con una frecuencia del 80 %.

avrPphE es un gen descrito en judía de avirulencia, ya que induce una HR en aquellas variedades que presentan el gen de resistencia *R2*. Este gen se describió por primera vez en la raza 4 de Pph (Mansfield et al., 1994), y está presente en todas las razas Pph. A su vez otros patovares de *P. syringae* (*P. syringae* pv. *glycinea* *P. syringae* pv. *tomato*) presentan genes homólogos e incluso se han descubierto genes homólogos en bacterias filogenéticamente menos relacionadas con *P. syringae*, como *Ralstonia solanaceum* y *Xanthomonas campestris* (Nimchuk et al., 2007). Su amplia distribución sugiere que este efector tendría un papel importante en la virulencia para un amplio rango de huésped. A pesar de estar este gen presente en todas las razas de Pph, solo en las razas 2, 4, 5 y 7, induce HR en las variedades de judía con el gen *R2* (Taylor et al., 1996). Este efector se caracteriza por presentar dos dominios responsables del reconocimiento del efector en la planta, un dominio A y un dominio catalítico. Este último es muy similar a los dominios catalíticos de la familia de enzimas cisteínas proteasas, las cuales median la escisión proteolítica de proteínas vegetales, y pertenecen a la superfamilia de las transglutaminasas (Makarova et al., 1999), por lo que este dominio podría ser responsable de la funcionalidad del efector en huéspedes susceptibles. La región del dominio C-terminal, es la región que más varía entre los alelos de *avrPphE* presentes en el complejo *P. syringae*, lo que sugiere que dicha región pudiera estar determinando la diferencia de especificidad del efector (Nimchuk et al., 2007).

Generalmente, el reconocimiento de efectores por parte de la célula huésped no es “un todo o nada”, y pequeños cambios en la estructura proteica de los efectores, puede inducir a un reconocimiento lo suficientemente débil, que no permita la correcta señalización de la respuesta defensiva (Nimchuk et al., 2007). *AvrPphE* es un efector que en las diversas razas de Pph ha sufrido pequeños cambios en su secuencia de aminoácidos y se ha demostrado que son suficientes para que no se induzca la HR (Stevens et al., 1998). Los cambios de aminoácido producidos en las razas 1 y 9 afectan al dominio catalítico (Stevens et al., 1998; Nimchuk et al., 2007), mientras que en la raza 6, como Pph 1448A, se produce en el dominio C-terminal, por lo que alguno autores teorizan que en esta región debe contener residuos que participen igualmente en la inducción de la HR (Nimchuk et al., 2007). Esto podría explicar en parte las diferencias encontradas entre RW60 y ΔpA . Aun así, el fenotipo mostrado por la cepa $\Delta pAhopYX_{60}$ en los ensayos en vaina no era similar al que mostró la cepa RW60, lo cual lleva a sospechar, que la HR inducida por RW60 no se deba a la acción exclusiva de *avrPphE* sino también a la participación de otros factores, como podría ser, la posible acción conjunta entre este y otro, u otros, de los efectores estudiados. En principio, se podría sospechar de la acción conjunta entre los efectores *avrPphE* y *hopAE1*, ya que *hopV1* parece no translocarse en Pph (Chang et al., 2005).

En experimentos futuros se espera conseguir cepas derivadas de RW60 que contengan los genes de *avrphE*, *hopV1* y *hopAE1* deleccionados, bien de forma independiente o en conjunto, que ayuden a determinar cual o cuales de estos T3Es están participando en la inducción de la HR en RW60, y por consiguiente en Pph 1449B.

3.5 Material Suplementario

Tabla S1. Cepas y plásmidos usados en este trabajo

Cepas o plásmidos	Características	Referencias
<i>Escherichia coli</i>		
NEB10 β	$\Delta(mrr-hsdRMS-mcrB)$ <i>deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta(ara, leu)$7697 <i>galU galK</i> $\lambda^- rpsL nupG$</i>	(Grant et al., 1990)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>		
1448A	Patógeno de judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>), que contiene dos plásmidos nativos (p1448A-A y p1448A-B); raza 6	(Joardar et al., 2005)
1449B	Patógeno de judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>), aislado de <i>Lablab purpureus</i> , que contiene dos plásmidos nativos (pAV511 y pAV512); raza 7	(Taylor et al., 1996)
RW60	Cepa derivada de Pph 1449B curada del plásmido pAV511	(Jackson et al., 1999)
UPN974	1448A con p1448A-A::Tn5-GDYN1-1	L. Bardaji
UPN1141	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 30 kb	Este trabajo
ΔpA	Pph1448A sin el plásmido p1448A-A. Cepa derivada de UPN1141, curada de p1448A-A	Este trabajo
UPN1194	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 101 kb	Este trabajo
UPN1195	Pph1448A sin el plásmido p1448A-A. Cepa derivada de UPN1194, curada de p1448A-A	Este trabajo
$\Delta pAhopYX_{60}$	ΔpA con la construcción pMEhopYX60	Este trabajo
$\Delta pAhopV1_{60}$	ΔpA con la construcción pMEhopV60	Este trabajo
$\Delta pAhopAE1_{60}$	ΔpA con la construcción pMEhopAE60	Este trabajo
UPN1334	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 110 kb	Este trabajo
UPN1335	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 45 kb	Este trabajo
UPN1336	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 82 kb	Este trabajo
UPN1337	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 82 kb	Este trabajo
UPN1338	UPN974 con p1448A-A deletado; tamaño aprox. 108 kb	Este trabajo

Plásmidos		
p1448A-A::Tn5-GDYN1-1	Plásmido mayor (132 kb) de Pph 1448A-A (NC_005773) con el transposón Tn5-GDYN1 (Km ^R) insertado en la posición 98644	L. Bardaji
pA7 ^a	Construcción artificial que contiene siete posibles genes de antitoxinas de p1448A-A concatenados en el vector pCC1BAC; CI ^R (coordenadas de cada antitoxina: 59441-59765,29724-30013,42653-43054,82274-82672,89866-90182,122137-122548,126603-127061)	Este trabajo
pJET1.2	Vector de clonación de <i>Escherichia coli</i> de 2.9 kb, Amp ^R	Thermo Fisher Scientific
pKMAG	Vector de clonación de 2.6 kb, Km ^R	(Bardaji et al., 2017)
pKMAG-AA ^a	Fragmento plasmídico (coordenadas 131834 -1655) que contiene el replicón de p1448A-A, clonado en el vector pKMAG	Este trabajo
pME6041	Vector de clonación de amplio espectro de 5.6 kb, Km ^R	(Heeb et al., 2000)
pMEhopYX60	Genes <i>hopX1</i> y <i>hopY</i> de RW60 clonados, con su propio promotor en el vector pME6041	Este trabajo
pMEhopV60	Gen <i>hopV1</i> de RW60 clonado, con su propio promotor en el vector pME6041	Este trabajo
pMEhopAE60	Gen <i>hopAE1</i> de RW60 clonado, con su propio promotor en el vector pME6041	Este trabajo
pRK415	Vector de clonación de amplio espectro de 10.5 kb, Tc ^R	(Keen et al., 1988)
pRKA7	Fragmento de ADN con las siete posibles antitoxinas (pA7), clonado en el vector pRK415	Este trabajo

^a las coordenadas indicadas corresponden a nucleótidos de p1448A-A (NC_005773).

Tabla S2. Cebadores usados en este trabajo

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3') ^a	Posición 5' ^b	Aplicación
Caracterización de los fragmentos plasmídicos			
1. Efectores			
HopW1_F	TGCTTCCCCCATTTCATTCCC	6675* 63445*	Amplificación del gen <i>hopW1-1</i> y <i>hopW1-2</i>
HopW1_R	AACGGCTGGGTCTTTCTCTC	6461 63231	
HopD1_F	TCATGTGCTCCCACGATCAC	8110	Amplificación del gen <i>hopD1</i>
HopD1_R	GCCGTTGACAATCGCAGATC	9150*	
HopQ1_F	TTACACAAGCCCCGGTTACC	10480*	Amplificación del gen <i>hopQ1</i>
HopQ1_R	TGTGCTGCTTCAATCTGTGC	9657	
HopAU1_F	CGGTGTCGGAGTACATGGTC	27847	Amplificación del gen <i>hopAU1</i>
HopAU1_R	AATGTCTCCAGGCTCGTTGG	28444*	
HopAV1_F	TTGTGTCCACTACCGTTCCG	46883	Amplificación del gen <i>hopAV1</i>
HopAV1_R	GCGTGATCTTCGTAACGTC	47309*	
AvrRps4_F	CTTCAGTTACTCGGCCCTG	76620*	Amplificación del gen <i>avrRps4</i>
AvrRps4_R	TGGCTATCTCGGCTTGTTG	76088	
DL-04523	GTAATCGAGTCGCCGCTCTG	96979	Amplificación del gen <i>avrD1</i>

DR-04523	GAAAGTGAAGCGAACGCAAG	97672*	Amplificación del gen <i>avrD1</i>
CL-19541	GATCGTAAGAACGGGCGATT	102390	Amplificación del gen <i>avrPphC</i>
CR-20852	CGTGCCATGGTAGCATGTATGAA	103701*	
ORF3a	AGGGTCGCTCTATGTCTGC	105226	Amplificación del gen <i>hopAW</i>
ORF3b	GTGAGAGTATCAAACACTTTGC	105470*	
VIRAL-24776	GATTGAGGCTCTGCTTC	107636	Amplificación del gen <i>virPphA</i>
VIRAR-25329	GACTCATCATCAGGAAGC	108189*	
PphORF4-L	CGCTAGACCCTCGAACAGTC	110760	Amplificación del gen <i>hopAY1</i>
PphORF4-D	CACACGCTGAATAACCATGC	111636*	
XopAB_p1448A_A_F	ATCACAACTTGGGCCACGTC	119180*	Amplificación de la copia del gen <i>xopAB</i> en el p1448A-A
XopAB_p1448A_A_R	GGCAGACTCAAACGCTCAC	117754	

2. Otros genes o regiones

repA_p1448A-A_532	GAACGGTGGACTTATGG	423	Amplificación del replicón del plásmido p1448A-A
repA_p1448A-A_3022	GGCAGCATCAGCGTTTCTC	3002*	
repA-ext_F	TCTATTGCCACGGACCTTCC	131557	
rsmH3_F	CACGAGAAAAGACAGGTCCAC	5638*	Amplificación del gen <i>rsmH-1</i> y <i>rsmH3-2</i>
rsmH3_R	AGCGAAATACCCACGGAAG	62408*	
		4950	
		61720	
hopD1_PA_rev	AGGCGTTCTAGAGCCTGGTG	7304*	Con rsmH3_R, amplificación de la copia 1 de <i>rsmH3</i>

PPh_A0076_Fw	CGAACGCATTTACCAAGATG	63824*	Con rsmH3_R, amplificación de la copia 2 de <i>rsmH3</i>
anti-toxinA0035_F	TGAGAACGACCGTCACCATC	29923*	Amplificación del sistema TA2
anti-toxinA0034_R	CTAACGTCCAAAGCGCTGTG	29412	
rsmH2_F	GGTGCTGTGCCAGAAATACC	91601*	Amplificación del gen <i>rsmH2</i>
rsmH2_R	TACTGCGCGGCTATGTAATG	90879	
stbB.C_F	GGATCCGCTGCGGTTCTGAAATTACG	121978	Amplificación del sistema TA6
comp_tn7_rev	TGATAAATCATGGCCTATCTGG	122507*	
PSPPH_A0140_F	AGGGCATCATCATGAGCGAG	124979*	Amplificación de la región 124235-124979
PSPPH_A0140_R	GATCAGAGACAGTGGCCGAG	124235	
PSPPH_A0143_F	TGAGCAACCCACGTTATCCC	127166	Amplificación de la región 127166-127668
PSPPH_A0143_R	ATGAGGGCAATCAGGAACGG	127668*	
PSPPH_A0145_F	TCCAGTTTCACGACAGTCCG	129274	Amplificación de la región 129274-129978
PSPPH_A0146_R	TTGGCCGGGTTCTTG TAGTC	129978*	

Clonación del replicón del plásmido A

RepA_p1448A_A_F	<u>ACTAGTTC</u> ATTGCGGACAGTGAGTTC	131834
RepA_p1448A_A_R	<u>ACTAGT</u> ACTGCCTGGTCGCAATTAAC	1655*

Clonación del pA7

pA_seven_Fw	aaaacgacggccagtgaattg	Anillan en el vector pCC1
pA_seven_Rev	atcGGATCCCGGGTCGACtcatggcgccaacc	
Clonación de <i>avrPphE</i> de RW60^c		
HopX1_F1_KPN	ataGGTACCggtgcaattgaagcagcag	3011839*
HopX1_R_FLAG_KPN	ataGGTACCtcaCTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCtcttcgtaggagcatgc	3008185
Clonación de <i>hopV1</i> de RW60^c		
HopV1_F_BHI	ataGGATCCtattctggagttgccggtct	1705810
hopV1_R_FLAG_KPN	ataGGTACCtcaCTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCttgcagcatcaacatccattg	1708109*
Clonación de <i>hopAE1</i> de RW60^c		
HopAE1_F_EI	ataGAATTCtcgatgtgttcttctgacg	2459638*
HopAE1_F_FLAG_EI	ataGAATTCtcaCTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCtggctcgccagccgct	2456469
Otros		
IS50_F	ACACAGATTTAGCCCAGTCCG	Anilla en Tn5GDYN1
comp_tn4_R	CAAAGCCGCCAGTTTTACCC	Comprobación del posicionamiento de Tn5GDYN1 98307

^a El subrayado indica la introducción de un sitio SpeI, BamHI, KpnI o EcoRI en los cebadores, para facilitar la clonación

^b Para cada cebador, se indican las coordenadas del nucleótido de anillamiento en el p1448A-A (NC_005773). Los asteriscos indican que el cebador anilla en la hebra complementaria de la molécula de ADN

^c Las coordenadas indicadas para estos cebadores, indican el anillamiento del nucleótido en el cromosoma de RW60

^d Las letras representadas en mayúsculas indican la inserción de una secuencia para la codificación de un FLAG

4 Capítulo II

Two homologues of the global regulator *csr/rsm* redundantly control phaseolotoxin biosynthesis and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A

El contenido de este Capítulo se recoge íntegramente en la publicación Ramírez-Zapata, D., Ramos, C., Aguilera, S., Bardaji, L., Martínez-Gil, M., & Murillo, J. (2020). Two homologues of the global regulator *csr/rsm* redundantly control phaseolotoxin biosynthesis and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A. *Microorganisms*, 8(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101536>

4.1 Introduction

The ability of free-living bacteria to respond and adapt to environmental changes relies on various interconnected regulatory networks, from which the Csr/Rsm is one of the most intensively studied post-transcriptional regulatory systems (Heeb & Haas, 2001; Romeo & Babitzke, 2019; Sobrero & Valverde, 2020). This system is widely present and conserved among nearly 3,000 species of bacteria and act as a global regulator of gene expression of hundreds of genes including, among others, those supporting robust growth and a diverse collection of virulence genes in animal and plant pathogens.

The central component of the Csr/Rsm system is CsrA, which is also called RsmA and various other names in different bacteria (Romeo & Babitzke, 2019; Sobrero & Valverde, 2020). For clarity, we will refer collectively to these proteins as Csr/Rsm proteins, and to the corresponding genes as *csr/rsm*, but in the main text we will use the proposed uniform nomenclature for the nine Rsm subfamilies for *Pseudomonas* (Sobrero & Valverde, 2020). Csr/Rsm is a small protein of 50-150 amino acids acting as a homodimer to bind RNAs at a 12 nt sequence containing a highly conserved GGA motif typically included in a stem-and-loop structure. Since its first detailed functional analysis (Baker et al., 2002), Csr/Rsm proteins have generally been associated to translational repression by a variety of mechanisms. Prominently, the Csr/Rsm binding site is often located close to and within the Shine–Dalgarno sequence, so protein binding prevents ribosomal interaction with the mRNA and often leads to destabilization of the downstream RNA. However, Csr/Rsm proteins can also mediate repression by favoring Rho-dependent transcription termination and, conversely, lead to gene activation by exposing the Shine–Dalgarno sequence upon binding to mRNA or by blocking its cleavage by RNase E (Vakulskas et al., 2015). The vast majority of the genomes examined contain a single copy of a *csr/rsm* gene. However, several bacterial lineages, particularly from *Legionella*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, contain two to seven functional *csr/rsm* homologues, which are often carried by mobile genetic elements (Sobrero & Valverde, 2020). The homologues show variable levels of sequence identity, and within *Pseudomonas* can be classified into nine different protein subfamilies plus a group of unassigned proteins. Homologues of RsmA (CsrA2) and RsmE (CsrA3) are present in many, but not all bacteria containing a Csr/Rsm system; members of the other Rsm subfamilies, however, have a rather patchy distribution (Sobrero & Valverde, 2020). Although the exact role of the different homologues is often unclear, some of them were shown to be redundant and/or have unique regulatory roles, which likely provide genetic flexibility and helps to fine-tune the regulatory responses (Marden et al., 2013; Abbott et al., 2016; Huertas-Rosales et al., 2016; Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019).

In *Gammaproteobacteria*, the activity of Csr/Rsm proteins is mainly modulated by various small untranslated regulatory RNAs (sRNA), among which RsmX,

RsmY and RsmZ are the most relevant and intensely studied in pseudomonads (Lapouge et al., 2007). The sRNAs modulating Csr/Rsm proteins are very diverse in length (approx. 100-479 nt) and predicted secondary structure, containing from 5 to 22 potential binding sites including the GGA motif. The sRNAs are thus molecular mimics that act as “protein sponges”(Duss et al., 2014), being able to sequester, store and release up to nine Csr/Rsm dimers (Liu et al., 1997), hence temporarily relieving their regulatory effect by competition with the mRNA target. In fact, they appear to be dedicated solely to sequestration of Csr/Rsm molecules. There is no correlation between the numbers of sRNAs and Csr/Rsm homologues in a given genome and, likewise, the sRNAs do not appear to be specific for each Csr/Rsm homologue (Vakulskas et al., 2015). Nevertheless, the sRNAs contribute to a differential control of the Csr/Rsm system because they show distinct affinities for different Csr/Rsm homologues and because they have distinct expression patterns, which can also change between different bacteria (Sonnleitner & Haas, 2011; Janssen et al., 2018; Ge et al., 2019).

The levels of these small RNAs are in turn regulated by several factors, of which a main activator is the two-component signal transduction system GacS/GacA (global activator of antibiotic and cyanide production) (Heeb & Haas, 2001; Lapouge et al., 2007). This system was first described in *P. syringae* and *P. fluorescens* and shown to participate in virulence, ecological fitness, and antifungal activity, and is widely conserved among *Gammaproteobacteria* (Sobrero & Valverde, 2020). The GacS/GacA signaling is activated by various metabolites, including short-chain carboxylates and citrate, leading to autophosphorylation of the transmembrane sensor histidine kinase GacS, which in turn phosphorylates GacA for activation (Heeb & Haas, 2001; Romeo & Babitzke, 2019). The only known targets of GacA are the genes for the antagonist sRNAs, and so it is assumed that the global regulatory effects of GacS/GacA is entirely mediated via the Csr/Rsm system (Romeo & Babitzke, 2019; Sobrero & Valverde, 2020). Nevertheless, GacS/GacA activates most, but not all of the sRNAs antagonizing Csr/Rsm proteins, whereas Csr/Rsm homologues also interact with other global regulatory systems; therefore, there is not complete overlap between the Csr/Rsm and the GacS/GacA regulons. An important point is that, despite their widespread distribution in bacteria, the signals activating the GacS/GacA–Csr/Rsm systems and the target genes that are concomitantly regulated substantially differ among various bacteria, leading to large variations in the range and intensity of the phenotypes that are ultimately controlled (Lapouge et al., 2007; Sobrero & Valverde, 2020).

Pseudomonas syringae sensu lato includes several gammaproteobacterial species that have been reassigned to at least six different genomospecies, mostly comprising plant pathogens, that are further subdivided into more than 60 pathovars according to characteristic plant host range (Gomila et al., 2017). *Pseudomonas amygdali* pv. phaseolicola (syn. *P. syringae* pv. phaseolicola and

P. savastanoi pv. *phaseolicola*; Pph) belongs to genomospecies 2, comprising five previously named species and 26 pathovars of *P. syringae*. Pph causes economically significant epidemics of halo blight on bean (*Phaseolus vulgaris*) and mung bean (*Vigna radiata*) and is a prominent research model in plant pathology (Arnold et al., 2011; Noble et al., 2019). Pph is ubiquitous and causes severe yield losses in cooler regions (18 °C–22 °C), whereas species of *Xanthomonas* become the prevalent bacterial pathogens in warmer environments, indicating a particular adaptation of Pph to temperature to maximize fitness. Most strains of Pph produce the antimetabolite phytotoxin phaseolotoxin, which inhibits the biosynthesis of arginine and polyamines and leads to the chlorotic haloes typical of the disease (Bachmann et al., 1998; Arrebola et al., 2011). Genes for the biosynthesis of the toxin are thermoregulated, with maximal expression at around 18 °C and negligible expression at 28 °C (Aguilera et al., 2007). A DNA microarray analysis of Pph strain NPS3121 also identified many genes involved in pathogenicity and virulence that were potentially up-regulated at 18 °C (Arvizu-Gómez, Hernández-Morales, Aguilar, et al., 2013). Several pathogenicity and virulence genes depend on the GacS/GacA system in diverse strains of *P. syringae* sensu lato, although there are large variations between the phenotypes affected in different strains (Rich et al., 1992, 1994; Chatterjee et al., 2003; Cha et al., 2012; Zhang et al., 2018). In Pph strain 1448A, the GacS/GacA system was found to contribute mildly to virulence by controlling gene *hrpL*, which is a master regulator for the expression of the type III secretion system (T3SS) and T3SS effector genes (Ortiz-Martín et al., 2010). Importantly, the expression of phaseolotoxin biosynthesis genes appears to be subjected to post-transcriptional repression at 28 °C, because overexpression of *rsmY* in Pph NPS3121 led to phaseolotoxin biosynthesis at this non-permissive temperature (Rowley et al., 2000; Valverde et al., 2003). In fact, the GacS/GacA system was shown to be essential for the expression of phaseolotoxin biosynthesis genes in strain NPS3121 (De la Torre-Zavala et al., 2011), suggesting that this system might contribute to the thermoregulation of virulence genes.

The roles of the Csr/Rsm system have only started to be investigated in strains of *P. syringae* sensu lato. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 contains five *csr/rsm* genes (Ferreiro et al., 2018), and they were shown to contribute to the regulation of relevant roles for the bacterial life cycle, including the interaction with the plant host (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019). Homologues *rsmA* and *rsmE* (also called *csrA2/rsmA2* and *csrA3/rsmA3*, respectively) acted both individually and synergistically for the control of diverse phenotypes, displaying certain regulatory specificities, whereas no major roles could be assigned to the other homologues. However, the role of the Csr/Rsm system has not yet been explored in other members of *P. syringae* sensu lato.

In this work, we identified seven *rsm* gene homologues (*rsmA*, *rsmC*, *rsmE*, *rsmH1*, *rsmH2*, *rsmH3-1*, and *rsmH3-2*) in strain Pph 1448A. We generated mutants of this strain containing single and multiple mutations in its seven *rsm* genes, to evaluate their contribution to virulence and the thermoregulation of toxin genes, as well as to explore their role in regulating phenotypes that may be linked to the GacS/GacA system. Our results indicate that these seven *rsm* genes have a degree of specialization and a differential regulation, revealing the existence of variations in the Csr/Rsm regulatory circuitry with respect to *P. syringae* pv. tomato DC3000. We show that double mutants in genes *rsmA* and *rsmE*, but not individual mutants, show alterations in diverse phenotypes relevant for the life cycle of Pph 1448A, including virulence in bean, motility, metabolism of carbon sources and biosynthesis of the phytotoxin phaseolotoxin.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains and vectors used in this study are detailed in Table 6 and Table S3. *Escherichia coli* and *Pseudomonas* strains were routinely propagated at 37 °C and 25 °C, respectively, using either Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook et al., 1989) or medium B (King et al., 1954). When necessary, media were supplemented with (final concentrations, in $\mu\text{g mL}^{-1}$): ampicillin, 100; gentamicin, 10; kanamycin, 25; spectinomycin, 25.

4.2.2 Molecular procedures

All primers (Table S4) were designed using the Primer3plus software (Untergasser et al., 2012). DNA amplifications were performed with a standard enzyme (BIOTaq, Bioline, London, UK) or, for cloning, with a high-fidelity enzyme (PrimeStar HS, Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan). Amplicons were purified using the PCR Extract Mini Kit (5 PRIME Inc.) when needed for sequencing (Macrogen Inc., Madrid, Spain) or for cloning using the CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Plasmids were purified from *E. coli* employing a boiling method (Holmes & Quigley, 1981) or, for sequencing, a commercial kit (Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific SL, Madrid, Spain). Constructs were transferred to *P. syringae* by electroporation (Choi et al., 2006). The integrity of all constructs was confirmed by sequencing.

For quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) analyses of *hrpL* and *hrpA* (Matas et al., 2014; Bardaji et al., 2017), bacterial strains grown overnight in LB at 25 °C were washed twice in the *hrp*-inducing minimal medium with fructose (MMF) (Huynh et al., 1989), adjusted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.5 in the same medium and incubated with shaking (90 rpm) at 20 °C for 24 h before collecting the cells by centrifugation. For RT-qPCR of *fliC*, cells were grown on LB plates for 2 d at 18 °C or 28 °C. Plates were flooded with 1 mL of sterile distilled water, and cells were then resuspended and collected by

centrifugation. Pelleted cultures were frozen in liquid nitrogen before RNA extraction.

Table 6. Relevant *Pseudomonas amygdali* pv. *phaseolicola* strains used in this study.

Strains	Main features ^a	Reference or source
1448A	Wild type (WT) strain, isolated from <i>Phaseolus</i> in Ethiopia, 1985	(Joardar et al., 2005)
ΔpA	UPN1162; 1448A cured of plasmid p1448A-A; $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	D. Ramírez-Zapata, unpublished
$\Delta rsmE$	UPN1168; 1448A $\Delta rsmE$	This work
$\Delta rsmC$	UPN1187; 1448A $\Delta rsmC$	This work
$rsmA::\Omega$	UPN1225; 1448A $rsmA::\Omega$	This work
$rsmA\Omega-\Delta E$	UPN1227; derives from UPN1168 $rsmA::\Omega$ $\Delta rsmE$	This work
Mut-7-rsm	UPN1229; derives from UPN1185 $\Delta rsmC$ $rsmA::\Omega$ $\Delta rsmE$ $rsmH1$ -fsX $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
$gacA::IS$	UPN1230; 1448A $gacA::IS$ - Ω -Km/hah	This work
$gacS::IS$	UPN1362; 1448A $gacS::IS$ - Ω -Km/hah	This work

^a UPN, collection number in the Universidad Pública de Navarra. Ω specifies insertion of the Ω fragment from pHP45 Ω in the indicated gene. Gene $rsmH1$ -fsX contains a filled-in EcoRI restriction site, introducing a frameshift (fsX) after position 54 of its coding sequence. See text and Table S3 for strain UPN1185 and for further details.

RNA isolation was done using TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) and the Ambion TURBO DNA-free Kit (ThermoFisher Scientific, Vilnius, Lithuania), and cDNA was synthesized using random hexanucleotides (Promega, Madison, USA) together with the ImProm-II reverse transcriptase system (Promega, Madison, USA). qPCR experiments, using gene *gyrA* as reference, were carried out in the CX96TM Real-Time System and analyzed using the CFX Manager software version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Chicago, USA), essentially as described in (Matas et al., 2014; Bardaji et al., 2017). Gene expression levels were estimated using the $\Delta\Delta Ct$ method (Livak & Schmittgen, 2001) and the statistics were performed using R Project 3.3.3 (The R Development Core Team, 2008).

For RNA-seq analyses, two independent biological replicates of Pph 1448A and $gacA::IS$ mutant strains were grown in minimal standard succinate medium (SSM) (Meyer & Abdallah, 1978), at 18 °C and 28 °C, until an OD₆₀₀ of 0.7. Total RNA was extracted as above and its quality assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100 using an RNA Pico 6000 chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,

USA). The two biological samples for each combination of strain and temperature treatment were sequenced and analyzed by the Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) of the Universidad de Málaga (Spain). Raw reads were pre-processed using the SeqTrimNext pipeline (Falgueras et al., 2010) (<http://www.scbi.uma.es/seqtrimnext>) using the specific next-generation sequencing (NGS) technology configuration parameters, and the clean reads aligned with the closed genome of Pph 1448A (assembly ASM1220v1) with Bowtie 2 (Langmead & Salzberg, 2012) in BAM (Binary Alignment/Map) files, which were then sorted and indexed using SAMtools v1.4 (Li et al., 2009). Differentially expressed genes between two samples were analyzed using the Tuxedo Tools (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/tools/>) (Trapnell et al., 2012). The abundance of transcripts were measured in fragments per kilobase of fragments of gene per million reads (FPKM), and differentially expressed genes between two samples were analyzed using Cuffdiff (Trapnell et al., 2012) and considering a p -value < 0.05 as the significance threshold.

4.2.3 Bioinformatics tools

Searches for *csr/rsm* homologues were done in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithms. Sequence alignments were performed using the Multalin program (Corpet, 1988) or the tools at the EMBL-EBI server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), and construction of shaded alignments was done using the Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms/>) (Stothard, 2000). We used the MEGA7 software (v.7.0.26) (Kumar et al., 2016) for phylogenetic reconstructions, including multiple-sequence alignments with the MUSCLE program, determining the optimal substitution model, and construction of maximum-likelihood phylogenetic trees; confidence levels of the branching points were determined using 200 bootstraps replicates. Protein secondary structure was predicted using the JPred4 web server (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index.html>) (Drozdetskiy et al., 2015).

4.2.4 Mutagenesis and cloning of *rsm* genes

During the course of a random mutagenesis experiment of strain 1448A, using the minitransposon IS- Ω -Km/hah (Giddens et al., 2007), we obtained mutants that did not produce phaseolotoxin and that contained insertions in genes *gacA* and *gacS* (positions 2,703,793 and 4,266,894, respectively, in genome accession no. CP000058), which were retained and designated as strains *gacA::IS* and *gacS::IS*, respectively.

Genes *rsmA*, *rsmC*, *rsmE* and *rsmH1* were mutagenized by marker exchange mutagenesis using appropriate DNA fragments or amplicons (see Table S4 for primers) cloned in vector pK18*mobsacB* (Schäfer et al., 1994) and using LB plus 5 % sucrose for counterselection. The DNA fragments from positions 1,745,318-1,746,973 and 3,778,776-3,779,364 (accession no. NC_005773), which include

the complete *rsmC* and *rsmE* genes, respectively, were deleted from the chromosome. Gene *rsmA* was interrupted by inserting the Ω fragment (Sm^r/Sp^r) from pHP45 Ω (Prentki & Krisch, 1984) extracted with BamHI, which is symmetrically bordered by stop codons in the three reading frames followed by a transcription termination signal, into its internal BclI site and truncating the deduced product after the first 13 amino acids. In turn, the reading frame of gene *rsmH1* was interrupted by filling-in its unique EcoRI site with Klenow (New England Biolabs, Ipswich, USA), truncating the deduced product after the first 18 amino acids. We also used strain ΔpA (D. Ramírez-Zapata, unpublished results; Table 6), which derives from strain 1448A by curing of the native plasmid p1448A-A. This strain, therefore, lacks the plasmid-borne genes *rsmH2*, *rsmH3-1* and *rsmH3-2*. Multiple *rsm* mutants were constructed in a progressive manner, by the stepwise mutation of individual genes of strains 1448A or ΔpA as detailed above. For overexpression and complementation experiments, we individually cloned each of the *rsm* genes, plus between 0.19 and 0.5 kb of DNA preceding the annotated start codon, behind the P_{BAD} inducible promoter of the pJN105 expression vector (Newman & Fuqua, 1999). In these clones, the *rsm* genes would be expressed from the native promoter and also, thanks to the already described leaky activity of the P_{BAD} promoter, from the vector (Newman & Fuqua, 1999). Since we observed comparable results in media without and with 0.1 % arabinose, which leads to a high level of transcription from the P_{BAD} promoter (Newman & Fuqua, 1999), complementation and overexpression experiments were carried out using culture media supplemented only with gentamicin, to select for pJN105 clones. All mutants and clones in pJN105 were confirmed by PCR and sequencing.

4.2.5 Pathogenicity assays and autoagglutination

Plant growth and leaf inoculation were done essentially as described (Harper et al., 1987). Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Canadian Wonder (CW) was grown in chambers at 23 °C–18 °C day–night temperatures, with a 16 h photoperiod and 70 % relative humidity. Bacteria freshly grown overnight on medium B plates were washed and suspended in ¼ Ringer's (Oxoid, Basingstoke, UK) to an OD₆₀₀ of 0.002 (approx. 10⁶ cfu mL⁻¹) for inoculation of bean leaves. Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana) were held under the same photoperiod and humidity conditions, but the growing temperature was 28 °C and the cell suspensions for inoculation were adjusted to OD₆₀₀ of 0.02 (approx. 10⁷ cfu mL⁻¹). Cell suspensions were infiltrated into bean unifoliate leaves, or tobacco leaves, by piercing the abaxial surface with a needle and pressuring them through it, using a blunt syringe. Bean pods were obtained from a local supermarket (cv. Helda) or produced from locally grown plants (cv. Canadian Wonder) and were inoculated either using a toothpick (Harper et al., 1987) or by carefully injecting bacterial suspensions (approx. 10⁷ cfu mL⁻¹) under the epidermal area (Yessad et al., 1992), and scored daily for symptoms

development. Bacterial populations in leaves were estimated essentially as described (Bertoni & Mills, 1987). Briefly, two 0.6-cm diameter discs were harvested with a cork borer for each combination of date and inoculation replica and homogenized in 1 mL of ¼ Ringer's. Serial dilutions of these suspensions were then plated on LB, to restrict growth and facilitate colony counting after 24–48 h of incubation at 25 °C. Nine replicates per strain were used for each of the three independent experiments performed on bean plants, and means were compared by an analysis of the variance (ANOVA $p < 0.05$). For tobacco, a total of at least twenty-seven inoculations per strain were performed in three independent experiments.

For Congo red staining and autoagglutination assays (Taira et al., 1999), strains grown on plates of medium B at 25 °C for 48 h were resuspended and adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5 in the *hrp*-inducing medium MMF (Huynh et al., 1989). Then, 5 µL of the resulting suspensions were deposited in the center of MMF plates supplemented with 20 µg mL⁻¹ of Congo red, and were incubated at 20 °C for 48 h; additionally, 2 mL of each suspension were incubated with shaking (90 rpm) at 20 °C for 24 h before evaluating autoagglutination. All experiments were performed at least three times with three replicas each.

4.2.6 Assays of motility and biosynthesis of phaseolotoxin

Swarming motility assays were done as described (Ferreiro et al., 2018). Briefly, bacteria grown on plates of medium B at 25 °C for 48 h were resuspended and adjusted to an OD₆₀₀ of 2.0; then, 2 µL of the cell suspensions were deposited on semisolid peptone glucose agar (PG-agar) plates (0.5 % agar, 0.5 % proteose peptone N° 3 and 0.2 % glucose). Plates were incubated at 18 °C or 28 °C for 48 h before photography.

Production of phaseolotoxin was assayed by an *E. coli* growth inhibition assay (Staskawicz & Panopoulos, 1979; Hernández-Guzmán & Alvarez-Morales, 2001; Arantza Rico et al., 2003; Carrión et al., 2012) with slight modifications. Briefly, a single colony of the indicator strain *E. coli* CECT 831 grown overnight on LB at 37 °C was used to inoculate 10 mL of LB and growth continued with shaking until an OD₆₀₀ of 0.7, then centrifuged and resuspended in 3 mL of sterile distilled water. A 100 µL aliquot of this suspension was mixed with 3.5 mL of sterile 0.7 % agar in water supplemented with 100 µL of 20 % glucose and, when necessary, 100 µL of a 100 mM solution of appropriate amino acids, and spread over a plate of Ayer's minimal medium (Lelliott & Stead, 1987). Strains of *P. syringae* were grown at 18 °C or 28 °C in the Hoitink & Sinden optimized for coronatine production (HSC) minimal medium (Palmer & Bender, 1993). The different derivatives of strain 1448A, either mutants or strains overexpressing *rsm* genes, grew at slightly different rates in HSC; therefore, we evaluated the production of phaseolotoxin after 14–21 h, when the cultures were growing exponentially and had reached an OD₆₀₀ of 0.2–0.3, and after 48 h of growth, in stationary phase

(OD₆₀₀ >1). At each time point, 20 µL of cell-free spent supernatants were deposited on 6 mm Whatman antibiotic assay discs arrayed on a sterile Petri dish cover; when ready, all the discs were transferred to the plate overlaid with the *E. coli* indicator strain and a further 10 µL of sterile distilled water was added to each disc to facilitate diffusion of the toxin into the medium. After 24–48 h of incubation at 37 °C, production of phaseolotoxin was confirmed by the appearance of growth-inhibition haloes on Ayer's minimal medium plates that were inverted on plates with L-citrulline but not with L-ornithine.

All experiments were repeated at least three times with three replicas each.

4.2.7 Carbon source utilization

Bacterial strains grown for 2 d on LB plates at 25 °C were resuspended in ¼ Ringer's to an OD₆₀₀ of 0.1 (approx. 5×10^7 cfu mL⁻¹). These suspensions were used to inoculate microtiter plates to a final density of 5×10^6 cfu mL⁻¹ in a final volume of 150 µL, for 96-well plates, or 450 µL, for 48-well plates, of the appropriate culture medium. Plates were cultured for 72 to 96 h at 28 °C, with continuous shaking, in a multi-Detection Microplate Reader (Synergy™ HT; Biotek® Instruments, Winooski, USA), which recorded OD₆₀₀ reads every 30 min. As culture media we used either LB, SSM (Meyer & Abdallah, 1978) or the minimum medium HSC (Palmer & Bender, 1993); for HSC, the original 20 g L⁻¹ of glucose were substituted by 4 g L⁻¹ of glucose, L-glutamine or L-glutamic acid. In each experiment we included three to six replicas for each combination of strain/culture medium, and experiments were repeated at least three times.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 *Pseudomonas amygdali* pv. *phaseolicola* contains seven *rsm* homologues

Pph 1448A contains seven *rsm* gene homologues (Figure 20 and Table S5). In order to maintain a consistent, coherent and uniform nomenclature across species, we adopted the recently proposed schema to designate them (Sobrero & Valverde, 2020). The genes encoding RsmA, RsmC, RsmE, and RsmH1 are located in the chromosome and three (*rsmH2*, and two identical copies of *rsmH3*) in the virulence plasmid p1448A-A. By comparison, *P. syringae* pv. tomato DC3000 contains five *rsm* gene homologues (Ferreiro et al., 2018), although only the four chromosomal homologues of 1448A are conserved, with synteny and high identity, in strain DC3000. Additionally, strain DC3000 contains the chromosomally-encoded homologue RsmD (CsrA4) that is not present in strain 1448A (Figure S1 and Table S5).

The different protein homologues from strain 1448A are also similar among them, although they can be separated into four of the recently defined subfamilies within the genus *Pseudomonas* (Figures 20 and S1). RsmA, RsmC and RsmE

et al., 2018), with the red asterisk indicating a critical Arg44 residue in RsmA and RsmE; the corresponding residues in RsmC and RsmH were marked from a sequence alignment with RsmA and RsmE. The black arrowhead indicates the point where an insertion of ISPsy17 interrupts the *rsmC* coding sequence in strain Pph 1448A. Secondary structures were predicted with JPred4 and are shown below the alignments and in the same vertical order than the respective sequences; secondary structures were identical for RsmA and RsmE proteins, and so only one is shown for each. Abbreviations (accession numbers): Pf0-1, *P. fluorescens* Pf0-1 (RsmA, WP_002554426; RsmE, WP_003179932); 1448A, *P. amygdali* pv. phaseolicola 1448A; B728a, *P. syringae* pv. *syringae* B728a; DC3000, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; accession numbers for 1448A, B728a and DC3000 proteins are indicated in Table S5

RsmC in strain 1448A likely has a reduced or abolished activity because an insertion of ISPsy17 interrupts and modifies the 3' end of gene *rsmC*, shortening the deduced product from 64 to 49 amino acids (Figures 1 and 2). Notably, the genomes of several other strains from genomospecies 2 also possess a mutated copy of *rsmC* interrupted with an insertion of ISPsy17 (Figure 21). ISPsy17 is by far the most abundant mobile element in strain 1448A and it appears to insert randomly (Bardaji, Añorga, et al., 2011). In fact, the insertions of ISPsy17 found in *rsmC* are in both orientations and in different positions, suggesting that they represent independent insertions rather than the result of target specificity. In all cases, the insertion eliminates amino acids that are important for the interaction between RsmA or RsmE with RNA (Figure 21), and for the regulation of several phenotypes in other bacteria (Heeb et al., 2006; Schubert et al., 2007; Krüger et al., 2018). In particular, the arginine residue at position 44 (Arg44) is critical for a strong binding to the RNA targets (Schubert et al., 2007) and is missing in several of the insertional mutants. This is somewhat puzzling, however, because the Arg44 residue is also missing in RsmD (CsrA4) from strain DC3000 (Ferreiro et al., 2018), and in RsmH1, RsmH2 and RsmH3 from strain 1448A (Figure 20). It is therefore possible that the stabilizing role of Arg44 is carried out by other positively-charged residues in these Rsm homologues (Figure 20). Alternatively, these homologues might in fact bind RNA with less efficiency and contribute to modulate the regulatory activity of the Csr/Rsm system, for instance by forming heterodimers with RsmA or RsmE and reducing or preventing their binding to RNA. Nevertheless, interruption of *rsmC* likely confers a selective advantage, given the repeated occurrence of ISPsy17 insertions. However, it is not clear that these insertions will lead to a complete inactivation of the protein, or to changes in its specificity and/or the strength of its interactions. Therefore, it is possible that the regulatory activity of RsmC has a negative impact for the bacterial life cycle of diverse strains of genomospecies 2 and/or that the activity of the new RsmC product is advantageous.

Gene *rsmH3* lies within a 4,133 nt fragment (Figure 22) that is duplicated in plasmid p1448A-A (Joardar et al., 2005). This fragment also includes a polygalacturonase gene, immediately 3' of *rsmH3*, and the T3SS effector virulence gene *hopW1* (Zumaquero et al., 2010), and it is present with high Blastn identity in many pathovars of diverse genomospecies of *P. syringae* sensu lato. Additionally, gene *rsmH3* is preceded by a canonical *hrp* box (Vencato et al.,

2006), suggesting that it is part of the HrpL regulon and thus possibly involved in the post-transcriptional regulation of genes only during the interaction with plants. However, a previous RNA-seq analysis of the HrpL regulon did not evidenced expression of this gene (Mucyn et al., 2014).

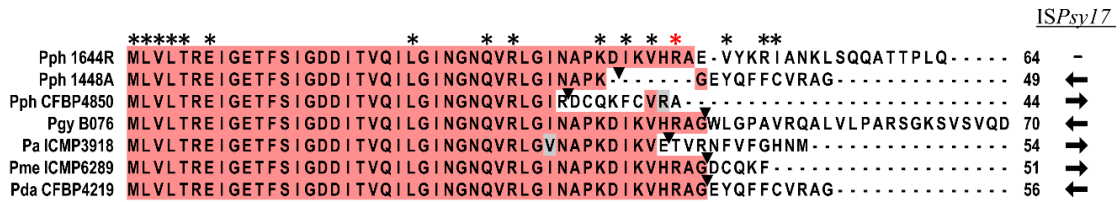


Figure 21. Disruption of gene *rsmC* by independent insertions of ISPsy17 in diverse strains of genomospecies 2 of *Pseudomonas syringae* sensu lato. The deduced products of *rsmC* from the strains shown on the left were aligned using Multalin (Corpet, 1988). Pa, *P. amygdali*; Pda, *P. amygdali* pv. daphniphylli; Pgy, *P. amygdali* pv. glycinea; Pme, *P. meliae*; Pph, *P. amygdali* pv. phaseolicola. Only the first 70 residues are shown from the 116 residues sequence from Pgy B076. The first sequence, from strain 1644R, is a wild-type full-length allele; black triangles are inserted before the first amino acid modified by the insertion of ISPsy17 and the arrow to the right indicates the orientation of this mobile element. Numbers at the end of the alignment indicate the total number of amino acids for each deduced product. Residues that are identical or similar in at least 50% of the sequences are shaded in red and grey, respectively. Asterisks indicate residues that are important for the interaction between the related proteins RsmA or RsmE with RNA and for the regulation of several phenotypes, with a red asterisk indicating the critical Arg44 residue (Heeb et al., 2006; Schubert et al., 2007; Krüger et al., 2018).

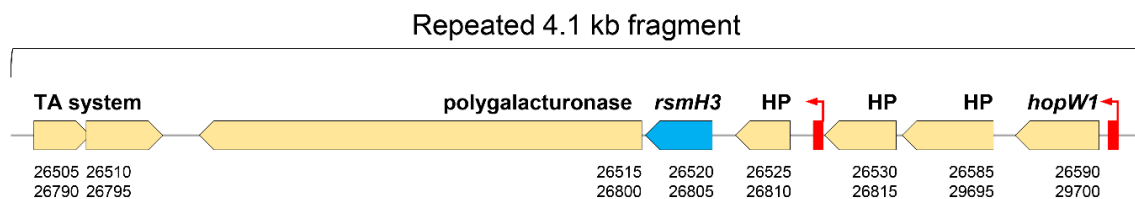


Figure 22. Gene *rsmH3* is located within a duplicated fragment in plasmid p1448A-A from *P. amygdali* pv. phaseolicola 1448A. Coding sequences are depicted as block arrows, with that of *rsmH3* highlighted in blue, and with numbers at the bottom indicating the PSPPH_RS locus tag for each of the two copies (accession no. NC_007274). TA system indicates a putative toxin–antitoxin system of the RelE/ParE family; polygalacturonase, is a glycoside hydrolase family 28 protein; HP, hypothetical protein; *hopW1* is a type III secretion system effector that contributes to the virulence of Pph 1448A (Zumaquero et al., 2010). The red boxes show the location and orientation of promoters regulated by HrpL (*hrp* boxes) (Vencato et al., 2006).

4.3.2 Construction of single and multiple *rsm* mutants

To evaluate the phenotypes regulated by the different *rsm* homologues, we constructed derivatives of Pph 1448A containing mutations in individual *rsm* genes as well as mutations in two or more of these genes. The chromosomal genes were individually mutated by marker exchange mutagenesis, either by complete deletion (*rsmC* and *rsmE*), by interrupting the coding sequence (CDS) with an antibiotic resistance cassette (*rsmA*), or by frameshifting, filling-in a restriction site (*rsmH1*). Strain ΔpA derives from strain 1448A and lacks the large plasmid (Ramírez-Zapata, unpublished results), consequently lacking *rsmH2* and both copies of *rsmH3*. Strains with multiple mutations were constructed from strains 1448A and ΔpA by multiple rounds of marker-exchange mutagenesis. For

simplicity, all mutant strains will be henceforth designated with the gene(s) mutated in that strain (see Table 6).

To be used as controls, we obtained strains *gacA::IS* and *gacS::IS* by random transposon mutagenesis with the mobile element IS- Ω -Km/hah.

4.3.3 Expression levels of *rsm* genes

We evaluated by RNAseq the global transcription patterns of strains 1448A and *gacA::IS* during mid-exponential growth (OD₆₀₀ of 0.7) in minimal medium at 18 °C and 28 °C. Here we report the expression values of *gacS/gacA*, the seven *rsm* homologues and the seven regulatory small RNAs, *rsmX1-5*, *rsmY* and *rsmZ* (Table 7).

As it occurs with *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Hockett et al., 2013), gene *gacA* transcription is not thermoregulated in strain 1448A. However, it is significantly less expressed at 28 °C in strain *gacA::IS*, suggesting that GacA stimulates its own transcription at high temperatures. Notably, expression of gene *uvrC* is nearly abolished in strain *gacA::IS*, likely due to a polar effect of the insertion of IS- Ω -Km/hah in *gacA*, as recently described for a *gacA::Tn5* insertion mutant of *P. syringae* pv. *syringae* B728a (O'Malley et al., 2019). Therefore, the phenotypes displayed by strain *gacA::IS* in this work should be interpreted cautiously, because they might be due to defects in *gacA* and/or in *uvrC*. Nevertheless, the *gacA::IS* mutant is used in this work only as a control and to confirm previously reported phenotypes using similar mutants.

The *rsm* genes, except *rsmE*, showed levels of expression at 18 °C that were not significantly different from those at 28 °C. Gene *rsmE*, however, was significantly overexpressed at 18 °C. Most of the *rsm* genes, except *rsmE* and *rsmH3*, appear to not depend on GacA for their expression. The expression of *rsmE* was significantly reduced in strain *gacA::IS* at 18 °C compared to that of the wild-type (WT) strain, indicating that GacA acts as an activator of *rsmE* expression at 18 °C. Expression of the two copies of *rsmH3* in strain *gacA::IS* at 28 °C was significantly higher than in the wild-type strain. Since the expression of *rsmH2* was unchanged, however, this result indicates that changes in *rsmH3* transcription are not due to possible changes in plasmid copy number but rather to GacA likely mediating the repression of *rsmH3* at 28 °C.

Genes *rsmX1*, *rsmX2*, *rsmX3* and *rsmY* were on average expressed two- to eight-fold more than the other *rsm* sRNA genes both at 18 °C and 28 °C (Table 7), suggesting that they might have a main role in gene regulation. Only four of the *rsm* genes (*rsmX1*, *rsmX4*, *rsmX5*, and *rsmZ*) appear to be thermoregulated, with significantly lower levels of expression at 18 °C than at 28 °C. This suggests that they have a different role in the thermoregulation of gene expression in strain *P. amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A. In *P. fluorescens* CHA0, genes *rsmX*, *rsmY* and *rsmZ* are also thermoregulated, although their expression is significantly

higher at the lower temperature (30 °C vs. 35 °C) (Nakatsu et al., 2019). Additionally, and with the exception of *rsmZ* at 28 °C, all the sRNAs were significantly less expressed in strain *gacA::IS* suggesting that their expression is ultimately dependent on GacA. The GacS/GacA system has also been shown to activate the transcription of *rsmX* and *rsmY* in *P. amygdali* pv. *tabaci* (Nakatsu et al., 2019), and of *rsmY* and *rsmZ* in *P. aeruginosa* (Brencic et al., 2009) and *P. protegens* CHA0 (Humair et al., 2010), although with a differential regulation for *rsmZ* in strain CHA0 (Humair et al., 2010) and in *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Yu et al., 2014). This is relevant because *P. aeruginosa* also contains sRNAs antagonists of Rsm proteins that are independent of the GacS/GacA system (Miller et al., 2016; Janssen et al., 2018).

Table 7. RNAseq expression values of genes from the GacS/GacA and Csr/Rsm transcriptional regulation systems from *P. amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A.

Gene	FPKM ^a				Fold change (log ₂) ^b				
	WT		<i>gacA::IS</i>		18 °C/28 °C		<i>gacA::IS</i> /WT		
	18 °C	28 °C	18 °C	28 °C	WT	<i>gacA::IS</i>	18 °C	28 °C	
<i>gacS</i>	81.3	71.5	44.1	40.9	0.2	0.1	-0.9	-0.8	
<i>gacA</i>	347.3	354.7	200.3	144.9	0.0	0.5	0.8	-1.3	
<i>uvrC</i>	115.3	140.1	3.4	4.5	-0.3	-0.4	-5.1	-5.0	
<i>rsmA</i>	932.9	565.1	1235.0	844.0	0.7	0.6	0.4	0.6	
<i>rsmC</i>	53.8	75.1	67.1	43.9	-0.5	-0.6	-0.3	0.2	
<i>rsmE</i>	614.6	241.7	179.2	204.9	1.4	-0.2	-1.8	0.2	
<i>rsmH1</i>	179.8	228.2	168.2	280.5	-0.3	-0.7	-0.1	0.3	
<i>rsmH2</i>	88.1	193.2	93.6	155.0	-1.1	-0.7	0.1	-0.3	
<i>rsmH3-1</i>	96.2	169.5	86.2	419.2	-0.8	-2.3	-0.2	1.3	
<i>rsmH3-2</i>	99.6	171.4	86.5	412.0	-0.8	-2.3	-0.2	1.3	
sRNAs									
<i>rsmX1</i>	61440.0	181313.0	980.2	2283.9	-1.6	-1.2	-6.0	-6.3	
<i>rsmX2</i>	85990.4	129285.0	765.7	1228.2	-0.6	-0.7	-6.8	-6.7	
<i>rsmX3</i>	54830.1	51529.8	116.8	400.4	0.1	-1.8	-8.9	-7.0	
<i>rsmX4</i>	338.7	737.1	71.4	100.1	-1.1	-0.5	-2.3	-2.9	
<i>rsmX5</i>	682.1	2853.5	32.6	26.0	-2.1	0.3	-4.4	-6.8	
<i>rsmY</i>	15372.1	11471.4	330.3	966.0	0.4	-1.6	-5.5	-3.6	
<i>rsmZ</i>	791.7	2504.5	357.5	2712.2	-1.7	-2.9	-1.2	0.1	

^a FPKM normalized, FPKM; fragments per kilobase of gene fragments per million readings. ^b Fold change (FC) indicates averaged differential gene expression (log₂ normalized) in *P. amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A (WT), or the derivative *gacA* mutant with respect to temperature or to each other; positive and negative fold changes reflect an increased or a decreased level of gene expression, respectively, at 18 °C or in the *gacA::IS* strain. Cells with grey shading indicate genes with a significant differential expression (*p*-value < 0.05).

4.3.4 Genes *rsmA* and *rsmE* redundantly control virulence in bean and the expression of the t3ss

The GacS/GacA system regulates expression of pathogenicity or virulence in diverse pathovars of *P. syringae*. However, this system contributes only modestly

to virulence of Pph 1448A in bean, through regulation of gene *hrpL* [28,81]. We therefore evaluated the role of the different Rsm homologues in the virulence of strain 1448A.

4.3.4.1 Virulence in bean

As expected based upon (Ortiz-Martín et al., 2010) the *gacA* mutant of 1448A showed a moderately reduced virulence when inoculated on bean pods, causing repetitively smaller lesions than the wild-type strain, 1448A (Figure 23). Diverse combinations of single, double and multiple mutations of the *rsm* homologues did not have any apparent effect on the development of symptoms, except for those strains containing mutated versions of both *rsmA* and *rsmE*, which did not induce any water-soaking on bean pods (Figure 23A and data not shown). This suggests that only these two *rsm* genes are required, redundantly, for full virulence. Henceforth, we therefore concentrated on analyzing the role of only these two genes.

Inoculation of bean leaves produced similar results to that of bean pods, namely that strain *gacA::IS* and the double mutant *rsmA-rsmE* (*rsmA*Ω-Δ*E*) induced less severe symptoms than the wild-type strain (Figure 23A). The reduction in symptoms expression was correlated with a significantly reduced ability to grow in planta (Figure 23B). Strain *gacA::IS* showed only a small, but significant reduction at 4 dpi, reaching population levels two to five times lower than the wild-type strain. This difference, however, increased at 6 dpi because populations of the wild-type strain, but not those of the *gacA* mutant, continued to increase. The defect in virulence was considerably more pronounced for strain *rsmA*Ω-Δ*E*, which consistently reached population counts that were around one order of magnitude lower than those of the wild type at all the sampling times. Strains with a single mutation in either *rsmA* or *rsmE*, or complementation of strain *rsmA*Ω-Δ*E* with either of these homologues, led to the induction of symptoms and to population levels similar to those displayed by the wild-type strain (Figure 23B and data not shown).

4.3.4.2 Expression of the T3SS.

The T3SS delivers specialized effector proteins into eukaryotic cells, facilitating pathogenicity and promoting virulence of many bacterial pathogens (Y. Xie, Shao, & Deng, 2019). We evaluated the phenotypical and genotypical expression of the T3SS by examining the induction of the hypersensitive response (HR) in tobacco, autoagglutination and the expression of key regulatory genes. When inoculated at 10^7 cfu mL⁻¹, the wild-type strain and individual *rsmA*, *rsmE* and *gacA* mutants all produced a similar HR reaction in tobacco leaves within 24x48 h, whereas strain *rsmA*Ω-Δ*E* did not induce an HR in the majority of the inoculations, even after 2 d (Figure S2). The elicitation of the HR in some of

the inoculated points is likely due to a partial activation of the T3SS and could also be influenced by local population levels and leaf age. In particular, partial defects of the T3SS and small variations in inoculated population levels were found to have a dramatic effect on the elicitation of the HR in diverse mutants of *P. syringae* pv. tomato DC300 (Oh et al., 2007). Complementation of strain *rsmA*Ω-ΔE with the individual *rsmA* or *rsmE* genes led to only a partial recovery of the phenotype. This type of partial complementation, or complementation to the reverse phenotype, has already been reported for *rsm* homologues in *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019), again suggesting the relevance of the relative concentration of Rsm proteins in the cell.

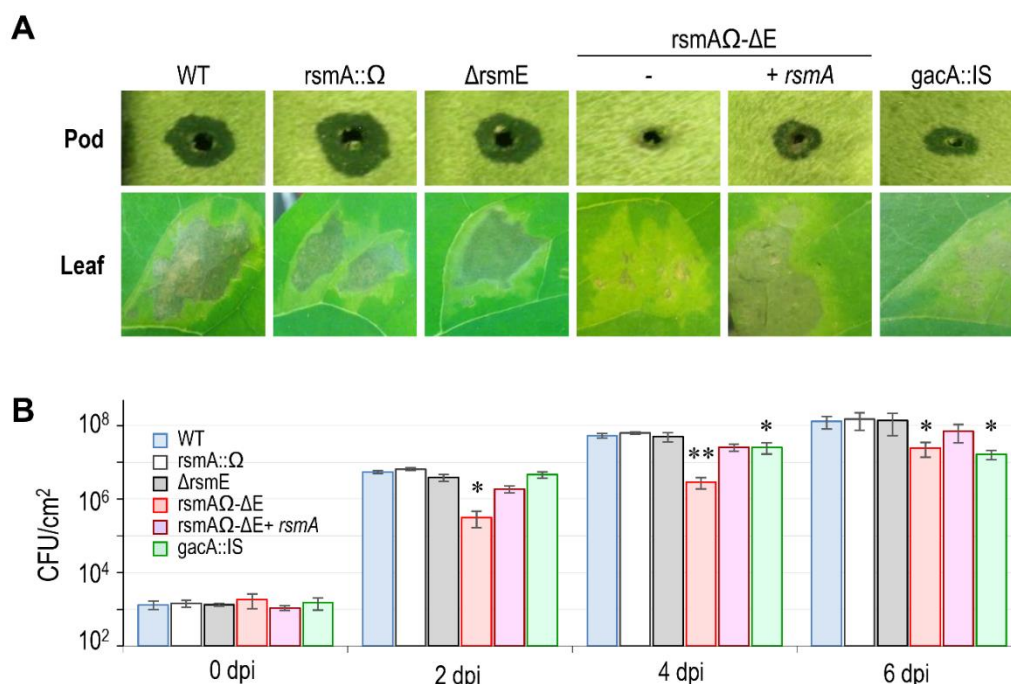


Figure 23. Genes *rsmA* and *rsmE* redundantly control virulence in bean (*Phaseolus vulgaris*). **(A)** Representative symptoms induced by *P. amygdali* pv. phaseolicola 1448A (WT) and derivative mutants in pods and leaves of bean cv. Canadian Wonder at 6 days post-inoculation. **(B)** Growth course of WT and mutant strains in leaves of bean cv. Canadian Wonder, after inoculation with suspensions of 10^6 cfu mL^{-1} . *; significant differences to WT, **; significant differences to WT and the *gacA* mutant, as determined by an ANOVA ($p < 0.05$). Error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates, each with three technical replicates. Similar results were obtained for strain *rsmA*Ω-ΔE complemented with *rsmA* or with *rsmE*.

Staining of bacterial colonies on Congo red plates and autoagglutination in liquid medium were shown to correlate with the production of the Hrp pilus (Taira et al., 1999). All strains, except strain *rsmA*Ω-ΔE, stained red and were autoagglutination positive (Figure 24). This suggests that the biosynthesis of functional T3SS pili is compromised in the double mutant, likely explaining its reduced ability to induce the HR in tobacco. Remarkably, cultures of strains *gacA*::IS and *rsmA*Ω-ΔE complemented with *rsmE* consistently showed many

large cell clumps (Figure 24), likely suggesting a higher expression of the T3SS in these strains.

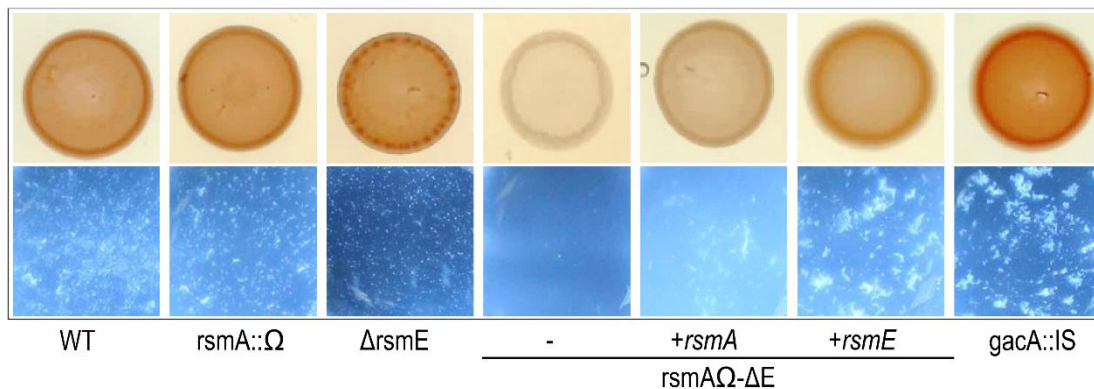


Figure 24. The double mutant *rsmA*–*rsmE* does not agglutinate in culture. Hrp-pilus production assay in *hrp*-induction medium by Congo red staining on plates (top) and autoagglutination in liquid (bottom). Pictures are representative of three independent experiments.

We also examined the expression of the T3SS by measuring the relative expression levels of genes *hrpL* and *hrpA* by RT-qPCR (Figure 25). HrpL is an alternative sigma factor activating the expression of the *hrp* cluster and other genes essential for pathogenicity, whereas HrpA is the Hrp pilus protein, responsible for the delivery of effectors to plant cells and also a regulator of the T3SS expression (Vencato et al., 2006; Arnold et al., 2011; Y. Xie, Shao, & Deng, 2019). Both genes *hrpL* and *hrpA* showed a higher level of transcription in the *rsmA*Ω mutant to the wild-type strain, but this was reversed in mutant Δ*rsmE*, with a significantly reduced transcription (Figure 25). Nevertheless, the reduced transcription level of strain Δ*rsmE* was sufficient to induce an HR on tobacco and to display apparently normal Congo red staining and autoagglutination phenotypes (Figures 5 and S2). Strain *rsmA*Ω-Δ*E* showed a further reduced level of transcription of *hrpL* and *hrpA*, agreeing with its severely reduced ability to cause the HR on tobacco and its lack of autoagglutination (Figures 5 and S2). Therefore, RsmA and RsmE show a degree of specialization for the regulation of the biosynthesis of the T3SS. Thus, RsmA is dispensable for the expression of genes regulating the T3SS and can only partially substitute the activity of RsmE.

Together, our results indicate that the lower virulence of strain *rsmA*Ω-Δ*E* and its inability to cause and HR in tobacco are likely due to a reduced expression of the T3SS and, probably because of a reduced expression of *hrpL*, of the T3SS effector genes. The partial functional redundancy of homologues of RsmA and RsmE has already been reported for the regulation of biocontrol factors in *P. fluorescens* CHA0 and in *P. syringae* pv. tomato DC3000, where they play a major role in virulence (Lapouge et al., 2007; Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019). The role of RsmA and RsmE in regulating the T3SS in strain DC3000 is not entirely clear, however, with reports indicating highly increased or highly

reduced transcription of *hrpL* and *hrpA* in individual *rsmE* mutants (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019). Additionally, and contrarily to strain *rsmA*Ω-ΔE (Figure S2), a *rsmA*–*rsmE* double mutant of strain DC3000 was still able to induce the HR in tobacco like the wild-type strain (Ge et al., 2019). This suggests that, in parallel with their high sequence conservation (Ferreiro et al., 2018; Sobrero & Valverde, 2020), the functionality of RsmA and RsmE is also in general widely conserved but might display certain strain-specific variations.

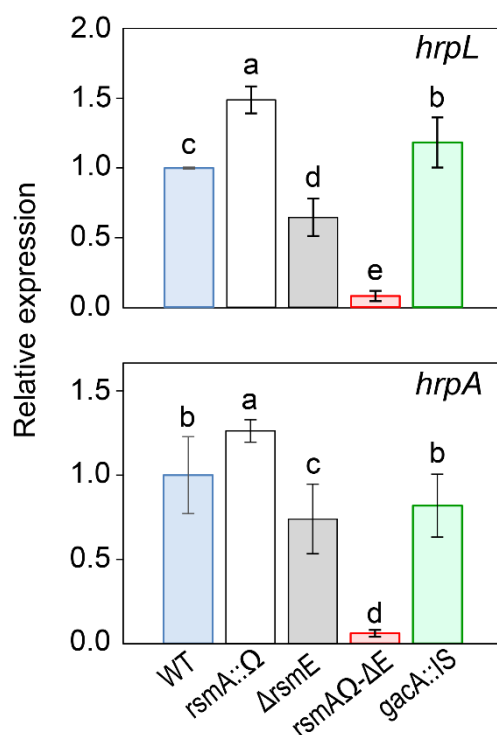


Figure 25. Expression analysis of type III secretion genes in *P. amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A and derivative mutants. Bars indicate the expression of the indicated genes relative to strain 1448A (WT), after normalization with gene *gyrA* as an internal control, using quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR). Letters above bars denote ANOVA categories with significant differences ($p < 0.05$). Error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates.

4.3.5 Genes *rsmA* and *rsmE* also redundantly control motility and carbon source utilization

We tested the involvement of *gacA* and *rsm* genes in motility and carbon source utilization, because these processes are part of the GacS/GacA regulon in a large diversity of bacteria and are particularly relevant for plant infection (Heeb & Haas, 2001; Lapouge et al., 2007).

4.3.5.1 Motility

Genes involved in motility are upregulated at 18 °C in *P. amygdali* pv. phaseolicola NPS3121, although this strain is non motile for unknown reasons (Kong et al., 2012; Arvizu-Gómez, Hernández-Morales, Aguilar, et al., 2013). As expected, therefore, strain 1448A showed high swarming motility at 18 °C but very low or not at all at 28 °C (Figure 26A). Reduced motility at 28 °C was correlated with a significant reduced transcription of gene *fliC* (Figure 26B), coding for the flagellin subunits that constitute the flagellum, which in turn is required for swarming motility (Hockett et al., 2013).

Mirroring the case with other bacteria (Heeb & Haas, 2001; Ferreiro et al., 2018; O'Malley et al., 2020), the *gacA* mutant of 1448A was non motile in both conditions (Figure 26). This same phenotype was shown by strain *rsmA*Δ-*rsmE*, but not by the corresponding single mutants. Swarming motility of the double mutant was complemented at 18 °C by gene *rsmA* or *rsmE* to wild-type levels (Figure 26A and data not shown). Strain Mut-7-*rsm*, containing no functional *rsm* genes, was non motile and was also complemented by either gene *rsmA* or *rsmE* (data not shown), indicating that they might be the only *rsm* genes regulating motility. Additionally, the motility defect of the *gacA* mutant and the double *rsmA*–*rsmE* mutant correlated with a downregulation of gene *fliC* (Figure 26B).

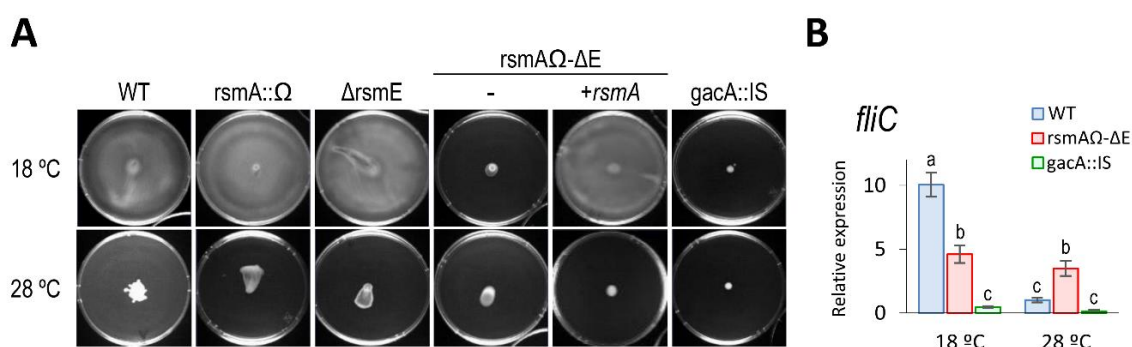


Figure 26. Swarming motility is thermoregulated and redundantly dependent on RsmA and RsmE in *P. amygdali* pv. phaseolicola 1448A. **(A)** Essay of motility at different temperatures. Strains were grown on the surface of peptone-glucose agar (0.5 %) for 48 h. Similar results were obtained for strain *rsmA*Δ-*rsmE* complemented with *rsmA* or with *rsmE*. Pictures are representative of three replicates in three independent experiments. **(B)** Relative expression of the flagellin gene, *fliC*, assessed by quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR). Bars represent the average expression relative to strain 1448A (WT) at 28 °C, after normalization with gene *gyrA* as an internal control. Letters above bars denote ANOVA categories with significant differences ($p < 0.05$). Error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates.

These results indicate that thermoregulation of motility in Pph 1448A involves the redundant activation of the flagellar apparatus at low temperature by RsmA and RsmE. In turn, the lack of expression of motility in the *gacA* mutant suggests the existence of a putative repressor that will be likely antagonized through the GacS/GacA system. In *P. syringae* pv. tomato DC3000, motility is also dependent on the redundant regulation by RsmA and RsmE at 20 °C (Ge et al., 2019).

4.3.5.2 Carbon source utilization

Strain 1448A showed diauxic growth in the rich medium LB (Figure S3), exemplified by two exponential growth phases separated by a small lag phase. Strain *rsmA*Ω-Δ*E*, but not the individual mutants, showed instead a single exponential phase that, unexpectedly, allowed the reaching of higher optical densities. The diauxic growth is generally interpreted as an adaptation for the sequential metabolism of different carbon sources (Sezonov et al., 2007); therefore, the double mutant is likely unable to efficiently metabolize one or more of the carbon sources available in the medium and is consequently growing on a single carbon source. The double *rsmA*–*rsmE* mutant, but again not the individual mutants, also showed a reduced and delayed growth in minimal media containing glucose, glutamic acid, glutamine, or succinate as the sole carbon source (Figure S3). In all cases, except for glucose, the growth defects were complemented by either *rsmA* or *rsmE* (data not shown).

The Csr/Rsm system, and the antagonist sRNAs, are involved in the regulation of genes involved in carbon flux pathways in numerous bacterial strains (Sonnleitner & Haas, 2011; Vakulskas et al., 2015). Pph 1448A is not an exception, and the metabolism of preferred carbon sources (O’Leary et al., 2016) is under the redundant control of RsmA and RsmE. Likewise, the metabolism of diverse favored carbon sources is also under the control of the Csr/Rsm system. The regulation network, however, seems to be very complicated because individual mutations in *rsmE* already led to a significant growth reduction with diverse carbon sources in strain DC3000 (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019).

4.3.6 RsmA and RsmE redundantly contribute to the activation of phaseolotoxin biosynthesis at 18 °C

Three lines of evidence would suggest that an Rsm protein might be involved as a repressor in the thermoregulated biosynthesis of phaseolotoxin. First, production of phaseolotoxin is abolished in a strain of Pph overexpressing *rsmA* from *P. aeruginosa* PAO1 (Kong et al., 2012). Second, a *gacA* mutant of Pph is unable to synthesize the toxin (De la Torre-Zavala et al., 2011); such a mutant will be unable to express the sRNAs antagonizing RsmA (Vakulskas et al., 2015), which will predictably cause the full repression of the Pht cluster. Third, a small DNA fragment containing the *rsmY* gene allows for the biosynthesis of phaseolotoxin at 28 °C when present in multiple copies, likely by titrating a repressor (Rowley et al., 2000; Valverde et al., 2003). It is likely that this repressor might be an Rsm protein, because *rsmY* is known to sequester Csr/Rsm proteins (Valverde et al., 2003).

4.3.6.1 Toxin biosynthesis by strain 1448A depends on GacA and GacS

Strains *gacA*::IS and *gacS*::IS were unable to synthesize phaseolotoxin (Figure 27 and data not shown), as it occurs with strain Pph NPS3121 (De la Torre-Zavala et al., 2011). This indicates that regulation of phaseolotoxin biosynthesis is similar in both strains 1448A and NPS3121. Although phenotypes

shown by insertional mutants in *gacA* might be due to polar effects on *uvrC* (O'Malley et al., 2019), abolition of phaseolotoxin biosynthesis in strain *gacS::IS* indicates that the corresponding genes are controlled by the GacS/GacA system in strain 1448A.

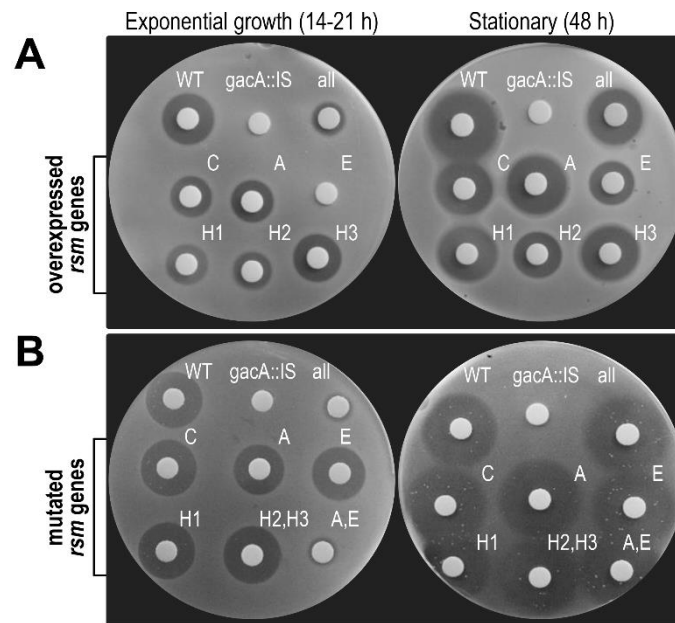


Figure 27. Differential role of the Rsm homologues on phaseolotoxin biosynthesis. **(A)** Biosynthesis of phaseolotoxin by derivatives of *P. amygdali* pv. phaseolicola 1448A overexpressing different *rsm* genes or **(B)** containing mutations inactivating one, two or all (all, strain Mut-7-rsm) of the seven *rsm* homologues. WT, wild type strain 1448A; *gacA::IS*, a *gacA*-minus transposon mutant of strain 1448A. Strain labeled as H2,H3 (strain ΔpA) is lacking alleles *rsmH2* and the two copies of *rsmH3*. Toxin production was evidenced as haloes of growth inhibition in an *E. coli* indicator assay. Pictures are representative of three independent experiments.

4.3.6.2 Overexpression of *rsmE* suppresses phaseolotoxin synthesis only in exponentially growing cultures

To confirm that the Rsm products repress the expression of the Tox cluster, and to disclose any possible specificity, we overexpressed the different *rsm* homologues in strain 1448A. We separately cloned each of the homologues with sufficient upstream sequences in pJN105 (Newman & Fuqua, 1999); in this vector, they could be expressed from their own promoter, or highly overexpressed from the regulatable P_{BAD} promoter of pJN105 by induction with arabinose. After transferring the clones to strain 1448A, we evaluated the biosynthesis of phaseolotoxin in media with and without arabinose, obtaining similar results in both cases (data not shown).

Overexpression of *rsmE* completely suppressed the production of phaseolotoxin by strain 1448A at 18 °C at early stages of growth (approx. 14–21 h; OD₆₀₀ of 0.2–0.3) (Figure 27A). This repression, however, was partially

alleviated in cultures grown for approximately 48 h ($OD_{600} > 1$). A possible increased level of *rsmY* expression with increasing cell density, which was shown to occur in *P. fluorescens* and *P. syringae* pv. tomato (Valverde et al., 2003; Nakatsu et al., 2019), might contribute to sequestration of Rsm proteins in stationary phase and likely participate in the repression alleviation. In turn, homologues *rsmC*, *rsmH1* and *rsmH2* repetitively lead to a small decrease in the production of phaseolotoxin. Additionally, we did not observed biosynthesis of phaseolotoxin at 28 °C by any of the strains and all haloes were reverted by supplementation with citrulline but not with ornithine (data not shown); since phaseolotoxin specifically blocks the conversion of ornithine to citrulline (Arrebola et al., 2011), this indicates that the haloes were produced by phaseolotoxin. These results agree with a previous report that overexpression of *rsmA* from *P. aeruginosa* PAO1 in Pph NPS3121 abolished production of phaseolotoxin (Kong et al., 2012), suggesting that RsmE, and RsmC, RsmH1 and RsmH2 to a minor degree, might repress toxin biosynthesis. However, they are somewhat unexpected because RsmA from Pph 1448A shows a very high identity to RsmA from strain PAO1 (accession no. NP_249596; 80.7 % id.), but had no activity as repressor (Figure 27A), whereas RsmE is less similar (63.5% id.) but leads to a strong repression (Figure 27A).

4.3.6.3 Double *rsmA*–*rsmE* mutants are unable to synthesize phaseolotoxin only in exponentially growing cultures

To further examine their role, we also evaluated the biosynthesis of phaseolotoxin by strains with mutations in one or more *rsm* homologues (Figure 27B). We observed no significant variation in the amount of phaseolotoxin synthesized at 18 °C by strains containing only one defective *rsm* homologue or with different combinations of mutations in *rsmC*, *rsmH1*, *rsmH2* and *rsmH3* (Figure 27 and data not shown). In turn, derivatives lacking both homologues *rsmA* and *rsmE* showed a marked reduction in the production of the toxin in early stages of growth (Figure 27B). However, supernatants from stationary cultures produced inhibition haloes that were indistinguishable from those produced by the wild-type strain. A strain lacking the seven *rsm* homologues showed the same phenotype to strain *rsmA*Ω-Δ*E*. Finally, there was no production of phaseolotoxin by the wild-type strain or any of the *rsm* mutants at 28 °C (data not shown). This regulatory activity resembles that for the biosynthesis of the phytotoxin coronatine by *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Ge et al., 2019). In strain DC3000, individual mutations in genes *rsmA* and *rsmE* reduced the expression of genes for the biosynthesis of coronatine, which was further reduced in a double *rsmA*–*rsmE* mutant, whereas gene *rsmD* (*csrA4*) has a minor role in regulation that is only noticeable in the absence of *rsmA* and *rsmE*. It is therefore feasible that the biosynthesis gene clusters for other phytotoxins that also depend on the GacS/GacA system in *P. syringae*, such as syringomycins (Hrabak & Willis, 1993), mangotoxin (Carrión et al., 2012), or tabtoxin (Barta et al., 1992), are also redundantly induced by RsmA and RsmE.

Previous results (Kong et al., 2012) and our own data from overexpression experiments (Figure 27A) suggest that RsmE, and to a lesser extent RsmC, RsmH1, and RsmH2, might act as repressors of phaseolotoxin biosynthesis. However, this is in potential conflict with results from the analysis of mutant strains (Figure 27B) indicating the opposite effect, with a role of RsmA and RsmE as activators of toxin synthesis. This behavior mirrors the opposing phenotypes observed from overexpression or mutation of *rsmA* in *P. aeruginosa* PAO1 (Pessi et al., 2001) or of *rsmA* and *rsmE* in *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019), and further suggests that the cellular concentrations of the Csr/Rsm proteins are critical for proper regulation. The effects seen from gene overexpression might therefore be artefactual because of an abnormally high concentration of the regulator. Among other possible effects, this could lead to non-specific interactions or de-stabilization of the relative concentrations of the different molecules involved in regulation, for instance by titration of sRNAs targeting Rsm or other proteins.

In summary, our results indicate a differential role of the Rsm homologues on the regulation of phaseolotoxin biosynthesis in strain 1448A, with RsmA and RsmE redundantly activating it at 18 °C, at least in the early stages of growth. These proteins are however not essential, and derivative strains of 1448A containing diverse combinations of mutations or lacking all seven *rsm* gene homologues were still able to synthesize phaseolotoxin in a thermoregulated way (Figure 27). Therefore, thermoregulation of phaseolotoxin biosynthesis in Pph 1448A should depend on an as yet unidentified molecule, whose activity appears to be also dependent on the GacS/GacA system because a *gacA* mutant of Pph 1448A does not produce phaseolotoxin (Figure 27) (De la Torre-Zavala et al., 2011). This putative molecule is likely a repressor of phaseolotoxin biosynthesis because possession by Pph of multiple copies of *rsmY* allowed for phaseolotoxin biosynthesis at 28 °C (Rowley et al., 2000; Valverde et al., 2003). The existence of such regulatory molecule is likely, because there are several bacterial species that possess the GacS/GacA system but no *csr/rsm* genes (Sobrero & Valverde, 2020), suggesting that in these cases the GacS/GacA-mediated gene regulation will likely depend on other regulatory molecule(s).

4.4 Conclusions

Pseudomonas amygdali pv. phaseolicola 1448A contains seven *rsm* homologues, four of which (*rsmA*, *rsmC*, *rsmE*, and *rsmH1*) are chromosomal and three (*rsmH2* and two copies of *rsmH3*) are located in the virulence plasmid p1448A-A. Our results indicate that these genes have a degree of specialization and a differential regulation. Gene *rsmC* might have a detrimental activity for diverse bacteria from genomospecies 2 (*P. amygdali*), including strain 1448A, because their *rsmC* copies contain independent insertions of ISPsy17 in the 3' end that eliminate key residues for protein activity. An RNA-seq analysis indicates that homologues *rsmA*, *rsmC*, *rsmH1*, and *rsmH2* are not thermoregulated and

that GacA does not influence their transcription rate. Conversely, mRNA levels of gene *rsmE* are significantly higher at 18 °C. The expression of *rsmE* and of the seven sRNA genes of strain 1448A at 18 °C appear to be dependent on GacA, because their mRNA levels were significantly reduced at 18 °C in a *gacA* mutant. Regulation of sRNAs, however, is complex, because the expression of *rsmZ*, but not of the other sRNAs, did not depend on GacA at 28 °C; additionally, only *rsmX1*, *rsmX4*, *rsmX5* and *rsmZ* showed thermoregulation, with increased mRNA levels at 28 °C.

In functional assays with strains containing mutations in one or more *rsm* homologues, we could associate altered phenotypes only to strains with mutations in both *rsmA* and *rsmE*. A double *rsmA-rsmE* mutant did not induce the typical water-soaking in detached bean pods and elicited only mild symptoms in bean leaves, reaching bacterial populations that were around one order of magnitude lower than the wild-type strain. This reduced virulence is likely due, at least in part, to the reduced mRNA levels in the mutant of genes *hrpL* and *hrpA*, which are key regulators of the expression of the type III secretion system (Y. Xie, Shao, & Deng, 2019). The double mutant was non-motile and showed abnormal growth patterns in diverse culture media. RsmA (CsrA2) and RsmE (CsrA3) also play similar regulatory roles in *P. syringae* pv. tomato DC3000, probably derived from their high sequence conservation among pseudomonads (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019). Nevertheless, there appear to be strain-specific adaptations in their regulatory behavior. In particular, RsmA and RsmE exert non-redundant functions in strain DC3000, with individual mutations in *rsmE* having a significant impact in virulence, motility and carbon source utilization, among other phenotypes. In strain 1448A, however, we were able to detect changes in these phenotypes only in strains with mutations in both *rsmA* and *rsmE* genes.

Finally, our results show that Rsm proteins are not repressors of the biosynthesis of phaseolotoxin. Rather, RsmA and RsmE redundantly induce the biosynthesis of this phytotoxin at 18 °C. However, the corresponding genes are not essential, and a double *rsmA-rsmE* mutant is still able to synthesize phaseolotoxin at 18 °C, although only in cultures reaching high population densities. Biosynthesis of the toxin by 1448A is dependent on GacA and is thermoregulated, even in a derivative strain with no functional *rsm* genes. Therefore, these results suggest that the biosynthesis of phaseolotoxin is repressed at 28 °C by a yet unidentified molecule. This putative molecule is apparently integrated into the GacS/GacA regulatory system and has previously been shown to be antagonized by overexpression of the sRNA *rsmY* (Rowley et al., 2000).

4.5 Supplementary material

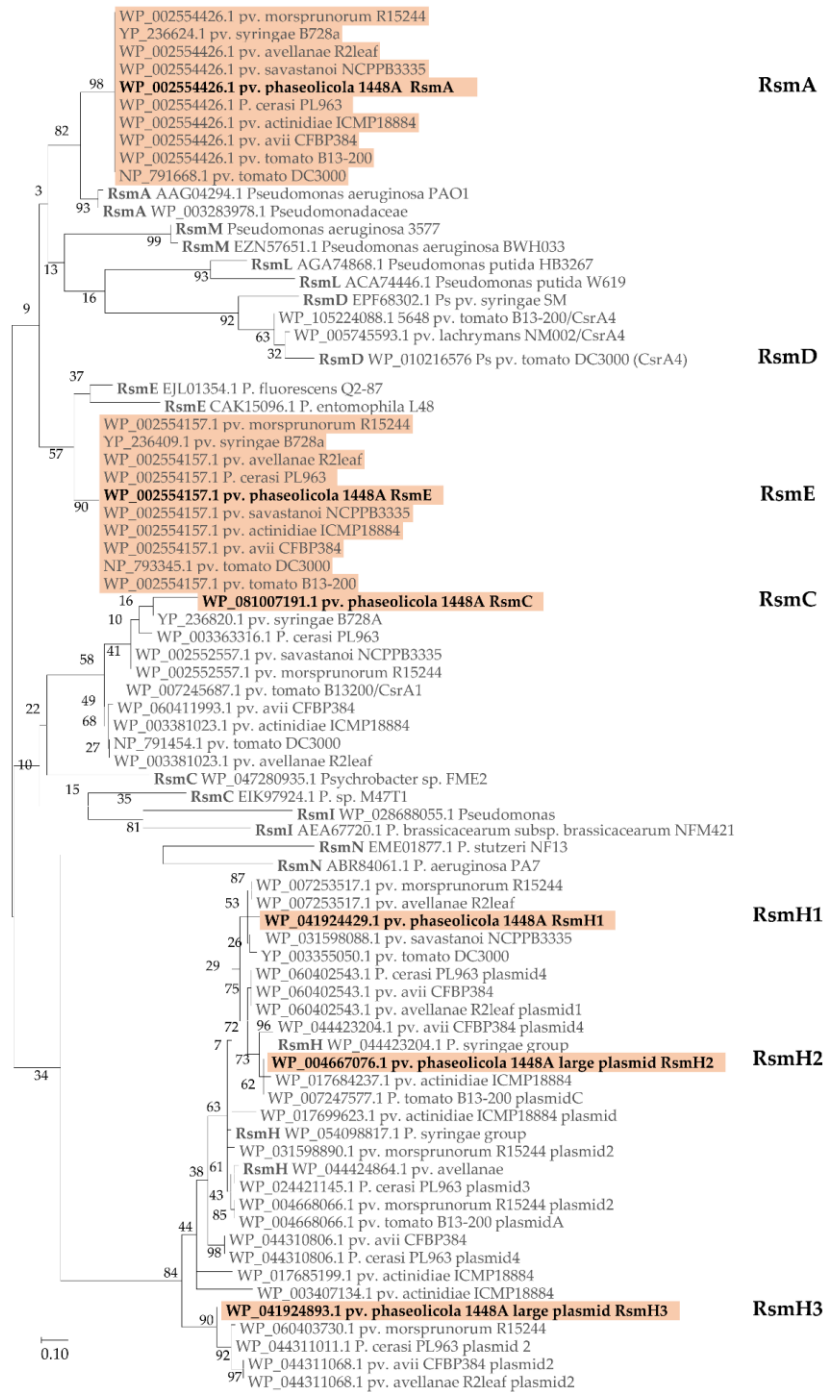


Figure S1. Phylogeny of Rsm proteins from selected strains of *Pseudomonas syringae sensu lato* and assignment to subfamilies. The Rsm proteins present in each genome were identified by Blastp comparison using as query the Rsm proteins from Pph 1448A and RsmD from *P.s.* pv. tomato DC3000; all the identified proteins were included to construct the tree plus two or three representative proteins from each of the 9 Rsm subfamilies (Sobrero & Valverde, 2020). For simplicity, strains previously classified as *P. syringae* are indicated only by their pathovar and strain assignment. Protein alignment with Muscle, identification of the best model and construction of the maximum likelihood tree, using the JTT model with a discrete Gamma distribution with five categories and using all sites, were done with MEGA7 (S. Kumar et al., 2016). Orange highlighting, proteins from strain Pph 1448A or identical to them in each clade. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Numbers in branches indicate per cent bootstrap values with 200 replicates. To the right, name of the previously defined phylogenetic Rsm subfamilies (Sobrero & Valverde, 2020).

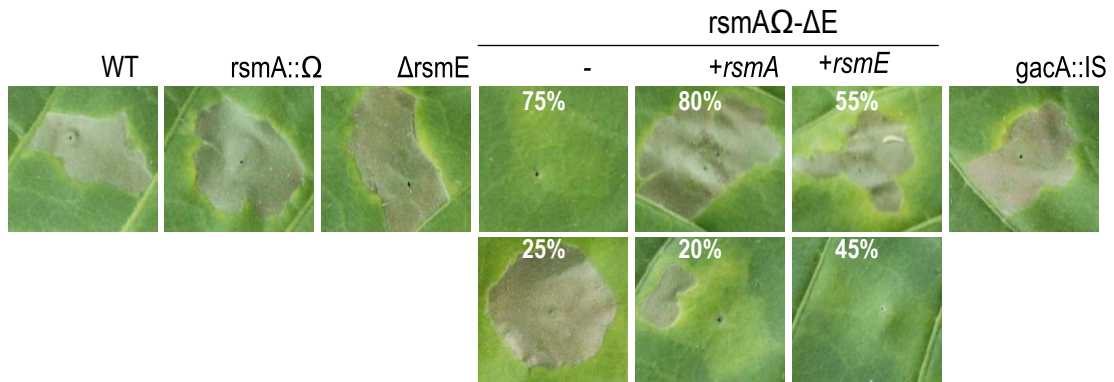
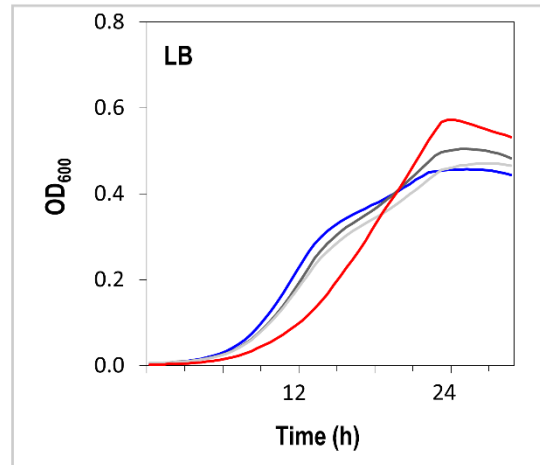


Figure S2. Effect of different *rsm* homologues from *P. amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A on the elicitation of the hypersensitive response on tobacco leaves. Results are representative from at least 25 inoculations on at least four different plants. For mutants inducing different types of reaction, it is shown the percentage of each type.

Rich Medium



Minimal Media

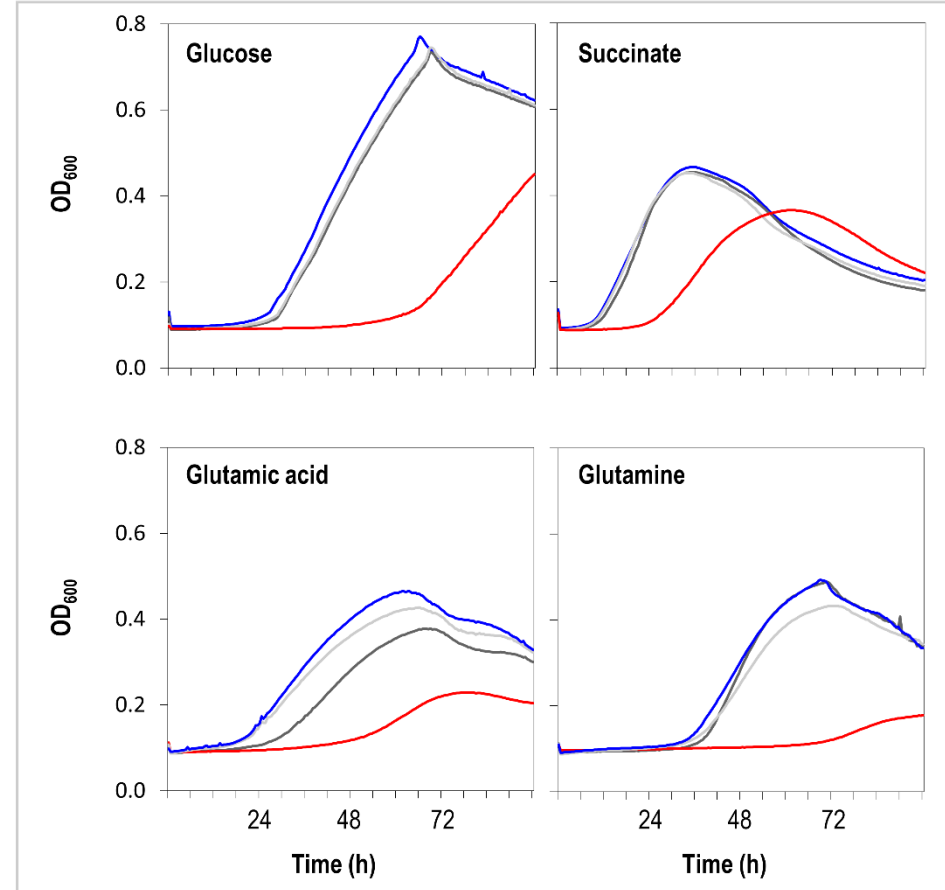


Figure S3. Growth curve of *P. amygdali* pv. phaseolicola 1448A and derivative mutants in LB or minimal media with different carbon sources. Cells were inoculated at 5×10^6 cfu/mL (for LB) or 5×10^7 cfu/mL (for minimal media) in 48-well plates, and incubated at 28 °C with continuous shaking in the multi-Detection Microplate Reader (Synergy HT; Biotek Instruments, Winooski, USA), which recorded OD₆₀₀ reads every 30 minutes. Each value is the average from three to six technical replicates. Carbon sources were added at 0.4 % (w/v) to HSC base minimal medium; for succinate, cells were grown in minimal medium SSM. Graphs are from one representative experiment out of three with similar result.

Table S3. Bacterial strains and plasmids used in this study^a

Strain/plasmid	Main features ^b	Reference or source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
NEB10β	$\Delta(mrr-hsdRMS-mcrB)$ <i>deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU galK</i> $\lambda^- rpsL nupG$</i>	(S. G. N. Grant et al., 1990)
CECT831	Strain sensitive to phaseolotoxin, used as indicator for phaseolotoxin production bioassays	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
<i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>phaseolicola</i>		
UPN1160	1448A <i>rsmH1-fsX</i>	This work
UPN1164	Derives from UPN1162; <i>rsmH1-fsX</i> $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
UPN1166	Derives from UPN1162; $\Delta rsmE$ $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
UPN1176	Derives from UPN1168; $\Delta rsmE$ <i>rsmH1-fsX</i>	This work
UPN1184	Derives from UPN1176; $\Delta rsmC$ $\Delta rsmE$ <i>rsmH1-fsX</i>	This work
UPN1185	Derives from UPN1166; $\Delta rsmC$ $\Delta rsmE$ $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
UPN1186	Derives from UPN1162; $\Delta rsmE$ <i>rsmH1-fsX</i> - $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
UPN1226	Derives from UPN1162; <i>rsmA::Ω</i> $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
UPN1228	Derives from UPN1166 $\Delta rsmE$ <i>rsmA::Ω</i> $\Delta rsmH2$ $\Delta rsmH3-1$ $\Delta rsmH3-2$	This work
Plasmids		

pSCR001	10,571 bp, GenBank accession no. DQ059989 , carrying the minitransposon IS-Ω-Km/hah; Km ^R	(Giddens et al., 2007)
pHP45Ω	Broad-host-range plasmid, source of the Ω fragment (Sp ^R /Sm ^R)	(Prentki & Krisch, 1984)
pJET1.2	<i>E. coli</i> cloning vector 2.9 kb, Amp ^R	Thermo Fisher Scientific
pJN105	Broad-host-range expression vector, carries the <i>L-arabinose-inducible E. coli araBAD promoter and the araC regulator</i> , Gm ^R	(Newman & Fuqua, 1999)
pJNA1	pJN105 with a 533 pb fragment containing the <i>rsmC</i> gene flanked by EcoRI and SacI restriction sites; Gm ^R	This work
pJNA2	pJN105 with a 488 pb fragment containing the <i>rsmA</i> gene flanked by EcoRI and SacI restriction sites; Gm ^R	This work
pJNA3	pJN105 with a 1118 pb fragment containing the <i>rsmE</i> gene flanked by EcoRI and SacI restriction sites; Gm ^R	This work
pJNA5	pJN105 with a 583 pb fragment containing the <i>rsmH1</i> gene flanked by PstI and SacI restriction sites; Gm ^R	This work
pJNA6	pJN105 with a 723 pb fragment containing the <i>rsmH2</i> gene flanked by PstI and SacI restriction sites; Gm ^R	This work
pJNA7	pJN105 with a 689 pb fragment containing the <i>rsmH3</i> gene flanked by EcoRI and SacI restriction sites; Gm ^R	This work
pK18 <i>mobsacB</i>	Mobilizable cloning vector, confers sucrose-dependent lethality; Km ^R , Suc ^S	(Schäfer et al., 1994)

^a See Table 1 in the main text for other relevant strains. ^b Abbreviations: Amp, ampicillin; Km, kanamycin; Gm, gentamicin; Sp, spectinomycin; Suc, sucrose. Superscripts R and S denote resistance or susceptibility, respectively. Letter Ω specifies insertion of the Ω fragment in the indicated gene (see plasmid pHP45Ω for details).

Table S4. List and application of primers used in this work.

Primer name and purpose	Sequence (5'→3') ^a	5' position ^b	Remarks
Construction of <i>csrA</i> mutations			
rsmC_F_ext	TGCCGACTACATCTTCAGGC	1,744,292	Complete deletion of <i>rsmC</i> and ISPsy17, from 1745318-1746971
rsmC-left_R	<u>actagt</u> CAGTAACGCCCTTCAAACGC	1,745,317*	
rsmC-right_F	<u>actagt</u> CGACGTTGTTGCGCCTCATTG	1,746,972	For insertion of the Ω fragment into the unique <i>BclI</i> site of <i>rsmA</i> ; truncates the product after amino acid 13, position 1,882,019
rsmC-right_R	<u>actagt</u> CGTCGATCTGTTGTTTCCGC	1,748,633*	
rsmA_R-mut	ATGTTCACTACTCTCGGCTG	4,045,687	
rsmA_F-mut	GCAAATACAACGTCCCGCTG	4,047,554*	
rsmE-left_F	GGTGTTTCATTGTTGCCCGTC	3,777,563	Complete deletion of <i>rsmE</i> , from 3,778,776-3,779,364
rsmE-left_R	<u>actagt</u> TCTCGGCATGAGTGTAAGCG	3,778,775*	
rsmE-right_F	<u>actagt</u> TAATTGCTGCCTAACCCGCC	3,779,365	
rsmE-right_R	<u>actagt</u> CCTTTGGAAACTCGGCAGC	3,780,522*	
rsmH1_F-mut	CACTGTAGCAGTACGGGGAC	894,653	To fill-in the unique <i>EcoRI</i> site in <i>rsmH1</i> , truncating the product after amino acid 18; position 895,777
rsmH1_R-mut	CTTTCGATCAACCACGCAGC	896,615*	
Cloning of <i>csrA</i> genes for overexpression and complementation			
rsmC_1504_F	<u>gaattc</u> TATGCAGGACGAGCCTATG	1,745,054	

Primer name and purpose	Sequence (5'→3') ^a	5' position ^b	Remarks
rsmC_1504_R	<u>gagctc</u> CCAGACCGAGCTGGTAAAAC	1,745,567*	
rsmA_3510_R	<u>gagctc</u> ACCCTTTTCCCGTTTGC	4,046,581	
rsmA_3510_F	<u>gaattc</u> CCGTGGTCATCGAAGAGAAG	4,047,068*	
rsmE_3260_F	<u>gaattc</u> GCTCAGATCAACCCGATCAT	3,778,194	
rsmE_3260_R	<u>gagctc</u> GCCAGTAAATGGCAAATCAA	3,779,311*	
rsmH1_0763bis_F	<u>ctgcag</u> CCAAACGTAAAGTCGCACTG	895,401	
rsmH1_0763bis_R	<u>gagctc</u> TTGTGCTCCTGATCTGGTTG	895,962*	
rsmH2_A0105_F	<u>ctgcag</u> GGTGCTGTGCCAGAAATACC	91,582*	
rsmH2_A0105_R	<u>gagctc</u> TACTGCGCGGCTATGTAATG	90,879	
rsmH3_A0073_F	<u>gaattc</u> CACGAGAAAAGACAGGTCCAC	5,618*	
rsmH3_A0073_R	<u>gagctc</u> AGCGAAATACCCACGGAAG	61,720	
Real time quantitative PCR			
gyrA_F	CGAGCTGAAGCAGTCCTACC	4,214,791*	
gyrA_R	CGGATTTCTTGTACGGCTTG	4,214,637	
qhrpL_F	GCGCAACGAGCACAAGTTT	1,505,838	
qhrpL_R	GGTTCAACGCAATACCACACAA	1,505,905*	

Primer name and purpose	Sequence (5'→3') ^a	5' position ^b	Remarks
qhrpA_F	CAGGGTATCAACAGCGTCAAGA	1,487,675	
qhrpA_R	GCTACCCGTGTTTTTGGTCAGT	1,487,740*	
qhrpR_F	CCCGAATCGTTGGCAGAA	1,485,848	
qhrpR_R	CGAGCGCGGCAGACA	1,485,918*	
qFliC_F	TCCGCCAGCACCATGACTTTCC	3,920,267*	
qFliC_R	TCACAGCCGAACCGACACCC	3,920,174	
Other purposes			
pk18mob_R	caggaaacagctatgaca		Analysis of inserts

^a Restriction sites introduced in primers to facilitate cloning are in underlined lowercase. ^b The coordinates of the annealing point of the first nucleotide of each primer is indicated. Unless otherwise indicated in the remarks column, coordinates are for the genome of strain 1448A (accession no. NC_005773). Asterisks indicate that the primer anneals in the reverse strand.

Table S5. Characteristics of the *rsm* genes from *Pseudomonas amygdali* pv. phaseolicola 1448A and their products, with homologues in *P. syringae* pv. tomato DC3000 and *P. syringae* pv. *syringae* B728a

Gene ^a	nt	aa	Locus tag	Old locus tag	Other names in Pto DC3000 ^b	Protein accession number in <i>P. amygdali</i> / <i>P. syringae</i> pathovars		
						phaseolicola 1448A	tomato DC3000	<i>syringae</i> B728a
rsmA	189	62	PSPPH_RS17770	PSPPH_3510	csrA2/ rsmA2	WP_002554426	WP_002554426	WP_002554426
rsmC	150	49	PSPPH_RS28320	PSPPH_1504	csrA1/ rsmA1	WP_081007191	WP_003381023	WP_003402536
rsmD	- ^c	-	-	-	csrA4/ rsmA4	-	WP_010216576	-
rsmE	189	62	PSPPH_RS16510	PSPPH_3260	csrA3/ rsmA3	WP_002554157	WP_002554157	WP_002554157
rsmH1	225	74	PSPPH_RS03905	- ^d	csrA5/ rsmA5	WP_041924429	WP_011103313	-
rsmH2 ^e	237	78	PSPPH_RS26950	PSPPH_A0105	-	WP_004667076	-	-
rsmH3 ^e	225	74	PSPPH_RS26520 PSPPH_RS26805	PSPPH_A0007 PSPPH_A0073	-	WP_041924893	-	-

^a Rsm subfamilies as described (Sobrero & Valverde, 2020); genes were assigned to the RsmH subfamily because they clustered closely to RsmH-type proteins in a maximum likelihood tree reconstructed using sequences and methods described in Sobrero and Valverde (Sobrero & Valverde, 2020) (see Supplementary Figure S1). ^b As designated previously (Ferreiro et al., 2018; Ge et al., 2019). ^c -, not present. ^d This gene was not annotated in the earlier versions of the genome. ^e Genes *rsmH2* and *rsmH3* are located in plasmid p1448A-A; *rsmH3* is present in two identical copies, within a 4,133 nt repeated fragment.

5 Capítulo III

Influencia de la temperatura y del sistema GacS/GacA en el transcriptoma de *P. syringae* pv phaseolicola 1448A.

5.1 Introducción

Debido a la alta relación superficie/volumen de las células procariotas, la temperatura es uno de los factores externos de mayor efecto sobre el metabolismo primario y secundario de estas (Konkel & Tilly, 2000; Smirnova et al., 2001; Klinkert & Narberhaus, 2009). En patógenos de animales, la estricta regulación por temperatura de muchos genes de virulencia, permite al patógeno economizar el gasto de energía que implica el proceso infectivo (Smirnova et al., 2001). Esta termorregulación puede producirse de diversas formas, siendo una de ellas a través de sistemas de regulación de dos componentes, como es el ejemplo de BvgS/BvgA en *Bordetella pertussis* (Konkel & Tilly, 2000).

En comparación con patógenos de animales, la influencia de la temperatura solo se ha estudiado en algunas bacterias patógenas de plantas como *Agrobacterium tumefaciens* (S. Jin et al., 1993), especies de *Erwinia* (Smadja et al., 2004; Santander & Biosca, 2017), o *Pseudomonas syringae* (Van Dijk et al., 1999; Hockett et al., 2013, 2014; Arvizu-Gómez, Hernández-Morales, Aguilar, et al., 2013), en las cuales, generalmente se induce la expresión de genes asociados a la patogénesis y virulencia a temperaturas menores, que las respectivas temperaturas óptimas para el desarrollo de las poblaciones bacterianas (Smirnova et al., 2001; Klinkert & Narberhaus, 2009). Estos genes de virulencia suelen estar relacionados con enzimas degradadoras de la pared celular, fitotoxinas, movilidad, producción de exopolisacáridos, o la expresión del sistema de secreción de tipo III y efectores (Smirnova et al., 2001; Humair et al., 2009; Hockett et al., 2013; Arvizu-Gómez, Hernández-Morales, Aguilar, et al., 2013).

En diversas especies de bacterias Gramnegativas fitopatógenas, algunos de estos factores de virulencia están controlados a su vez por el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA. Estos factores de virulencia pueden implicar la producción de enzimas degradadoras de la pared celular, la producción de exopolisacáridos, o la producción de fitotoxinas, que de forma general influyen en la capacidad y grado de producción de síntomas en planta (Heeb & Haas, 2001; Cui et al., 2001; Lebeau et al., 2008; Shi et al., 2009). Este sistema está muy conservado entre las especies de *Pseudomonas*, e igualmente se han identificado sistemas homólogos en otros géneros, como son *Escherichia*, *Vibrio*, *Legionella*, *Erwinia*, *Azotobacter*, y *Salmonella* (Heeb & Haas, 2001). El papel de GacS/GacA ha sido ampliamente estudiado en diferentes especies del complejo *P. syringae*, y no ha sido posible establecer un modelo o patrón común debido a que el regulón de este sistema difiere entre las distintas patovares estudiadas (Barta et al., 1992; Rich et al., 1994; Chatterjee et al., 2003a; Marutani et al., 2008; Ortiz-Martín et al., 2010; De la Torre-Zavala et al., 2011; Cha et al., 2012b; L. Zhang et al., 2018).

P. syringae pv. phaseolicola (Pph) causa en judía (*Phaseolus vulgaris*) la enfermedad denominada grasa de la judía, cuyo desarrollo se ve favorecido a temperaturas moderadas (por debajo de 25 °C) (Smith et al., 1992; Allen et al., 1998; Singh & Schwartz, 2010). El patógeno sintetiza la toxina faseolotoxina a temperaturas bajas (18-20 °C), inhibiéndose la síntesis de esta a temperaturas más altas (28 °C) (Mitchell, 1976; Nüske & Fritsche, 1989; Aguilera et al., 2007). Igualmente, la regulación de esta toxina es dependiente del sistema GacS/GacA, puesto que una cepa que contengan los genes *gacS* o *gacA* mutados no sintetiza la faseolotoxina a 18 °C (De la Torre-Zavala et al., 2011). La faseolotoxina es una toxina antimetabolito que inhibe las rutas de síntesis de arginina y poliaminas (Ferguson et al., 1980; Bachmann et al., 1998; Arrebola et al., 2011). Dada la importancia de la temperatura y del sistema de regulación GacS/GacA en el ciclo de vida de las bacterias, en este capítulo se aborda la identificación de genes regulados por estos factores, así como la relación entre ambos, en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (Pph 1448A). Mediante el estudio de los transcriptomas de la cepa silvestre 1448A (WT) y de una cepa mutante en el gen *gacA* (*gacA::IS*), se observó que la temperatura influye en la expresión de un número pequeño de genes, importantes tanto para su supervivencia como para la colonización de la superficie foliar, siendo la vía principal de señalización para dichos genes el sistema GacS/GacA.

5.2 Material y métodos

5.2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Para este trabajo se utilizó una cepa silvestre Pph 1448A (WT) y una cepa con el gen *gacA* mutado (*gacA::IS*) por la inserción del transposón IS- Ω -Km/hah. La construcción de este mutante se detalla en el Material y Métodos del Capítulo II de esta Tesis, y las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla S3. Las cepas de *Pseudomonas* se propagaron de forma rutinaria a 28 °C en medio B de King (KMB) (King et al., 1954). Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) que se utilizaron para los experimentos de conjugación fueron cultivadas de forma rutinaria en medio LB (Sambrook et al., 1989) a 37 °C. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con los siguientes antibióticos (concentraciones finales expresadas en $\mu\text{g ml}^{-1}$ para las cepas de *Pseudomonas/E. coli*): kanamicina (Km) 25/50 y nitrofurantoína (Nf) 100. Para la extracción de ARN, las cepas de *Pseudomonas* se cultivaron a 18 °C y 28 °C en medio líquido mínimo estándar con succinato (SSM) (Meyer & Abdallah, 1978).

5.2.2 Técnicas moleculares y bioinformática

Se emplearon los programas informáticos Artemis y ACT para la visualización y manipulación de secuencias (Carver et al., 2008). Las comparaciones de secuencias y la búsqueda de proteínas homólogas se realizó empleando los algoritmos de BLAST. Los alineamientos de las secuencias se realizaron

utilizando el programa online MultAlin (Corpet, 1988)(<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) o las herramientas del servidor de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>).

5.2.3 Extracción de ARN

Tres colonias independientes de la cepa WT y de la cepa *gacA::IS* se crecieron durante 16 h en medio mínimo líquido SSM en agitación (200 rpm) a 28 °C, con el fin de disponer de tres réplicas del experimento para cada cepa. A continuación, cada uno de estos cultivos fueron diluidos en el mismo medio hasta ajustar a una $DO_{600} = 0.1$, y se dejaron crecer, a 18 °C o 28 °C, hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.7$. Seguidamente, las células de cada réplica biológica se centrifugaron a 6000 rpm a 4 °C, y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. De una de las réplicas biológicas, por cada cepa y temperatura, se tomaron unos 200 μ l del sobrenadante para la realización de un bioensayo de toxinas, tal como se describe en el apartado Material y Métodos del Capítulo II.

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep, usando un molino de bolas para lisar las células. Posteriormente, se utilizó el kit Turbo DNA-free DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA) para la degradación del ADN contaminante en las muestras. En geles de agarosa al 2 %, todas las muestras presentaron bandas claras de ARN ribosómico 23S y 16S. La concentración de ARN se cuantificó usando un espectofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

Del ARN extraído, y previo a la realización del ARNseq, se analizó la expresión del gen *phtA* mediante RT-qPCR. Como gen de control interno y para la normalización de los datos, se empleó la expresión de *gyrA*. Los primers utilizados se detallan en la Tabla S1.

5.2.4 ARNseq y análisis bioinformático

Para la realización de un ARNseq se enviaron dos muestras biológicas, por cepa y temperatura, al centro de Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga. La metodología empleada se detalla en el apartado de Material y Métodos del Capítulo II.

La cantidad de transcritos obtenidos tras la secuenciación fue medida en fragmentos por kilobase de fragmentos de gen por millón de lecturas (FPKM) y la expresión diferencial de un mismo gen entre diferentes condiciones (genotipo/temperatura) se analizó usando Cuffdiff (Trapnell et al., 2012), considerando un $p\text{-value} \leq 0.05$ como diferencias significativas.

5.3 Resultados

5.3.1 Preparación y evaluación de las muestras

Para evaluar la expresión de genes influenciados por la temperatura y por el sistema GacS/GacA en Pph 1448A, se extrajo ARN total de cultivos bacterianos en medio SSM de la cepa silvestre Pph 1448A (WT) y de un mutante en el gen *gacA* (*gacA::IS*), a dos temperaturas diferentes (18 °C y 28 °C). Si bien estas condiciones no permiten la inducción de genes relacionados con el sistema de secreción de tipo III (T3SS) (Huynh et al., 1989), importante para el desarrollo de la enfermedad en planta, sí permiten la biosíntesis de faseolotoxina, y por tanto se prevé la expresión de otros genes que pudieren estar relacionados con la patogénesis o virulencia (Arvizu-Gómez, Hernández-Morales, Aguilar, et al., 2013).

Se decidió utilizar la técnica de secuenciación de ARN (ARN seq) para la cuantificación del grado expresión génica de ambas cepas a las dos temperaturas. La expresión o represión de los genes que conforman el cluster para la biosíntesis de la faseolotoxina (cluster Tox) servirán como control de las condiciones estudiadas. En Pph NPS3121, el momento de mayor expresión de este cluster se produce cuando el patógeno alcanza una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.7-0.8 (Aguilera et al., 2007), por lo que, igualmente, se decidió que la extracción de ARN se llevara a cabo cuando las poblaciones alcanzaran una DO₆₀₀ de 0.7. De cada una de las muestras biológicas que se mandaron a secuenciar, se comprobó previamente la biosíntesis de faseolotoxina mediante un bioensayo de toxinas, y se cuantificó la expresión del gen *phtA* por RT-PCR (Figura 28). El cluster Tox se conforma de cinco unidades transcripcionales, donde los genes *phtABC* participan en la regulación de los operones *phtA*, *phtD*, *phtL* y *phtM*, tanto a 18 °C como a 28 °C (Aguilera et al., 2017). En el ensayo de biosíntesis de toxinas, solo las muestras de sobrenadante de los cultivos bacterianos de la cepa WT a 18 °C, dieron lugar al característico halo de inhibición del crecimiento de *E. coli*, debido a la presencia de la faseolotoxina (Figura 28 y

datos no mostrados). Así mismo, los niveles de expresión de *phtA* en la cepa WT a 18 °C fueron significativamente superiores al resto de muestras.

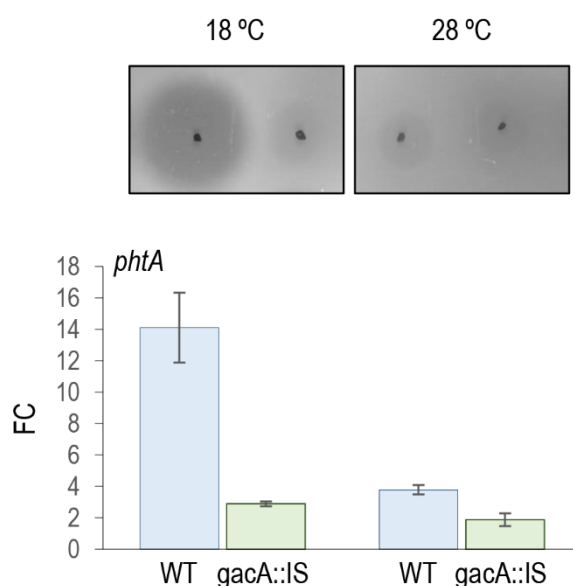


Figura 28. Síntesis de faseolotoxina en el medio SSM por *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A. A 18 °C, se observa el halo característico producido por la síntesis de faseolotoxina en la cepa WT. Por RT-PCR se midieron los niveles de expresión (FC) del gen *phtA* en las condiciones estudiadas para la realización del RNA-seq. Los datos fueron normalizados según los niveles de expresión del gen control interno *gyrA*. Los datos y la desviación estándar corresponden a la media de seis réplicas técnicas de dos réplicas biológicas.

Como parte del análisis de ARNseq, se obtuvieron valores de cambio de expresión (Log_2 FC o, para simplificar la lectura, FC) comparando los FPKM (ver Material y Métodos) de un mismo gen en dos condiciones diferentes. Por ejemplo, un valor FC positivo en una comparativa entre 18 y 28 °C indicaría un gen con mayor expresión a 18 °C y menor expresión a 28 °C, y un valor negativo indicaría un gen con menor expresión a 18 °C con mayor expresión a 28 °C. Por último, en cada uno de los análisis de este trabajo se consideró que existían diferencias significativas en la expresión de un gen cuando los valores de FC fueron ≤ -0.90 (expresión significativamente menor) o ≥ 0.90 (expresión significativamente mayor) con un p-value ≤ 0.05 (ver Material y Métodos).

5.3.2 Los genes termorregulados representan el 6 % del genoma de Pph 1448A

Pph 1448A contiene un total de 5.845 genes identificados en su genoma (RefSeq assembly accession: GCF_000012205.1), distribuidos entre el cromosoma (5.617 genes) (NC_005773.3), su plásmido A (pA) (166 genes) (NC_007274.1), y su plásmido B (pB) (62 genes) (NC_007275.1) (Joardar et al., 2005). Para la estimación del número de genes termorregulados, se analizaron

los transcriptomas de la cepa WT a 18 °C y 28 °C, y se determinaron un total de 356 genes con expresión diferencial (DEGs) (Figura 29).

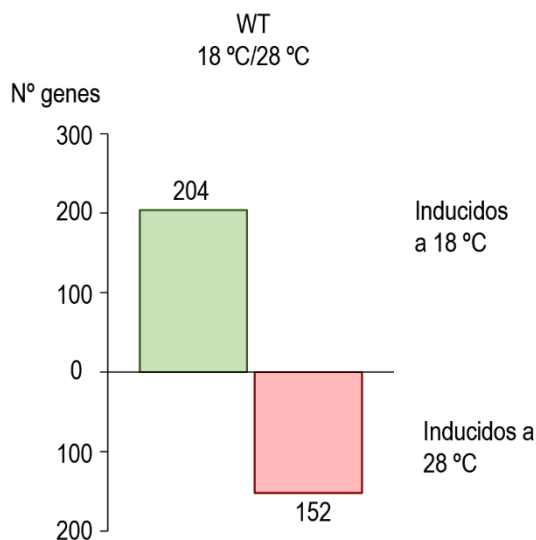


Figura 29. Número de genes con expresión diferencial a dos temperaturas en *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A.

Estos genes representan el 6 % del genoma, localizándose la mayoría de ellos (95.3%) en el cromosoma, y presentándose solo 15 genes en pA y dos en pB. En el cromosoma, los genes termorregulados se distribuyen de forma homogénea destacando algunas regiones pertenecientes a algún cluster u operón (Figura 30). Del total de estos genes termorregulados, 204 presentaron mayores valores de expresión a temperatura baja (18 °C) y 152 a temperatura alta (28 °C) (Figura 29), presentando la mayoría de ellos un FC entre 0.9 y 2, o -2 y -0.9 (Figura 30). Aun así, a ambas temperaturas hubo un pequeño número de genes cuyo FC fue mayor de 2 o menor de -2, los cuales se describirán más adelante.

Con el fin de determinar que tipo de funciones biológicas de la bacteria se veían afectadas por la temperatura, una gran parte de los DEGs (90%) fueron clasificados según las las diferentes categorías de los grupos ortólogos (COGs)

(Figura 31). Este proceso se realizó de forma manual y con ayuda del conjunto de información obtenido del programa DAVID (D. W. Huang et al., 2009).

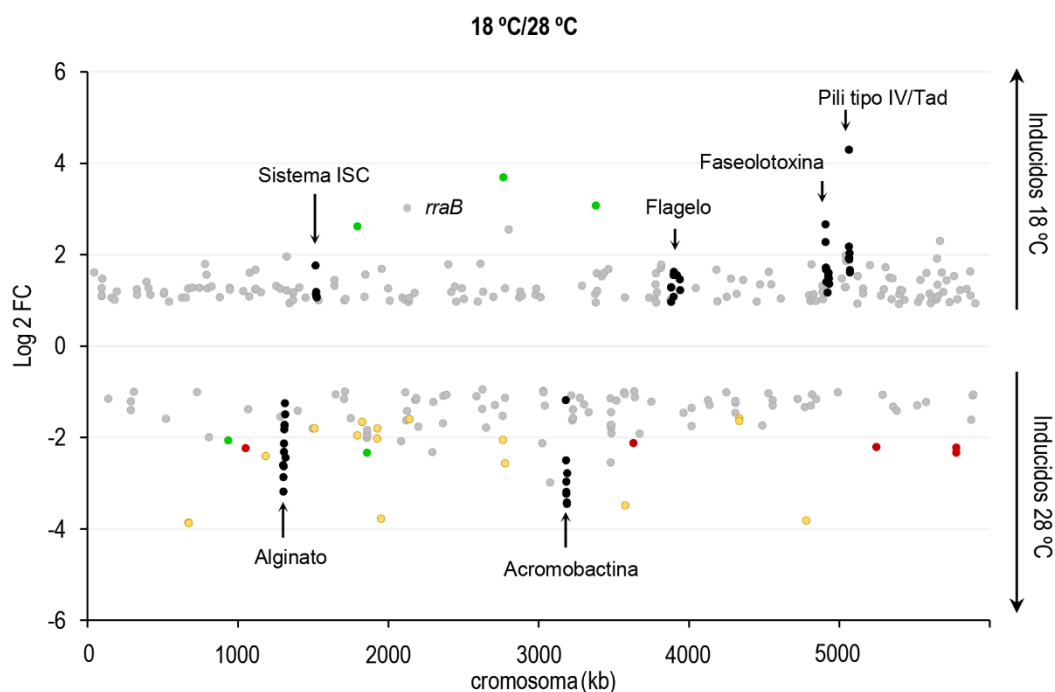


Figura 30. Localización en el cromosoma de los genes termorregulados en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A. En negro se marcan los principales genes seleccionados en este estudio, en amarillo los genes codificantes para ARNt, en rojo los genes codificantes para el ARN ribosomal 5S

En general, fueron divididos en 18 categorías de las 26 existentes. Cabe destacar que casi 20 % de los genes fueron clasificados en la categoría de proteínas con función desconocida, siendo así una de las categorías funcionales más representativa a ambas temperaturas, sobre todo a 18 °C (51 genes) (Figura 31). Teniendo en cuenta la poca información que se puede recabar de esta categoría funcional sobre el modo de vida de la bacteria, esta no se tuvo en cuenta en posteriores análisis. Así pues, a 18 °C la categoría funcional más representativa es mecanismos de transducción de señales (23 genes), seguido de movilidad celular (16 genes), y transporte y metabolismo de iones inorgánicos (14 genes). Aun así, se determinó un total 39 genes (19 %) distribuidos en diferentes categorías funcionales, implicados en la movilidad y la adherencia del patógeno en superficies, lo que sugiere ser un atributo importante a esta temperatura.

De igual forma, las categorías funcionales más representativas a 28 °C fueron traducción, biogénesis y estructura ribosómica (22 genes), biogénesis de la pared o membrana celular (14 genes), y biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (11 genes), implicando al 30 % de los genes inducidos a esta temperatura.

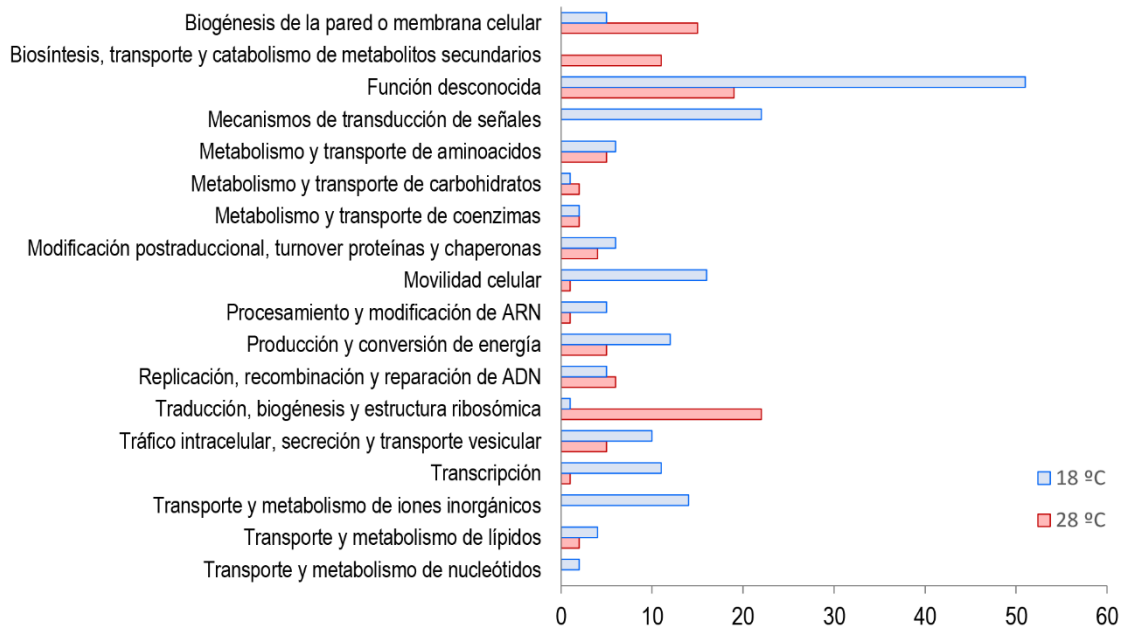


Figura 31. Clasificación de los genes termorregulados en categorías funcionales (COGs)

5.3.3 Genes inducidos a 18 °C.

De entre los genes inducidos a 18 °C, 11 presentaron un cambio de expresión mayor de 2, siendo el gen PSPPH_RS22415 el que mayor diferencia de expresión mostró ($FC > 4$). Este gen codifica para la proteína estructural Flp del pili tipo IV Tad, una subcategoría del pili tipo IV importante para la adherencia del patógeno a superficies (Giltner et al., 2012). El resto corresponden a genes codificantes para proteínas hipotéticas, biosíntesis del pili tipo IV Tad, y biosíntesis de la faseolotoxina. Por último, los genes PSPPH_RS09205 y PSPPH_RS12290 codifican para la proteína inhibidora B de la ribonucleasa E, RraB, y para una proteína con un dominio de la superfamilia DJ-1/Pfpl/ThiJ, respectivamente. RraB regula la abundancia de ARN mensajeros (ARNm) a través de su unión e inhibición de la actividad endonucleasa de RNasaE (Gao et al., 2006; Yeom et al., 2008), siendo RNasaE una ribonucleasa importante en el procesamiento y degradación de ARN en muchas bacterias (Mackie, 2013). El dominio DJ-1/Pfpl es característico de las proteínas pertenecientes a la superfamilia de proteínas DJ-1/Pfpl/ThiJ, siendo la proteína DJ-1 humana la más estudiada. Este dominio se caracteriza por contener un residuo cisteína muy conservado en una estructura de hélice conformando el núcleo catalítico (Wilson et al., 2004), pero se desconoce realmente cuál es su función en bacterias. Este grupo de genes no parece tener relación entre sí, y solo los genes pertenecientes a la síntesis del pili tipo IV Tad están asociados a una de las categorías funcionales mencionadas anteriormente, la movilidad celular.

Ya que se determinó un número importante (39) de genes asociados a la movilidad celular cuya expresión aumenta a 18 °C, se decidió hacer una breve descripción de estos en el siguiente apartado. Así mismo, en la categoría funcional de transporte y metabolismo de iones inorgánicos, se clasificaron genes relacionados con el metabolismo del hierro, los cuales también serán descritos en otro apartado, debido a la gran importancia de este mineral en el metabolismo de las bacterias.

5.3.3.1 Movilidad celular.

En diversas especies de *Pseudomonas syringae*, a temperaturas bajas, se ha observado la inducción de genes importantes para la movilidad, como genes para la biosíntesis del flagelo, o genes para receptores de la quimiotaxis (Hockett et al., 2013; Arvizu-Gómez, Hernández-Morales, Aguilar, et al., 2013; Clarke et al., 2016). En nuestros resultados, en la categoría funcional de movilidad celular se han agrupado genes para biosíntesis del flagelo (seis genes), biosíntesis del pilus tipo IVa (tres genes), y proteínas receptoras y de señalización de la quimiotaxis (cluster *che*), como son el cluster *che1* y *che2* (siete genes) (Clarke et al., 2016). Así mismo, se han identificado genes relacionados con la movilidad en otras categorías funcionales. En la categoría transcripción, se encuentra el gen *vfr/crp*, el cual codifica para una proteína transmembranal receptora de cAMP. Vfr interviene en la inducción o represión de la síntesis del flagelo y el pili tipo IV, según los niveles intracelulares de cAMP (Taguchi & Ichinose, 2013).

En la categoría de mecanismos de traducción de señales, se agrupan genes codificantes para proteínas metilo receptoras de señales químicas (MCP), y por tanto asociadas con los cluster *che*, y genes codificantes para proteínas asociadas al metabolismo del monofosfato dimérico cíclico de la guanosina (c-di-GMP). El c-di-GMP es un segundo mensajero en bacterias que, dependiendo de sus niveles intracelulares, interviene en el cambio entre un tipo de vida móvil o sésil (Hengge, 2009; Wu et al., 2014; Valentini & Filloux, 2016; Pfeilmeier et al., 2016).

A continuación se ofrece una breve descripción de los grupos de genes inducidos a 18 °C asociados con la movilidad (Tabla 8).

Biosíntesis del flagelo

Entre los genes inducidos a 18 °C del cluster para la biosíntesis del flagelo, se encuentran diversos genes codificantes para proteínas estructurales de la base del flagelo, como *fliQ* y *fliR*. Así mismo se induce la expresión de *fliC*, gen codificante de la proteína estructural principal que conforma el flagelo (Dasgupta et al., 2003; Nogales et al., 2015).

Quimiotaxis

La quimiotaxis permite a las bacterias detectar gradientes de moléculas químicas, interviniendo en la movilidad celular, en la adherencia a superficies, y en la colonización del huésped. Existen tres elementos conservados entre bacterias que conforman el complejo encargado de esta función. El primero son las MCP, las proteínas principales de captar diferentes estímulos químicos según su concentración en el medio, el segundo es la proteína histidina kinasa CheA, y el tercero, la proteína pareja de CheA, CheW (Z. Huang et al., 2019). En el transcriptoma de Pph 1448A a 18 °C se ha identificado la expresión diferencial de 10 genes que codifican MCPs, así como los genes *cheA1*, *cheW1*, *cheW2-1* y *cheW2-2*. *cheA1* y *cheW1* se localizan en un cluster diferente al de *cheW2-1* y *cheW2-2*, como ocurre en *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Clarke et al., 2016).

Metabolismo del c-di-GMP

Los niveles intracelulares de c-di-GMP varían según la actividad de proteínas con un dominio GGDEF, que se encargan de la síntesis, y de proteínas con un dominio EAL, que se encargan de la degradación de c-di-GMP. Generalmente una proteína con dominio GGDEF se denomina diguanilato ciclasa (DGC) mientras que una proteína con dominio EAL se denomina fosfodiesterasa (PDE) (Simm et al., 2004; Hengge, 2009). Así mismo, en una misma proteína pueden estar presentes ambos dominios, considerándose una proteína bifuncional DGC/PDE.

En nuestros resultados se han identificado tres CDSs con un dominio GGDEF. El producto deducido de una de ellas está anotado como una proteína DGC mientras que el producto de las otras dos están anotados como proteínas hipotéticas. Adicionalmente, se identificó tres CDS con dominio EAL, de las cuales, el producto de una de ellas está anotado como una proteína bifuncional DGC/EAL. Los productos de las otras dos CDSs están anotados como proteínas hipotéticas; sin embargo, estos productos también poseen dominios adicionales GGDEF, por lo que podrían ser también proteínas bifuncionales DGC/EAL.

Biosíntesis del pili tipo IV

Así mismo, y como ya se ha mencionado anteriormente, existe una expresión diferencial para los genes de síntesis del pili tipo IV, de dos subtipos diferentes. Por un lado, aumenta la expresión del gen *pilA*, el cual codifica para la proteína estructural principal del pili tipo IVa, relacionado tanto con la adherencia como con la movilidad tipo twitching (Mikkelsen et al., 2011; Giltner et al., 2012). Por otro lado, incrementa la expresión de ocho genes que conforman el cluster para la biosíntesis del pili tipo IV Tad, el cual está relacionado principalmente con la adherencia del patógeno a diversas superficies (Mikkelsen et al., 2011; Giltner et al., 2012). Así mismo, aumenta la expresión de *pilZ*, gen que codifica para una proteína de transducción de señales. Esta proteína actúa como un receptor de c-di-GMP, influyendo en la biosíntesis del pili tipo IV (Alm et al., 1996; Hengge, 2009; Guzzo et al., 2013).

5.3.3.2 Metabolismo del hierro en su forma ferrosa (Fe⁺²).

El hierro, en su forma ferrosa (Fe⁺²), es imprescindible para el correcto funcionamiento del metabolismo primario y secundario de las bacterias (Cornelis, 2010; Braun & Hantke, 2011), por lo que se evaluó la expresión diferencial de genes que intervinieran en su metabolismo o estuvieran asociados con sus niveles intracelulares. A 18 °C se determinó la expresión de genes pertenecientes al operón para la síntesis del sistema ISC y un gen asociado denominado *erpA*. El sistema ISC es uno de los tres sistemas existentes en bacterias que, junto a ErpA, median el ensamblaje de moléculas de Fe o S como cofactores en diversas proteínas que participan en diferentes procesos biológicos, como es la respiración, reparación del ADN, o la regulación genética (Roche et al., 2013). En *P. aeruginosa*, este sistema parece inducirse en respuesta al estrés oxidativo y a altas cantidades en el medio de hierro Fe⁺² libre (Romsang et al., 2016).

Otro gen que cuya expresión es mayor a 18 °C y relacionado con los niveles de hierro Fe⁺² en el medio intracelular es *fur*, el cual codifica para una proteína reguladora de la transcripción (Andrews et al., 2003; Cornelis, 2010). Esta proteína se encarga de regular la expresión de diversos genes responsables de funciones como la obtención de hierro, y el metabolismo o ensamblaje de cofactores. En *P. syringae* y en presencia de altos niveles de Fe⁺², Fur inhibe la expresión de genes para biosíntesis de sideróforos, los cuales se encargan de obtener hierro del medio externo (Butcher et al., 2011).

Tabla 8. Genes inducidos a 18 °C de interés en este estudio.

Proceso y Locus	Gen	Producto
tag ^a		
Quimiotaxis		
PSPPH_RS01865		Proteínas metilo-receptores de quimiotaxis (MCP)
PSPPH_RS02885		
PSPPH_RS04120		
PSPPH_RS04615		
PSPPH_RS04630		
PSPPH_RS04795		
PSPPH_RS08720		
PSPPH_RS14365		
PSPPH_RS24935		
PSPPH_RS26235		
PSPPH_RS04115	<i>cheW1</i>	Proteína de quimiotaxis
PSPPH_RS04125	<i>cheA1</i>	Proteína sensora quinasa de quimiotaxis
PSPPH_RS04130		Proteína con dominio STAS
PSPPH_RS04800		Proteína de quimiotaxis
PSPPH_RS16555		
PSPPH_RS16995	<i>cheW2-1</i>	Proteína de quimiotaxis
PSPPH_RS17000	<i>cheW2-2</i>	Proteína de quimiotaxis
Síntesis del flagelo		

PSPPH_RS17065	<i>fliR</i>	Proteína del sistema de secreción tipo III flagelar
PSPPH_RS17070	<i>fliQ</i>	Proteína de biosíntesis del flagelo
PSPPH_RS17085	<i>fliN</i>	Proteína de activación del movimiento flagelar
PSPPH_RS17185	<i>fliC</i>	Proteína estructural del flagelo (flagelina)
PSPPH_RS17250	<i>flgE</i>	Proteína de anclaje de la flagelina
PSPPH_RS17265	<i>flgB</i>	Proteína del cuerpo basal membranal del flagelo
Síntesis del pili tipo IV		
PSPPH_RS20395	<i>pilZ</i>	Proteína ensambladora del pilus
1. Pili tipo IVa		
PSPPH_RS02445	<i>pilI</i>	Proteína de biogénesis del pilus tipo IV
PSPPH_RS27995	<i>pilA</i>	
1. Pili tipo IV Tad		
PSPPH_RS22340	<i>tadE</i>	Proteína ensambladora del pilus
PSPPH_RS22345		prepilina peptidasa tipo IV
PSPPH_RS22410		Regulador de respuesta
PSPPH_RS22415	<i>flp</i>	Pilin tipo IVb de la familia flp
	<i>cpaB</i>	Proteína ensambladora del pilus flp
PSPPH_RS22425		secretina
PSPPH_RS22435	<i>cpaF</i>	Proteína de la familia cpaF
PSPPH_RS22440		Proteína F del sistema de secreción tipo II
PSPPH_RS22445		Proteína F del sistema de secreción tipo II
PSPPH_RS22450		Proteína hipotética
PSPPH_RS27995		Proteína prepilina
Metabolismo del segundo mensajero c-di-GMP		
PSPPH_RS05920		Proteína con dominio EAL/regulador de la respuesta
PSPPH_RS07170		Proteína bifuncional diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa
PSPPH_RS14740		Proteína con dominio GGDEF
PSPPH_RS22890		Proteína con dominio GGDEF/ EAL/ sensora
PSPPH_RS23810		Proteína con dominio GGDEF
PSPPH_RS21400		Proteína diguanilato ciclasa (dominio GGDEF)
Biogénesis del cluster Fe-S		
PSPPH_RS06615	<i>iscR</i>	Regulador transcripcional de ensamblaje del cluster Fe-S
PSPPH_RS06620	<i>iscS</i>	subfamilia cisteína desulfurasa
PSPPH_RS06625	<i>iscU</i>	Proteína para el ensamblaje de clúster Fe-S
PSPPH_RS06630	<i>iscA</i>	Proteína de ensamblaje del cluster Fe-S
PSPPH_RS06645	<i>fdx</i>	Sistema ISC 2Fe-2S tipo ferredoxina
PSPPH_RS06650	<i>iscX</i>	Proteína ensambladora Fe-S
PSPPH_RS03485	<i>erpA</i>	Proteína de inserción del clúster Fe-S

Biosíntesis de faseolotoxina

PSPPH_RS21740	<i>phtV</i>
PSPPH_RS21745	<i>phtU</i>
PSPPH_RS21750	<i>phtT</i>
PSPPH_RS21755	<i>phtS</i>
PSPPH_RS21760	<i>phtQ</i>
PSPPH_RS21765	<i>amtA</i>
PSPPH_RS29200	<i>desI</i>
PSPPH_RS21825	<i>phtD</i>
PSPPH_RS21830	<i>phtC</i>
PSPPH_RS21835	<i>phtB</i>
PSPPH_RS21840	<i>phtA</i>
PSPPH_RS29205	<i>argK</i>

Otros

PSPPH_RS03440	<i>crp/vfr</i>	Regulador transcripcional global activado por AMPc
PSPPH_RS09205	<i>rraB</i>	Inhibidor de la ribonucleasa E (RNaseE)
PSPPH_RS21265	<i>fur</i>	Proteína reguladora de adquisición de hierro

^a Locus tag hace referencia al cromosoma de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (NC_005774)

5.3.4 Genes inducidos a 28 °C.

De forma similar a 18 °C, a 28 °C, 37 genes presentan un FC menor de -2 (Figura 30) entre los que se encuentran genes pertenecientes al operón para la biosíntesis del alginato, al cluster para la biosíntesis de acromobactina, al ARN 5S del ribosoma, 10 ARNts (Tabla 9), así como genes para diversas proteínas, entre las que se encuentra una heat-shock de la familia Hsp20. Hsp20 es una chaperona que participa en el mantenimiento de la homeostasis proteica frente al estrés por calor (Klinkert & Narberhaus, 2009).

A diferencia de los genes inducidos a 18 °C, la mayoría de este grupo de genes con valores FC mayores de 2, si se clasifican en las categorías funcionales más representativas a 28 °C, anteriormente mencionadas, por lo que serán brevemente descritos en los siguientes apartados.

5.3.4.1 Los genes de ARNt-leu son los genes con mayor expresión diferencial a 28 °C

Dentro de la categoría funcional traducción, biogénesis y estructura ribosómica, se han clasificado 22 genes, 16 codificantes de ARNt y seis correspondientes al ARN 5S del ribosoma, presentando la mayoría valores FC ≤ 2. Entre los genes para ARNt, seis corresponden a leucina y el resto a ARNts de serina, glutamina, cisteína, metionina y ácido aspártico. Es destacable que, de los ARNt correspondientes a leucina, no solo se induce la expresión de todos los

genes presentes en el genoma de Pph 1448A, sino que cuatro de ellos son los que mayores valores de FC presentan a 28 °C. Por otra parte, este aminoácido es el que mayor porcentaje de uso tiene en las proteínas de Pph 1448A (Tabla 9 y Tabla 10).

5.3.4.2 Genes para la biosíntesis de alginato y acromobactina.

La biogénesis de la pared o membrana celular y la biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios son los otros dos grupos funcionales más representativos a 28 °C. En el primer grupo, se identificaron todos los genes (12 genes) que conforman el operón para la biosíntesis de alginato. El alginato es el tipo de exopolisacárido más común en el género *Pseudomonas*, importante en la formación de biofilms (Tabla 10) (Franklin et al., 2011; Mann & Wozniak, 2012).

De forma similar, en el segundo grupo, ocho de los 11 genes identificados corresponden al cluster de la acromobactina, un tipo de sideróforo. Estos resultados se complementan con los de Owen y Ackerley (2011) (Owen & Ackerley, 2011), donde mostraron la síntesis termorregulada de este sideróforo. En el cluster se localizan 15 genes, los cuales están bien conservados entre Pph 1448A y *P. syringae* pv. *syringae* B728A (Berti & Thomas, 2009; Owen & Ackerley, 2011). De los genes inducidos, destacan *ascA*, *ascC* y *ascD* ya que codifican para las proteínas principales que conforman la ruta de biosíntesis de acromobactina (Berti & Thomas, 2009). En general, la acromobactina es un tipo de sideróforo solo presente en algunas especies de *Pseudomonas*, siendo la pioverdina el tipo más común en este género. En las condiciones estudiadas, en el transcriptoma de Pph 1448A no se han observado diferencias de expresión por temperatura de genes importantes para la biosíntesis de pioverdinas.

Tabla 9. Genes inducidos a 28 °C de interés este estudio.

Locus tag ^a	Gen	Descripción proteica
Síntesis y transporte de acromobactina		
PSPPH_RS05550	<i>tonB</i>	Receptor de sideróforo
PSPPH_RS13925		
PSPPH_RS24540		
PSPPH_RS13930		Diaminobutirato-2-oxoglutarato transaminasa
PSPPH_RS13935	<i>acsD</i>	Proteína de síntesis de acromobactina
PSPPH_RS13940		Enzima tipo III dependiente de PLP
PSPPH_RS13945		Transportador MFS
PSPPH_RS13950	<i>acsC</i>	Proteína de síntesis de acromobactina
PSPPH_RS13955	<i>sbnG</i>	Proteína de síntesis de sideróforo
PSPPH_RS13960	<i>acsA</i>	Proteína de síntesis de acromobactina
Operón del alginato		

PSPPH_RS05635	<i>algA</i>	
PSPPH_RS05640	<i>algF</i>	
PSPPH_RS05645	<i>algJ</i>	
PSPPH_RS05650	<i>algI</i>	
PSPPH_RS05655	<i>algL</i>	
PSPPH_RS05660	<i>algX</i>	
PSPPH_RS05665	<i>algG</i>	
PSPPH_RS05670	<i>algE</i>	
PSPPH_RS05675	<i>algK</i>	
PSPPH_RS05680	<i>alg44</i>	
PSPPH_RS05685		Glicosil transferasa
PSPPH_RS05690	<i>algD</i>	
t-RNA		
PSPPH_RS02890	<i>tRNA-Leu</i>	
PSPPH_RS02895	<i>tRNA-Leu</i>	
PSPPH_RS05055	<i>tRNA-Gln</i>	
PSPPH_RS06565	<i>tRNA-Leu</i>	
PSPPH_RS07780	<i>tRNA-Ser</i>	
PSPPH_RS07940	<i>tRNA-Asp</i>	
PSPPH_RS08420	<i>tRNA-Asp</i>	
PSPPH_RS08425	<i>tRNA-Asp</i>	
PSPPH_RS08540	<i>tRNA-Leu</i>	
PSPPH_RS09315	<i>tRNA-Ser</i>	
PSPPH_RS12050	<i>tRNA-Cys</i>	
PSPPH_RS12180	<i>tRNA-Leu</i>	
PSPPH_RS15605	<i>tRNA-Ser</i>	
PSPPH_RS19160	<i>tRNA-Met</i>	
PSPPH_RS19165	<i>tRNA-Met</i>	
PSPPH_RS21185	<i>tRNA-Leu</i>	
ARN 5S del ribosoma		
PSPPH_RS03525		
PSPPH_RS04520		
PSPPH_RS15875		
PSPPH_RS23310		
PSPPH_RS25820		
PSPPH_RS25825		
Otros		
PSPPH_RS09840	<i>hsp20</i>	Proteína heat-shock hsp20
PSPPH_RS24980	<i>dnaJ</i>	Proteína heat-shock Hsp40
PSPPH_RS16050		Proteína Ku
^a Locus tag hace referencia al cromosoma de <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 1448A (NC_05773)		

Tabla 10. Frecuencia en el uso de codones y expresión diferencial de genes de ARNt en *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A

AA	Codon	Nº total ^a	% AA ^b	Locus_tag	Log ₂ FC	AA	Codon	Nº total ^a	% AA ^b	Locus_tag	Log ₂ FC	AA	Codon	Nº total ^a	% AA ^b	Locus_tag	Log ₂ FC	
Ala	GCG	52380	10.58%			Glu	GAG	44255	5.64%			Pro	CCG	39918	4.75%			
	GCA	30257						CCA		10457								
	GCT	25410					Gly	GGG	17014	7.65%				CCT		13897		
	GCC	72647						GGA	8154					CCC		16915		
Arg	AGG	4678	6.32%				GGT	32591				Ser	AGT	12416	6.17%	No presente		
	AGA	3528					GGC	72922					AGC	37411		PSPPH_RS17765		
	CGG	13885				His	CAT	16603	2.24%				TCG	24190		PSPPH_RS07780	1.95	
	CGA	7499					CAC	21740					TCA	8028		PSPPH_RS15605	3.48	
	CGT	28161				Ile	ATA	5948	5.06%					TCT		6691	No presente	
	CGC	50247					ATT	25560						TCC		16697	PSPPH_RS09315	1.59
				ATC	54867													
Asn	AAT	17855	3.22%			Leu	TTG	29663	11.34%	PSPPH_RS06565	3.29	Thr	ACG	20236	5.08%			
	AAC	37096					TTA	4055		PSPPH_RS12180	2.56			ACA		8921		
Asp	GAT	37370	5.44%	No presente			CTG	115420		PSPPH_RS02890	3.85			ACT		11696		
	GAC	55627		PSPPH_RS07940	1.65					PSPPH_RS02895	3.87			ACC		45949		
				PSPPH_RS08420	2.02													
				PSPPH_RS08425	1.79													
Cys	TGT	4324	0.98%	No presente			CTA	4304	PSPPH_RS08540	3.77	Trp	TGG	23988	1.40%				
	TGC	12388		PSPPH_RS12050	2.05			CTT	15902	No presente			Tyr		TAT	16449	2.51%	
Stop	TGA	3248	0.30%				CTC	24365	PSPPH_RS21185	3.81		TAC	26459					
	TAG	576				Lys	AAG	38187	3.73%			Val	GTG	49339	7.10%			
	TAA	1347					AAA	25505						GTA		13248		
Gln	CAG	55842	4.49%	No presente		Met	ATG	40166	2.35%	PSPPH_RS19160	1.57		GTT	18060				
	CAA	20823		PSPPH_RS05055	2.4	Phe	TTT	21267	3.64%				GTC	40693				
							TTC	40872										

^a Representa el número total de veces que ese codón aparece en el genoma de Pph 1448A.

^b Representa el porcentaje de aparición del aminoácido en cuestión en todas las CDS del genoma de Pph 1448A.

AA, Aminoácido; FC, fold change, Ala, Alanina; Arg Arginina; Asn, Asparagina; Asp, Ácido aspártico; Cys, Cisteína; Gln, Glutamina; Glu, Ácido glutámico; Gly, Glicina; His, Histidina; Ile, Isoleucina; Leu, Leucina; Lys, Lisina; Met, Metionina; Phe, Fenilalanina; Pro, Prolina; Ser, Serina; Thr, Treonina; Trp, Triptófano; Tyr, Tirosina; Val, Valina. En negro se marcan los dos aminoácidos con mayor porcentaje de uso, y en gris los alelos inducidos a 28 °C. Los datos de codon usage se han obtenido desde la página web <https://www.kazusa.or.jp/codon/>.

5.4 Genes termorregulados dependientes de GacA.

Con el fin de identificar qué genes termorregulados en la cepa silvestre pudieran depender a su vez de GacA, primero se compararon los DEGs por temperatura entre la cepa silvestre y la cepa *gacA::IS* (Figura 32A).

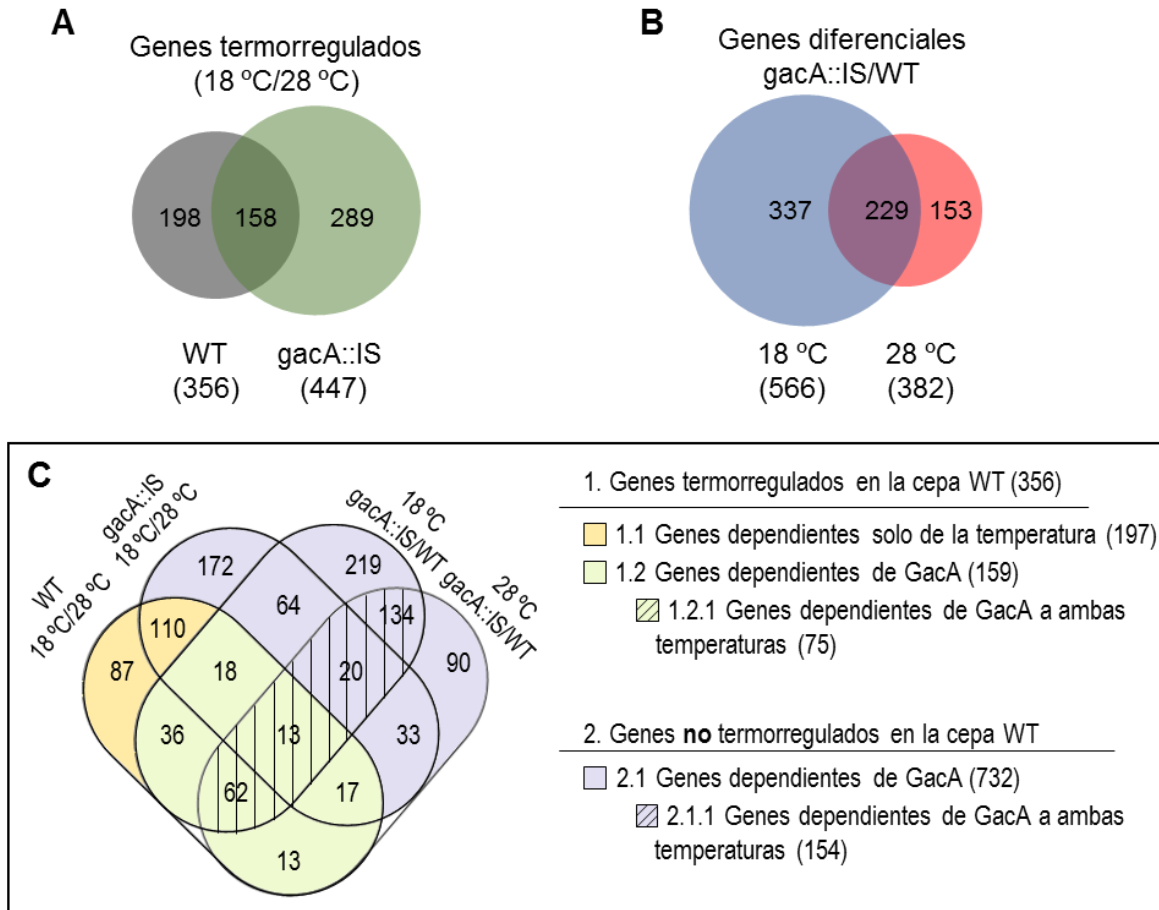


Figura 32. Efecto de la temperatura y del gen *gacA* en el transcriptoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. **A)** Comparación del número de genes termorregulados entre la cepa silvestre y la cepa mutante *gacA*. **B)** Comparación del número de genes dependientes del gen *gacA* a dos temperaturas diferentes. **C)** Comparación del número de genes dependientes de temperatura y/o dependientes de GacA

Para ambas cepas, se identificó 158 genes comunes, (Figura 32A), lo que indica que mantienen una expresión termorregulada y prevesiblemente no son dependientes de GacA. Aun así, en este grupo se encuentran dos genes pertenecientes al cluster *Tox*, *phtB* y *phtC*. En trabajos anteriores se ha demostrado que la expresión de ambos genes es dependiente tanto de la temperatura como de GacA (De la Torre-Zavala et al., 2011). Esto nos indicaría que la expresión de algunos genes, aun siendo significativamente menor en el mutante *gacA* que en la cepa silvestre, siguen manteniendo un patrón termorregulado en un fondo *gacA*⁻. Otros genes mencionados en apartados anteriores que se encuentran en este grupo serían de la biosíntesis de alginato (*algA*, *algF* y *algG*) y de la biosíntesis de acromobactina (*ascC* y *ascA*). De ello

se deduce que para algunos genes, el sistema GacS/GacA determina el grado de expresión pero no la termorregulación.

Para complementar este resultado, y estimar el número real de genes termorregulados dependientes de GacA, se evaluó la expresión diferencial génica comparando los transcriptomas de ambas cepas (*gacA::IS/WT*) a una temperatura determinada. A 18 °C, entre la cepa *gacA::IS* y la cepa WT se identificaron 566 DEGs, y a 28 °C, 382 DEGs (Figura 32B). El número de DEGs estimados en estos dos análisis se comparó a su vez con los estimados en los análisis anteriores (Figura 32C).

5.4.1 GacA controla el 45 % de los genes termorregulados en la cepa 1448A

Según las diferentes comparativas realizadas entre los transcriptomas de la cepa WT y la cepa *gacA::IS* (Figura 32C), de los 356 genes termorregulados en la cepa silvestre, el 45 % (159 genes) son dependientes del sistema GacS/GacA.

5.4.1.1.1 Genes termorregulados con valores de expresión menores en el mutante *gacA*.

En la cepa *gacA::IS*, en comparación con la cepa WT, a 18 °C se disminuye la expresión de un total de 93 genes, y a 28 °C un total de 19 genes, indicativo de que GacA interviene positivamente en la expresión de estos genes (Figura 33A). En este grupo de genes se encuentra genes correspondientes al cluster Tox, el cluster *che* y MCPs, genes para la biosíntesis del pili tipo IV Tad y genes para la biosíntesis de alginato. A su vez, en el mutante *gacA* se ha observado un nivel más bajo de expresión de genes cuyo valores de expresión ya de por si son bajos en la cepa WT a una determinada temperatura (17 genes a 18 °C, y 66 genes a 28 °C) (Figura 33A). Un ejemplo de ello son los genes del cluster Tox, donde los valores de expresión en el mutante *gacA* a 28 °C son significativamente menores que los valores de expresión en la cepa WT a esta misma temperatura. Esto explicaría el hecho de que algunos genes dependientes de GacA mantenga un patrón termorregulado, como es el caso de *phtB* y *phtC*.

5.4.1.1.2 Genes termorregulados con valores de expresión mayores en el mutante *gacA*.

A 18 °C, en la cepa *gacA::IS* en comparación con la cepa WT, la expresión de un total de 19 genes termorregulados aumenta, indicando que GacA influye negativamente en la expresión de estos. De estos 19 genes, 16 se corresponden a genes cuya expresión es mayor a 28 °C en la cepa WT (Figura 33B), encontrándose entre ellos los correspondientes al cluster para la biosíntesis de la acromobactina. Esto indicaría que sin la presencia de GacA, a 18 °C disminuye la represión que se ejerce sobre ellos. Los restantes tres genes de estos 19, son genes cuya expresión es alta a 18 °C en la cepa WT, y que en la cepa mutante,

esta expresión es aun mayor. Estos genes codifican para una proteína hipotética (PSPPH_RS11380), para una proteína tipo RaiA (PSPPH_RS05545), y para una proteína de la familia N-acetiltransferasa (GNAT)(PSPPH_RS16525). RaiA es una proteína de respuesta a estrés que se une al ribosoma, la cual detiene la traducción al interferir con la unión de aminoacil-tARN al sitio ribosómico A (Vila-Sanjurjo et al., 2004). La familia de proteínas GNAT se encarga de transferir un grupo acetilo de la proteína acetyl-CoA a una gran variedad de sustratos, intervenido en múltiples procesos fisiológicos de las células (L. Xie et al., 2014; Burckhardt & Escalante-Semerena, 2020).

Figura 33. Influencia de GacA en la expresión de genes termorregulados en la cepa Pph 1448A. Comparación del número de genes con valores de expresión mayores o menores en la cepa *gacA::IS* con respecto a los genes expresados a 18 °C o a 28 °C en la cepa silvestre. **A)** Número de genes con una expresión reducida en *gacA::IS* en comparación con la cepa WT. **B)** Número de genes con una expresión aumentada en *gacA::IS* en comparación con la cepa WT.

De forma similar, a 28 °C en la cepa *gacA::IS*, aumenta la expresión de un total de 20 genes termorregulados. Ocho se corresponden a genes cuya expresión es mayor a 18 °C que a 28 °C en la cepa silvestre, y 12 cuya expresión es mayor a 28 °C que a 18 °C en la cepa silvestre (Figura 33B). Dentro de este grupo de 20 genes se encuentran algunos descritos en el párrafo anterior como los genes que conforman el cluster para la biosíntesis de la acromobactina y el gen codificante para la proteína tipo RaiA. Así mismo, descritos también en apartados anteriores, se agrupan *fliQ* y *fliN*, pertenecientes al cluster para la biosíntesis del flagelo, y el gen codificante para RraB.

En general, a ambas temperaturas, GacA regula la expresión de 75 genes termorregulados en la cepa silvestre (Figura 32C). Siete de ellos aumentan su expresión y 67 la disminuyen en la cepa mutante, de forma independiente a la temperatura. El último gen corresponde a un ARNt de cisteína, cuya expresión en comparación a la cepa WT, es menor a 28 °C, pero aumenta a 18 °C, de tal forma que es la misma a ambas temperaturas, por lo que en un fondo *gacA⁻* sería un gen no termorregulado. De los siete genes con valores de expresión mayores, seis corresponden al cluster de la acromobactina, y el restante a la proteína tipo RaiA, mientras que entre los 67 genes con valores de expresión menores se agrupan genes relacionados con la quimiotaxis, biosíntesis del alginato, faseolotoxina y pili tipo IV Tad.

Estos datos indicarían que el 45 % de los genes termorregulados sería mediante el sistema GacS/GacA, influyendo sobre todo en la expresión de genes a 18 °C (96 genes de 204).

5.5 El sistema GacS/GacA regula la expresión de un total de 891 genes.

De la comparativa de los cuatro análisis realizados, se estimó un total de 891 genes dependientes de GacA (Figura 32C). Debido a la metodología utilizada

para la clasificación de los genes en categorías funcionales, así como al volumen de datos, aún se está llevando a cabo una clasificación para los genes dependientes de GacA no termorregulados. De forma preliminar, se realizó la búsqueda manual de genes asociados a fenotipos ya descritos en este trabajo, así como de operones o clusters en los cuales la mayoría de los genes que los conforman tuvieran una expresión diferencial.

Así pues, en el transcriptoma de *gacA::IS*, a ambas temperaturas se observó la inducción de genes pertenecientes al operón *cysAWTP*, un sistema de transporte de la membrana plasmática tipo ABC de sulfatos y tiosulfatos (Sirko et al., 1990, 1995), y al cluster para la biosíntesis de yersiniabactina, un tercer tipo de sideróforo presente en el genoma de Pph (Owen & Ackerley, 2011). Así mismo, solo a 28 °C, aumentaba la expresión de genes pertenecientes al cluster para la biosíntesis del flagelo.

Entre los genes con valores menores de expresión a ambas temperaturas, se identificaron genes correspondientes al cluster del sistema de secreción tipo VI (T6SS) (Sarris et al., 2010), al operón para la posible síntesis de un tipo de polisacárido denominado Psl (Mann & Wozniak, 2012), y al cluster de *che*.

5.5.1 El sistema GacS/GacA controla el patrón de expresión de 732 genes no termorregulados.

Del total de 891 genes dependientes de GacA, 159 corresponde a genes termorregulados en la cepa silvestre, y el resto, 732, correspondería a genes no termorregulados (Figura 32C). El número de genes termorregulados representa un 21 % del total de genes cuya expresión depende del sistema GacS/GacA, lo que indicaría que este sistema también participa en la regulación genética frente a otro tipo de estímulos.

El patrón de expresión del conjunto de genes no termorregulados permite clasificarlos en los siguientes tres grupos: genes con expresión diferencial a ambas temperaturas, genes con expresión diferencial a una temperatura determinada, y genes con un patrón termorregulado exclusivamente en *gacA::IS*. Debido a esto, y a que genes de un mismo operon o cluster pueden tener patrones de expresión diferentes entre sí, en los siguientes apartados se realizara una descripción general del número de genes agrupados según su patrón de expresión.

5.5.1.1 Genes con expresión diferencial a ambas temperaturas.

Existe un total de 154 genes no termorregulados cuya expresión es dependiente de GacA a ambas temperaturas. La mayoría (148 genes) disminuye (116) o aumenta su expresión (32) en la cepa *gacA::IS* con respecto a la cepa silvestre (*gacA::IS/WT*), pero seis de ellos presentan un patrón de expresión inverso. Por ejemplo, el gen *PSPPH_RS04555* tiene un valor de FC -1.1 a 18 °C al comparar su expresión en *gacA::IS* con respecto a la cepa WT, mientras que

a 28 °C su valor FC es 1.2. A su vez, del total de 154 genes, existe un grupo de 20 genes (Figura 32C) que se pueden considerar termorregulados en *gacA::IS* debido a sus diferencias de expresión por temperatura. En el ejemplo expuesto, este gen presenta un valor FC 3.3 a 18 °C con respecto a 28 °C en *gacA::IS*.

5.5.1.2 Genes con expresión diferencial solo a 18 °C o a 28 °C.

De entre los 732 genes no termorregulados, 412 genes mostraron una expresión diferencial a una temperatura determinada con respecto a la cepa silvestre. De esta forma en la cepa *gacA::IS* la expresión de 283 genes varía solo a 18 °C y la expresión de 123 genes solo varía a 28 °C. Como ya se ha indicado en el apartado anterior, hay que tener en cuenta que estas diferencias de expresión son con respecto a la cepa silvestre. Si la expresión de estos mismos genes se compara entre temperaturas en la cepa mutante, se obtendría un número de genes cuyo patrón podría considerarse termorregulado. Así pues, de entre los genes con expresión diferencial entre *gacA::IS/WT* a 18 °C, 64 presentarían un patrón termorregulado si se compara con su expresión en *gacA::IS* a 28 °C. De forma inversa, de los genes con expresión diferencial en la cepa *gacA::IS* con respecto a la cepa WT a 28 °C, 33 genes se podrían considerar también termorregulados en la cepa *gacA::IS* (Figura 32C).

5.5.1.3 Genes con un patrón de expresión termorregulado.

Finalmente, 172 genes muestran un patrón termorregulado que no muestran en la cepa silvestre. Este grupo de genes tiene la característica de que presentan diferencias de expresión únicamente entre los transcriptomas de la cepa mutante a 18 °C y 28 °C. Por ello no se agrupan en ninguno de los apartados anteriores ya que sus valores de expresión no son significativamente diferentes a los de la cepa silvestre a una temperatura determinada.

5.6 Discusión

En este trabajo se ha abordado el estudio de la expresión de genes influenciados por temperatura y el sistema GacS/GacA, en la cepa *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A. Si bien la influencia de la temperatura en Pph ha sido anteriormente estudiada en el trabajo de Arvizu-Gómez et al. (2013), en éste se empleó la cepa Pph NPS3121, cuyo genoma no está secuenciado, y la técnica de chip de ADN (microarray). Es por ello que se consideró que la realización y análisis de un ARN-seq (Kimbrel et al., 2011; Rao et al., 2019) en una cepa Pph modelo permitiría una visión más completa y precisa. En concordancia con Arvizu-Gómez et al. (2013), se han identificado grandes grupos de genes relacionados con factores de virulencia y la patogénesis (Tablas 3 y 8) siendo a 18 °C donde se ha observado el mayor número de transcritos (204 genes inducidos a 18 °C frente a 152 genes inducidos a 28 °C).

A 18 °C, cabe destacar la expresión de grupos de genes relacionados con la movilidad, entre los que se encuentran genes codificantes para receptores y

reguladores de la quimiotaxis (cluster *che*), para la síntesis del flagelo, para la síntesis del pili tipo IV (IVa y Tad), y genes relacionados con el metabolismo del segundo mensajero c-di-GMP (Tabla 8) (Figura 28), lo que indica una predisposición del patógeno al movimiento a esta temperatura. Esto puede explicarse debido a que las temperaturas bajas permiten una mayor humedad en el ambiente y, por tanto, la formación de películas de agua sobre la superficie foliar. A través de estas, las bacterias pueden avanzar y colonizar la superficie de la hoja, hasta encontrar una vía de entrada al interior de la planta (Smirnova et al., 2001). En contraposición, a 28 °C se observa una mayor expresión de genes para la síntesis del alginato, un exopolisacárido común entre las especies del género *Pseudomonas*, y del gen *fimA*, que codifica para una subunidad de la fimbrina tipo 1 (Berne et al., 2015). Mientras que el alginato es esencial en la formación de biofilms, FimA es importante en la adherencia a superficies para la formación de biofilms (Y. Li et al., 2007; Berne et al., 2015). Además, en Pph 1448A se ha mostrado que FimA interviene restringiendo el movimiento tipo twitching (Xie et al., 2019). Todo ello conlleva a un tipo de vida sésil. Como en otros patógenos del complejo *P. syringae*, el ciclo de vida de *P. syringae* pv. phaseolicola se divide en una fase epifítica y una fase patogénica, la cual se inicia con la entrada del patógeno a la planta (Hirano & Upper, 2000; Arnold et al., 2011). Durante la primera fase, el patógeno debe sobrevivir a diversos factores externos, hasta el momento idóneo para iniciar la infección. La formación de biofilms debido a la producción de exopolisacáridos y otros componentes que lo forman, cumple la función de almacén de nutrientes y permite al patógeno resistir frente a la desecación y otras condiciones adversas (Arnold et al., 2011; Pfeilmeier et al., 2016).

De forma similar, a 18 y 28 °C se produce una contraposición en la expresión de genes asociados al metabolismo y adquisición de hierro, de tal forma que, a 18 °C se induce la expresión de genes relacionados con altos niveles de Fe²⁺ en el medio (sistema ISC y Fur), y a 28 °C, se induce la expresión de genes relacionados con bajo niveles de Fe²⁺ (síntesis de acromobactina). Las moléculas de hierro en condiciones aerobias, como ocurre en la superficie foliar, generalmente se encuentran en su forma no soluble (Fe³⁺), por lo que la producción de sideróforos permite a la bacteria captar estas moléculas de hierro e introducir las al medio intracelular pasando a su forma soluble, Fe²⁺ (Andrews et al., 2003; Cornelis, 2010; Chakraborty et al., 2013). A su vez, altos niveles intracelulares de Fe²⁺ pueden ocasionar toxicidad, ya que puede interaccionar con especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Esta reacción (reacción Fenton) genera radicales hidroxilo (OH⁻), que son altamente reactivos y dañinos a nivel fisiológico (Andrews et al., 2003). Teniendo en cuenta la posible formación de micropelículas de agua a 18 °C, durante este periodo de movilidad, el patógeno puede encontrar una vía de acceso al interior, donde el apoplasto de la planta huésped es rico en Fe²⁺ (Hernández-Morales et al., 2009). Tanto el sistema ISC como Fur intervendría reduciendo el exceso de

Fe²⁺ intracelular, el primero principalmente uniendo las moléculas de hierro a las proteínas que lo usen como cofactor, y el segundo, inhibiendo la síntesis de sideróforos.

En *Pseudomonas*, las pioverdinas son el principal tipo de sideróforos y los que presentan mayor afinidad al hierro (Cornelis, 2010). En las condiciones estudiadas de este trabajo, en Pph 1448A solo se ha identificado la expresión termorregulada de genes para la síntesis de acromobactina. Así mismo, Owen y Ackerley (2011) mostraron que la acromobactina presenta menor afinidad por las moléculas de hierro que la pioverdina. Debido a la importancia del hierro en el metabolismo de la bacteria, no sería de extrañar que la pioverdina no presente una regulación termorregulada ya que de esta forma la bacteria se asegura una captación de hierro constante, mientras que la acromobactina actuaría como un sideróforo de apoyo para condiciones más adversas, como es la fase epifítica, y su regulación por temperatura permitiría a la bacteria economizar el gasto de energía que esto implica.

En otras especies del complejo *P. syringae* también se presentan una expresión génica termorregulada. En *P. syringae* pv. *syringae* B728a, se induce la síntesis del flagelo y proteínas receptoras y señalizadoras de la quimiotaxis a temperaturas bajas aunque, al contrario que en Pph 1448A, a esta misma temperatura se induce la síntesis de alginato (Hockett et al., 2013), por lo que los mecanismos de regulación para este exopolisacárido podrían diferir entre ambos patovares. En *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, se ha mostrado la importancia del cluster *che* para la movilidad tipo swarming o tipo swimming, y cómo este tipo de movimiento se ve favorecido a bajas temperaturas (Clarke et al., 2016).

La correcta señalización y regulación de los diversos mecanismos moleculares, que se producen tanto en la fase epifítica como en la patogénica, es imprescindible tanto para la supervivencia del patógeno como para que se produzca con éxito la infección (Heeb & Haas, 2001; Beier & Gross, 2006). Es por ello que los sistemas reguladores globales de dos componentes adquieren un papel muy importante. Durante este trabajo se ha podido evidenciar que la regulación de un 45 % de los genes termorregulados en Pph 1448A, se produce a través del sistema GacS/GacA, sobre todo aquellos cuya expresión es mayor a 18 °C (96 genes de 204) (Figura 32C y Figura 33).

En otros patovares del complejo *P. syringae*, la movilidad, la biosíntesis de exopolisacáridos o la biosíntesis de sideróforos son fenotipos regulados positivamente por GacA (Rich et al., 1994; Chatterjee et al., 2003b; Cha et al., 2012; Zhang et al., 2018). En nuestros resultados también se muestra una influencia de GacA en la regulación de estos fenotipos.

La movilidad a 18 °C estaría regulada positivamente por GacA a través del aumento en la expresión de los genes del cluster *che* y no en los genes para la biosíntesis del flagelo. De echo la regulación por parte de GacA en la síntesis del

flagelo parece ocurrir a través de la represión a 28 °C tanto de genes termorregulados y no termorregulados del cluster. Esta regulación sería diferente por ejemplo a *P. syringae* pv tomato DC300, en la cual GacA influye de forma positiva en los niveles de expresión del gen *fliC* (Nogales et al., 2015).

En la biosíntesis de exopolisacáridos, GacA induce la síntesis de alginato a 28 °C mediante la regulación de la expresión de *algA* y *algF*. En *Pseudomonas syringae* pv syringae FF5, *algA* es imprescindible para la biosíntesis de alginato (Peñaloza-Vázquez et al., 1997), por lo que la cepa *gacA::IS* posiblemente no sintetice este exopolisacárido. Además, se ha identificado el control de GacA sobre la expresión de genes que intervienen en la síntesis de otro tipo exopolisacárido no termorregulado, Psl. Este polisacárido fue descubierto en *Pseudomonas aeruginosa*, en la cual es uno de los compuestos principales en la formación de biofilms durante las infecciones mucosas crónicas (Wozniak et al., 2003). Los genes esenciales para la síntesis de este polisacárido están presentes en diversos patovares de *Pseudomonas syringae* (Mann & Wozniak, 2012), pero se desconoce si Pph 1448A lo sintetiza. En ambos casos, en la cepa *gacA::IS* es previsible que la síntesis de alginato y Psl estén inhibidas y esto contribuya a la no formación de biofilms.

En el caso de la biosíntesis de sideroforos, GacA actuaría como un represor de la síntesis de acromobactina, tanto a 18 °C como a 28 °C. Los genes para la síntesis la acromobactina son inducido a 28 °C en la cepa WT, pero sin la presencia de GacA, estos genes aumentan su expresión de forma significativa, perdiendo así mismo su patrón termorregulado. Los genes para la síntesis de acromobactina no son los únicos genes para síntesis de sideroforos cuya expresión es inhibida por GacA. En el transcriptoma de *gacA::IS*, a las dos temperaturas, se ha identificado la expresión de genes para la síntesis de yersiniabactina, otro tipo de sideróforo secundario, presente en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Jones et al., 2007; Cornelis, 2010). Owen y Ackerley (2011) no obtuvieron pruebas de que Pph 1448A sintetizara este sideróforo. Puede que las condiciones no fueran adecuadas y que GacA mantenga una fuerte represión sobre estos genes.

Durante este trabajo se ha observado que el 79% de los genes que conforman el regulon de GacA en Pph1448A, son genes independientes de temperatura, lo que indica que este sistema también participa en la señalización de otras respuestas ambientales. Entre los genes no termorregulados controlados por GacA cabe destacar el cluster para la síntesis del sistema de secreción tipo VI (T6SS). En Pph 1448A al igual que *P. syringae* pv. syringae B728A, los genes que codifican para T6SS se localizan en un único cluster, mientras que en otros patovares, como *P. syringae* pv. tomato DC3000 o pv. tabaci ATCC11528, contienen en su genoma dos copias del cluster (Sarris et al., 2010). Acorde a nuestros resultados, en Arvizu-Gómez et al. (2013) (Arvizu-Gómez et al., 2013b), un mutante en el gen *gacA* de la cepa Pph NSP3121 muestra una expresión

reducida de los genes que conforman el cluster. Así mismo, en este mismo trabajo, muestran una expresión mayor de los genes en un medio con extractos de planta, lo que indica que pueda estar asociado con la virulencia y la patogenicidad, como ocurre en otros patovares del complejo *Pseudomonas syringae* (Sarris et al., 2010; Records & Gross, 2010).

En conclusión, en este trabajo se ha intentado comprender mejor cómo influye la temperatura en el ciclo de vida de la bacteria fitopatógica Pph 1448A. El número de genes termorregulados no supera el 6 % de los genes identificados en el genoma de la bacteria, pero están asociados a la supervivencia y la movilidad de esta, que son fenotipos de importancia en la fase previa a la infección. También se ha puesto de manifiesto la relación de este factor ambiental y del sistema GacS/GacA, siendo este una de las principales vías de señalización de respuesta a cambios de temperatura. Aunque aún quedan datos por analizar y la realización de futuros experimentos que confirmen estos datos, en este capítulo se ha podido obtener una visión general del regulón de GacA en Pph 1448A, y de su influencia en el ciclo de vida de la bacteria.

Discusión General

El cambio entre un modo de vida epifítica y un modo de vida patogénica viene determinado por la capacidad bacteriana de responder a diversos estímulos externos. Esta capacidad suele basarse en mecanismos especializados de transducción de señales, a través de sistemas de dos componentes (TCS), como el sistema GacS/GacA (Heeb & Haas, 2001; Beier & Gross, 2006; Mikkelsen et al., 2011). Este sistema está asociado con la expresión de genes de virulencia pero se conoce poco sobre el tipo de estímulos ambientales a los que responde (Heeb & Haas, 2001). En *P. syringae* pv. *phaseolicola* se ha demostrado que la biosíntesis de la faseolotoxina es dependiente tanto de la temperatura como de GacS/GacA (De la Torre-Zavala et al., 2011), lo que sugiere que la regulación génica por temperatura puede estar mediada por el sistema GacS/GacA mediante las proteínas Rsm. Así pues, con los capítulos III y IV de esta Tesis, se ofrece una visión global de los efectos de la temperatura en la regulación génica de Pph 1448A, mediante el sistema GacS/GacA-Rsm (Figura 34).

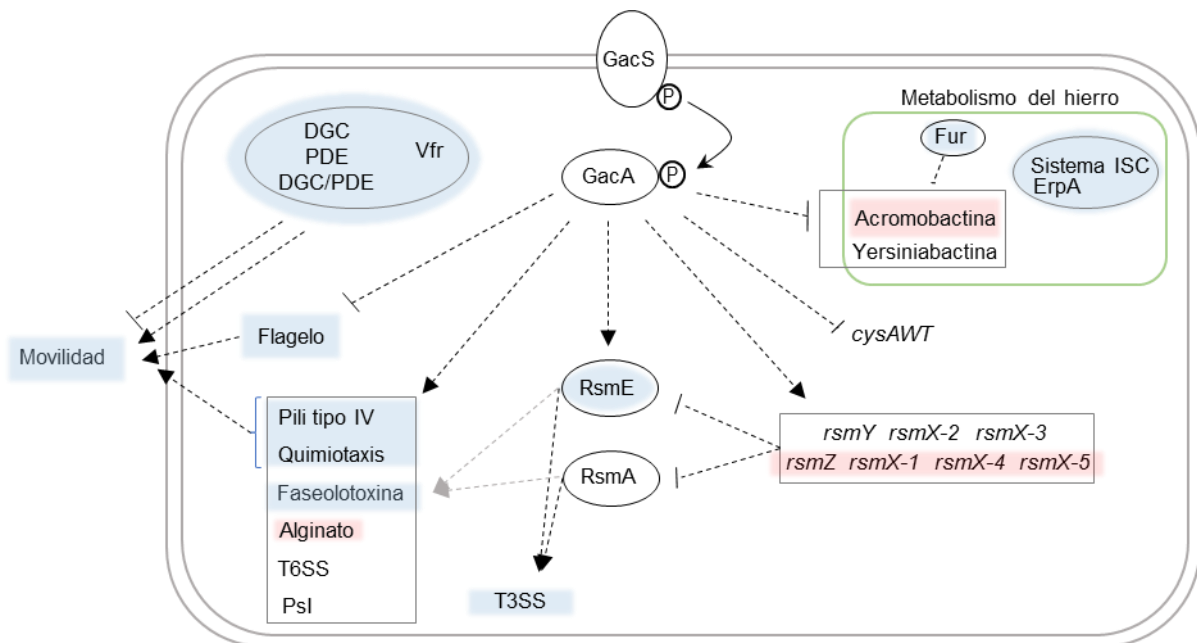


Figura 34. Modelo postulado de regulación de genes, procesos y fenotipos relevantes en Pph 1448A, dependientes de la temperatura o del sistema GacS/GacA-Rsm. Las flechas marcan inducción, las barras marcan represión; cuando se muestran en color gris, indican una regulación débil, ya sea para inducir o para reprimir. Los procesos/fenotipos/genos inducidos a 18 °C se han enmarcado en azul, mientras que los inducidos a 28 °C se han enmarcado en rojo. Aquellos sin enmarcar corresponden a procesos/fenotipos/genos no termorregulados pero cuya expresión es dependiente de GacA. Las proteínas han sido enmarcadas en un círculo. Fur es una proteína represora de la síntesis de sideróforos en otras pseudomonas, por lo que se prevé que ocurra de la misma forma en Pph 1448A.

La temperatura es un factor externo importante en la virulencia de patógenos de plantas, pero existen pocas referencias de su influencia en el transcriptoma de estas. En esta Tesis, mediante un análisis de ARN-seq en células de Pph 1448A crecidas en medio mínimo SSM, se estimó que el 6% de los genes anotados en el genoma de Pph 1448A, están termorregulados. Estos resultados contrastan con los obtenidos en *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Hockett et al., 2013). En

este patovar, el porcentaje de genes termorregulados anotados en su genoma corresponde a un 28.3 %, si bien las condiciones de crecimiento para la extracción del ARN de este trabajo fueron diferentes a las ensayadas para el desarrollo de esta Tesis. En Pph 1448A casi un 20% de los genes cuya expresión aumentaba a 18 °C están relacionados con la movilidad, entre ellos genes implicados en la biosíntesis del flagelo. La movilidad es un fenotipo que se ha asociado con temperaturas bajas (18 °C-20°C) en otros patovares del complejo *P. syringae*, como *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Hockett et al., 2013) o *P. syringae* pv. *glycinea* (Hattermann, 1989). Si a 18 °C parece que la bacteria favorece un estado móvil, a 28 °C en contraposición, parece favorecer un estado de vida sésil. A esta temperatura se observó el aumento en la expresión de genes asociados a la producción de exopolisacáridos como el alginato, que contribuyen en la formación de biofilms. En este punto, nuestros resultados en Pph 1448A presentan diferencias con *P. syringae* pv. *syringae* B728a, en la cual la síntesis de alginato se induce a temperatura baja (20 °C). Aun así, en *P. syringae* pv. *syringae* FF5 (Peñaloza-Vázquez et al., 1997) y en Pph NCP3121 (Arvizu-Gómez et al., 2013) se ha asociado igualmente la síntesis de alginato a temperaturas altas (28-32 °C), por lo que los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de este polisacárido parecen variar entre cepas.

Tanto la movilidad como la síntesis de exopolisacáridos, son fenotipos que están regulados, generalmente de forma positiva, por el sistema GacS/GacA en diversas especies del complejo *P. syringae* (Tabla 10) (Barta et al., 1992; Rich et al., 1994; Chatterjee et al., 2003b; Marutani et al., 2008; Cha et al., 2012b; L. Zhang et al., 2018). Una cepa mutante en el gen *gacA* derivada de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto DC3000) presenta niveles bajos de expresión del gen *fliC*, y una movilidad reducida (Nogales et al., 2015). Mediante ensayos de swarming y tal como sugerían los datos de ARN seq, se demostró que la movilidad es un fenotipo termorregulado, y dependiente de GacA en Pph 1448A. A su vez, datos de RT-qPCR mostraron niveles de expresión bajos del gen *fliC* en el mutante *gacA*, aunque estos datos no fueron acordes con los datos de expresión obtenidos en el ARNseq. De echo, estos últimos para el gen *fliC* no muestran diferencias significativas entre la cepa WT y *gacA::IS*, y parecen sugerir que GacA regula los genes del cluster para la biosíntesis del flagelo mediante la represión a 28 °C de alguno de estos. Las condiciones de crecimiento utilizadas para la obtención de los datos de expresión de *fliC* fueron diferentes en ambos casos, y podría explicar estas diferencias.

GacA controla la expresión génica mediante la inducción de los sARN (González et al., 2008; Brencic et al., 2009; Humair et al., 2010), los cuales se unen a las proteínas Rsm (Heeb & Haas, 2001; Vakulskas et al., 2015; Romeo & Babitzke, 2019; Sobrero & Valverde, 2020). Así mismo, en otras *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* o *P. fluorescens*, se ha observado que los genes *rsm* suelen tener funciones antagonistas al sistema GacS/GacA y, a su

vez, cada gen *rsm* puede tener funciones únicas o redundantes (Heeb & Haas, 2001; Lapouge et al., 2007; Humair et al., 2009; Miller et al., 2016; Allsopp et al., 2017). En los resultados del capítulo II solo se pudo asociar fenotipos a las cepas que contenían los genes *rsmA* y *rsmE* mutados, lo cual indicaba que RsmA y RsmE presentan funciones redundantes, pero no se pudo esclarecer si la termoregulación de la movilidad o de la biosíntesis de la faseolotoxina se producía por vía GacA-Rsm. Incluso, una cepa que contiene todos los genes *rsm* mutados mantiene aun un patrón termorregulado para la biosíntesis de la faseolotoxina, y RsmA y RsmE parecen solo participar de forma redundante en su biosíntesis a 18 °C en la primera fase de crecimiento de Pph 1448A. Esto sugiere que en Pph 1448A, los sARN deben de unirse a más de un tipo de regulador, y que la vía Rsm, no es la única para la regulación génica dependiente de GacS/GacA y de temperatura. Los resultados obtenidos en el capítulo II de esta Tesis van en la línea de los obtenidos en Pto DC3000 por Ferreiro et al. (2017). En Pto DC3000, *rsmE* parece ser el principal regulador de diversos fenotipos como la movilidad o la síntesis de alginato, e incluso actúa como un represor del T3SS (Ferreiro et al., 2018). Aun así, un estudio posterior en esta misma cepa mostró, que alguno de los fenotipos dependientes de RsmE, como la síntesis de coratina y alginato, puede estar regulados en diferente grado por el resto de genes *rsm* presente en Pto DC3000 (Ge et al., 2019).

Para la construcción de mutantes en los genes *rsm* localizados en el plásmido de 132 kb (p1448A-A) de Pph 1448A (Joardar et al., 2005) se propuso la obtención de una cepa derivada de Pph 1448A curada de p1448A-A (Δ pA). En p1448A-A se localizan un total de 11 T3Es, entre ellos *virPphA* (Chang et al., 2005; Vencato et al., 2006), por lo que la obtención de Δ pA nos permitió estudiar la importancia de p1448A-A en la virulencia y patogénesis de Pph 1448A. Este trabajo se detalla en el capítulo I de esta Tesis, y se describe la estrategia llevada a cabo para la obtención de Δ pA, así como las diferencias encontradas entre T3Es de las cepas Δ pA y RW60.

En p1448A-A se identificaron siete posibles sistemas toxina-antitoxina (TA), lo que en conjunto puede justificar que p1448A-A sea un plásmido de alta estabilidad. Es por ello que para su eliminación no se podía emplear técnicas más convencionales y se empleó una estrategia basada en la inactivación de los sistemas TA (Bardaji et al., 2019) e incompatibilidad de replicones. Debido al éxito obtenido con la cepa Δ pA, dicha estrategia podría aplicarse también a otros plásmidos de alta estabilidad.

Los resultados obtenidos marcaron que *virPphA* no parecen ser necesario para determinar el rango de huésped de Pph 1448A, ya que Δ pA no indujo HR en las variedades de judía analizadas como sí ocurría con RW60. Aun así, la pérdida de los 11 efectores contenidos en el plásmido, sí influyó en la virulencia del patógeno, llegando a no producirse la enfermedad cuando Δ pA se inoculaba a densidades de poblaciones bajas. Se observó que las diferencias encontradas

entre ΔpA y RW60, podía deberse a las diferencias en la secuencia de aminoácidos del T3E cromosómico, AvrPphE. La cepa transformada con el alelo de RW60 de *avrPphE* de ΔpA , mostro en vainas la inducción de síntomas reducidos en 7 de cada 10 casos, y la formación de áreas marrones correpondientes a una HR leve en 1 de cada 10 casos. En otros estudios ya se ha analizado que los cambios en la estructura proteica de este T3E de las razas 1, 3, 6, 8 y 9 de Pph, determinan que no se indujera una HR en la variedad de judía A43. Con estos resultados se muestra que este T3E puede ser reconocido igualmente en otras variedades de judía, pero que de forma similar a la variedad A43, los cambios en la estructura proteica parecen disminuir el reconocimiento de este T3E por parte de la planta.

Conclusiones

1. Mediante un análisis de RNA-seq, hemos determinado que en las células de Pph 1448A, crecidas en medio mínimo SSM, se induce la expresión de 204 genes a 18 °C y de 152 genes a 28 °C, lo que supone un 6 % del total de los genes anotados en el genoma de Pph 1448A.
2. Los genes termorregulados se clasificaron en 18 categorías funcionales (COG) diferentes, de los cuales casi un 20 % (70 genes) fueron agrupados en la categoría de proteínas con función desconocida.
3. A 18 °C, un total de 39 genes (19 %) están relacionados con la movilidad y adherencia del patógeno a superficies y se agruparon principalmente en las categorías de movilidad celular (16 genes) y mecanismos de transducción de señales (16 genes). A 28 °C, el 30% de los genes se distribuye entre las categorías funcionales traducción, biogénesis y estructura ribosómica (22 genes), biogénesis de la pared celular (15 genes), y biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (11 genes).
4. Mediante el análisis de ARN-seq de una cepa mutante en el gen *gacA* (*gacA::IS*), creciendo en medio mínimo SSM, se han identificado 891 genes cuya expresión varía con respecto a la cepa silvestre. Del total, 732 genes corresponden a genes no termorregulados en Pph 1448A.
5. De los 356 genes termorregulados identificados en Pph 1448A, 159 genes (45%) son a su vez dependientes de GacA.
6. La regulación por temperatura y por GacA varía entre los genes *rsm*:
 - a. El gen *rsmE* es el único gen *rsm* de Pph 1448A que presenta un patrón termorregulado dependiente de GacA. Su expresión aumenta significativamente a 18 °C con respecto a 28 °C.
 - b. Las dos copias de *rsmH3* no presentan un patrón termorregulado, pero en ausencia de GacA, su expresión aumenta significativamente a 28 °C.
7. La regulación de genes sARN es igualmente variada y compleja:
 - a. *rsmX-1*, *rsmX-4*, *rsmX-5* y *rsmZ*, presentan un patrón termorregulado, aumentado su expresión de forma significativa a 28 °C.
 - b. La expresión de todos los sARN es dependiente de GacA a ambas temperaturas, a excepción de *rsmZ*.
 - c. La expresión *rsmZ* es dependiente de GacA a 18 °C, pero no a 28 °C.
8. De las diferentes cepas mutantes *rsm* derivadas de Pph 1448A, solo las cepas con mutaciones en los genes *rsmA* y *rsmE* se asociaron a fenotipos. RsmA y RsmE presentan funciones redundantes en la producción de síntomas en judía, la expresión de los genes *hrpL* y *hrpA*,

el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, la movilidad tipo swarming a 18 °C y la inducción de la biosíntesis de la faseolotoxina a 18 °C.

9. Aunque RsmA y RsmE participan en la inducción de la biosíntesis de la faseolotoxina a 18 °C, estos no son imprescindibles. Así mismo, una cepa que contiene todos los genes *rsm* mutados sigue manteniendo un patrón termorregulado de la biosíntesis de esta toxina, por lo que parece que los genes *rsm* no parecen intervenir en la supuesta represión de la biosíntesis de la faseolotoxina a 28 °C.
10. Mediante una estrategia de curación basada en la inactivación de sistemas toxina-antitoxina e incompatibilidad de replicones, se consiguió la eliminación del plásmido A de Pph 1448A (p1448A-A).
11. Una variante de Pph 1448A curada de p1448A-A y por tanto deficiente de 11 T3E, produce síntomas típicos de grasa en vainas de judía cvs Helda y Tendergreen cuando es inoculada a altas densidades poblacionales (10^7 cfu/ml) pero no a bajas densidades poblacionales (10^5 cfu/ml).

Bibliografía

- Abbott, Z. D., Flynn, K. J., Byrne, B. G., Mukherjee, S., Kearns, D. B., & Swanson, M. S. (2016). *csrT* represents a new class of *csrA*-like regulatory genes associated with integrative conjugative elements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*, 198, 553–564. <https://doi.org/10.1128/JB.00732-15>
- Aguilera, S., Alvarez-Morales, A., Murillo, J., Hernández-Flores, J. L., Bravo, J., & De la Torre-Zavala, S. (2017). Temperature-mediated biosynthesis of the phytotoxin phaseolotoxin by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola depends on the autoregulated expression of the *phtABC* genes. *PLoS ONE*, 12(6), e0178441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178441>
- Aguilera, S., De La Torre-Zavala, S., Hernández-Flores, J. L., Murillo, J., Bravo, J., & Alvarez-Morales, A. (2012). Expression of the gene for resistance to phaseolotoxin (*argK*) depends on the activity of genes *phtABC* in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *PLoS ONE*, 7(10), e46815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046815>
- Aguilera, S., López-López, K., Nieto, Y., Garcidueñas-Piña, R., Hernández-Guzmán, G., Hernández-Flores, J. L., Murillo, J., & Alvarez-Morales, A. (2007). Functional characterization of the gene cluster from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121 involved in synthesis of phaseolotoxin. *Journal of Bacteriology*, 189(7), 2834–2843. <https://doi.org/10.1128/JB.01845-06>
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 179(18), 5655–5662. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5655-5662.1997>
- Allen, D. J., Buruchara, R. A., & Smithson, J. B. (1998). Diseases of common bean. In D. J. Allen & J. M. Lenné (Eds.), *The pathology of food and pasture legumes*. CAB International, Wallingford, UK.
- Allsopp, L. P., Wood, T. E., Howard, S. A., Maggiorcelli, F., Nolan, L. M., Wettstadt, S., & Filloux, A. (2017). RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(29), 7707–7712. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700286114>
- Alm, R. A., Boder, A. J., Free, P. D., & Mattick, J. S. (1996). Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(1), 46–53. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.46-53.1996>
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Añorga, M., Pintado, A., Ramos, C., De Diego, N., Ugena, L., Novák, O., & Murillo, J. (2020). Genes *ptz* and *idi*, coding for cytokinin biosynthesis enzymes, are essential for tumorigenesis and in planta growth by *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01294>
- Arnold, D. L., Gibbon, M. J., Jackson, R. W., Wood, J. R., Brown, J., Mansfield, J. W., Taylor, J. D., & Vivian, A. (2001). Molecular characterization of *avrPphD*, a widely-distributed gene from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola involved in non-host recognition by pea (*Pisum sativum*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58(2), 55–62. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0315>
- Arnold, D. L., Jackson, R. W., Waterfield, N. R., & Mansfield, J. W. (2007). Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends in Genetics*, 23(6), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.017>
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W., & Mansfield, J. W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: From “has bean” to supermodel. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 617–627. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00697.x>

- Arrebola, E., Cazorla, F. M., Perez-García, A., & De Vicente, A.** (2011). Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins*, 3, 1089–1110. <https://doi.org/10.3390/toxins3091089>
- Arvizu-Gómez, J. L., Hernández-Morales, A., Aguilar, J. R. P., & Álvarez-Morales, A.** (2013). Transcriptional profile of *P. syringae* pv. phaseolicola NPS3121 at low temperature: physiology of phytopathogenic bacteria. *BMC Microbiology*, 13, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-81>
- Arvizu-Gómez, J. L., Hernández-Morales, A., Jofre-Garfias, A. E., & Álvarez-Morales, A.** (2013). Temperature, the GacS/GacA system, and host metabolites regulate the type VI secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of General Plant Pathology*, 79(3), 194–197. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0443-9>
- Arvizu-Gómez, J. L., Hernández-Morales, A., Pastor-Palacios, G., Briebe, L. G., & Álvarez-Morales, A.** (2011). Integration Host Factor (IHF) binds to the promoter region of the *phtD* operon involved in phaseolotoxin synthesis in *P. syringae* pv. phaseolicola NPS3121. *BMC Microbiology*, 11, 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-90>
- Austin, S., Ziese, M., & Sternberg, N.** (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, 25(3), 729–736. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90180-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90180-X)
- Bachmann, A. S., Matile, P., & Slusarenko, A. J.** (1998). Inhibition of ornithine decarboxylase activity by phaseolotoxin: Implications for symptom production in halo blight of French bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(5–6), 287–299. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0183>
- Baker, C. S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., & Babitzke, P.** (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44(6), 1599–1610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02982.x>
- Bardaji, L., Añorga, M., Echeverría, M., Ramos, C., & Murillo, J.** (2019). The toxic guardians - Multiple toxin-antitoxin systems provide stability, avoid deletions and maintain virulence genes of *Pseudomonas syringae* virulence plasmids. *Mobile DNA*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0149-4>
- Bardaji, L., Añorga, M., Jackson, R. W., Martínez-Bilbao, A., Yanguas-Casás, N., & Murillo, J.** (2011). Miniature transposable sequences are frequently mobilized in the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025773>
- Bardaji, L., Añorga, M., Ruiz-Masó, J. A., del Solar, G., & Murillo, J.** (2017). Plasmid replicons from *Pseudomonas* are natural chimeras of functional, exchangeable modules. *Frontiers in Microbiology | Www.Frontiersin.Org*, 8, 190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00190>
- Bardaji, L., Fernández, A. J. G., & Murillo, J.** (2018). Grasa de la judía causada por *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. In Bubok Publishing: Sociedad Española de Fitopatología (Ed.), *Enfermedades de plantas causadas por bacterias*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6956404>
- Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Rodríguez-Palenzuela, P., Sundin, G. W., Ramos, C., & Murillo, J.** (2011). Sequence and role in virulence of the three plasmid complement of the model tumor-inducing bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335. *PLoS ONE*, 6(10), e25705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025705>
- Barta, T. M., Kinscherf, T. G., & Willis, D. K.** (1992). Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 174(9), 3021–3029. <https://doi.org/10.1128/jb.174.9.3021-3029.1992>
- Beier, D., & Gross, R.** (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.005>
- Bender, C. L., Alarcón, F., Alarcón-Chaidez, A., & Gross, D. C.** (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 63(2), 266–292.

- Bender, C. L., Sundin, G. W., Bender', C. L., Sundin, G. W., & Bender, C. L.** (1994). Relative fitness in vitro and in planta of *Pseudomonas syringae* containing copper and streptomycin resistance plasmids plant-pathogen interaction view project copper and antibiotic resistance in plant pathogenic bacteria. *Article in Canadian Journal of Microbiology*, 40(4), 279–285. <https://doi.org/10.1139/m94-045>
- Bennett, P. M.** (2004). Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 266, 71–113. <https://doi.org/10.1385/1-59259-763-7:071>
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris, C. E.** (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547>
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V.** (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectrum* 3(4):MB-0018-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015>
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/JB.62.3.293-300.1951>
- Berti, A. D., & Thomas, M. G.** (2009). Analysis of achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4594–4604. <https://doi.org/10.1128/JB.00457-09>
- Bertoni, G., & Mills, D.** (1987). A Simple Method to Monitor Growth of Bacterial Populations in Leaf Tissue. *Phytopathology*, 77(6), 832. <https://doi.org/10.1094/phyto-77-832>
- Braun, V., & Hantke, K.** (2011). Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.01.005>
- Brencic, A., Mcfarland, K. A., Mcmanus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., & Lory, S.** (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol.*, 73(3), 434–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x>
- Burckhardt, R. M., & Escalante-Semerena, J. C.** (2020). Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N -Acetyltransferases in Bacteria . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(2), 1–33. <https://doi.org/10.1128/membr.00090-19>
- Burkholder, W. H.** (1926). A new bacterial disease of the bean. *Phytopathology*, 16(12), 915–927. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19271100629>
- Butcher, B. G., Bronstein, P. A., Myers, C. R., Stodghill, P. V., Bolton, J. J., Markel, E. J., Filiatrault, M. J., Swingle, B., Gaballa, A., Helmann, J. D., Schneider, D. J., & Cartinhour, S. W.** (2011). Characterization of the Fur regulon in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4598–4611. <https://doi.org/10.1128/JB.00340-11>
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M. H., Wyns, L., & Loris, R.** (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 30, Issue 12, pp. 672–679). Trends Biochem Sci. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.10.004>
- Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., & Ramos, C.** (2017). Knots untie: Molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1089. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01089>
- Carrión, V. J., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Murillo, J., & de Vicente, A.** (2012). The *mbo* operon is specific and essential for biosynthesis of mangotoxin in *Pseudomonas syringae*. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036709>
- Carver, T., Berriman, M., Tivey, A., Patel, C., Böhme, U., Barrell, B. G., Parkhill, J., & Rajandream, M. A.** (2008). Artemis and ACT: Viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics*, 24(23), 2672–2676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn529>

- Cha, J. Y., Lee, D. G., Lee, J. S., Oh, J. II, & Baik, H. S.** (2012a). GacA directly regulates expression of several virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2), 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.124>
- Cha, J. Y., Lee, D. G., Lee, J. S., Oh, J.-I., & Baik, H. S.** (2012b). GacA directly regulates expression of several virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.124>
- Chakraborty, R., Volkmar, B., Hantke, K., & Cornelis, P.** (2013). Iron Uptake in Bacteria with emphasis on *E. coli* and *Pseudomonas*. *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6052-3>
- Chandler, M., & Mahillon, J.** (2013). Insertion Sequences. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 62, Issue 3, pp. 86–94). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00799-3>
- Chang, J. H., Urbach, J. M., Law, T. F., Arnold, L. W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S. R., Ausubel, F. M., & Dangl, J. L.** (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *PNAS February*, 15(7), 2549–2554. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0409660102
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R., & Chatterjee, A. K.** (2003b). GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1106–1117. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.12.1106>
- Chen, L., Li, P., Deng, Z., & Zhao, C.** (2015). Ornithine transcarbamylase ArgK plays a dual role for the self-defense of phaseolotoxin producing *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Scientific Reports*, 5(February). <https://doi.org/10.1038/srep12892>
- Cho, M. S., Jeon, Y. H., Jung Kang, M., Ahn, H. II, Baek, H. J., Wang Na, Y., Mi Choi, Y., San Kim, T., & Suk Park, D.** (2010). Sensitive and specific detection of phaseolotoxigenic and nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola by TaqMan real-time PCR using site-specific recombinase gene sequences. *Microbiological Research*, 165(7), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.001>
- Choi, K. H., Kumar, A., & Schweizer, H. P.** (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.001>
- Clarke, C. R., Hayes, B. W., Runde, B. J., Markel, E., Swingle, B. M., & Vinatzer, B. A.** (2016). Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato reveals novel chemotaxis pathways associated with motility and plant pathogenicity. *PeerJ*, 2016(10), e2570. <https://doi.org/10.7717/peerj.2570>
- Cornelis, P.** (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1637–1645. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2550-2>
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Cui, Y., Chatterjee, A., & Chatterjee, A. K.** (2001). Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(4), 516–526. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.516>
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S., & Ramphal, R.** (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 50(3), 809–824. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03740.x>
- De la Torre-Zavala, S., Aguilera, S., Ibarra-Laclette, E., Hernandez-Flores, J. L., Hernández-Morales, A., Murillo, J., & Alvarez-Morales, A.** (2011). Gene expression of *pht* cluster genes and a putative non-ribosomal peptide synthetase required for phaseolotoxin

production is regulated by GacS/GacA in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Research in Microbiology*, 162(5), 488–498. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2011.04.010>

- De Torres, M., Mansfield, J. W., Grabov, N., Brown, I. R., Ammouneh, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M., & Boch, J.** (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 47(3), 368–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02798.x>
- Del Solar, G., & Espinosa, M.** (2002). Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Molecular Microbiology*, 37(3), 492–500. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02005.x>
- Delihias, N.** (2008). Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. In *Molecular Microbiology* (Vol. 67, Issue 3, pp. 475–481). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06068.x>
- Dillon, M. M., Almeida, R. N. D., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B. S., Desveaux, D., & Guttman, D. S.** (2019). Molecular evolution of *Pseudomonas syringae* type iii secreted effector proteins. *Frontiers in Plant Science*, 10, 418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00418>
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N. D., Wang, P. W., Weir, B. S., & Guttman, D. S.** (2019). Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1606-y>
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J.** (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- Duss, O., Michel, E., Yulikov, M., Schubert, M., Jeschke, G., & Allain, F. H. T.** (2014). Structural basis of the non-coding RNA *RsmZ* acting as a protein sponge. *Nature*, 509(7502), 588–592. <https://doi.org/10.1038/nature13271>
- Evans, L. R., & Linker, A.** (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 116(2), 915–924. <https://doi.org/10.1128/jb.116.2.915-924.1973>
- Falgueras, J., Lara, A. J., Fernández-Pozo, N., Cantón, F. R., Pérez-Trabado, G., & Claros, M. G.** (2010). SeqTrim: A high-throughput pipeline for pre-processing any type of sequence read. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-38>
- Ferguson, A. R., Johnston, J. S., & Mitchell, R. E.** (1980). Resistance of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola to its own toxin, phaseolotoxin to its own toxin, phaseolotoxin. *FEMS Microbiology Letters*, 7(2), 123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1980.tb01590.x>
- Ferreiro, M.-D., Nogales, J., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjú, J., & Gallegos, M. T.** (2018). Multiple CsrA Proteins Control Key Virulence Traits in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. 31(5). <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-17-0232-R>
- Fillingham, A. J., Wood, J. R., Bevan, J. R., Crute, I. R., Mansfield, J. W., Taylor, J. D., & Vivian, A.** (1992). Avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pathovars phaseolicola and pisi confer specificity towards both host and non-host species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(92\)90066-5](https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90066-5)
- Flor, H. H.** (1955). Host-Parasite Interactions in Flax Rust: Its Genetics and Other Implications. *Phytopath*, 45, 680–685. <https://www.scienceopen.com/document?vid=7c587fc1-97b3-4e64-a9a8-39b63c04e441>
- Flores, M., Brom, S., Stepkowski, T., Girard, M. D. L., Dávila, G., Romero, D., & Palacios, R.** (1993). Gene amplification in *Rhizobium*: Identification and in vivo cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 4932–4936. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.4932>
- Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderren, L.** (2020). Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and revolutions. *Journal of Bacteriology*, 202(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>

- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Lynne Howell, P. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2(AUG), 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>
- Gao, J., Lee, K., Zhao, M., Qiu, J., Zhan, X., Saxena, A., Moore, C. J., Cohen, S. N., & Georgiou, G. (2006). Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Molecular Microbiology*, 61(2), 394–406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05246.x>
- Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2002). Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 303–313. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01020.x>
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), 469–478. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-469>
- Ge, Y., Lee, J. H., Liu, J., Yang, H. wen, Tian, Y., Hu, B., & Zhao, Y. (2019). Homologues of the RNA binding protein RsmA in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 exhibit distinct binding affinities with non-coding small RNAs and have distinct roles in virulence. *Molecular Plant Pathology*, 20(9), 1217–1236. <https://doi.org/10.1111/mpp.12823>
- Gerdes, K., Christensen, S. K., & Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 371–382. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1147>
- Gibbon, M. J., Sesma, A., Canal, A., Wood, J. R., Hidalgo, E., Brown, J., Vivian, A., & Murillo, J. (1999). Replication regions from plant-pathogenic *Pseudomonas syringae* plasmids are similar to ColE2-related replicons. *Microbiology*, 145(2), 325–334. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-325>
- Giddens, S. R., Jackson, R. W., Moon, C. D., Jacobs, M. A., Zhang, X. X., Gehrig, S. M., & Rainey, P. B. (2007). Mutational activation of niche-specific genes provides insight into regulatory networks and bacterial function in a complex environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 18247–18252. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706739104>
- Giltner, C. L., Nguyen, Y., & Burrows, L. L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 740–772. <https://doi.org/10.1128/mubr.00035-12>
- Godfrey, S. A. C., Lovell, H. C., Mansfield, J. W., Corry, D. S., Jackson, R. W., & Arnold, D. L. (2011). The Stealth episome: euppession of gene expression on the excised genomic island PPHGI-1 from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *PLoS Pathogens*, 7(3), e1002010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002010>
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., & Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 2422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>
- González-Villanueva, L., Arvizu-Gómez, J. L., Hernández-Morales, A., Aguilera-Aguirre, S., & Álvarez-Morales, A. (2014). The PhtL protein of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121 affects the expression of both phaseolotoxin cluster (Pht) and Non-Pht encoded genes. *Microbiological Research*, 169, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.05.002>
- González, N., Heeb, S., Valverde, C., Kay, E., Reimann, C., Junier, T., & Haas, D. (2008). Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-167>
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4645–4649. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4645>

- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., & Dangl, J. L.** (2006). Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria TTSS: type III secretion system. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142251>
- Grimm, C., Aufsatz, W., & Panopoulos, N. J.** (1995). The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. *Molecular Microbiology*, *15*(1), 155–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02230.x>
- Gross, M., & Rudolph, K.** (1987a). Studies on the Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced in vitro by *Pseudomonas phaseolicola* I. Indications for a Polysaccharide Resembling Alginate Acid in Seven *P. syringae* Pathovars. *Journal of Phytopathology*, *118*(3), 276–287. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb00456.x>
- Gross, M., & Rudolph, K.** (1987b). Demonstration of levan and alginate in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Phytopathology*, *120*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb04409.x>
- Guynet, C., & de la Cruz, F.** (2011). Plasmid segregation without partition. *Mobile Genetic Elements*, *1*(3), 236–241. <https://doi.org/10.4161/mge.1.3.18229>
- Guzzo, C. R., Dunger, G., Salinas, R. K., & Farah, C. S.** (2013). Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP complex responsible for the regulation of bacterial type IV pilus biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, *425*(12), 2174–2197. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.021>
- Harper, S., Zewdie, N., Brown, I. R., & Mansfield, J. W.** (1987). Histological, physiological and genetical studies of the responses of leaves and pods of *Phaseolus vulgaris* to three races of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola and to *Pseudomonas syringae* pv. coronafaciens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *31*(2), 153–172. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(87\)90061-0](https://doi.org/10.1016/0885-5765(87)90061-0)
- Hattermann, D. R.** (1989). Motility of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea and its Role in Infection. *Phytopathology*, *79*(3), 284. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-284>
- Heeb, S., & Haas, D.** (2001). Regulatory roles of the GacS / GacA two-component system in plant-associated and other Gram-Negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(12), 1351–1363. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.12.1351>
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O’Gara, F., & Haas, D.** (2000). Small, stable shuffle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(2), 232–237. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.232>
- Heeb, S., Kuehne, S. A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M. D., Haas, D., Cámara, M., & Williams, P.** (2006). Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *Journal of Molecular Biology*, *355*(5), 1026–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.045>
- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(4), 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>
- Hernández-Guzmán, G., & Alvarez-Morales, A.** (2001). Isolation and characterization of the gene coding for the amidinotransferase involved in the biosynthesis of phaseolotoxin in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(4), 545–554. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.545>
- Hernández-Morales, A., De La Torre-Zavala, S., Ibarra-Laclette, E., Hernández-Flores, J. L., Jofre-Garfias, A. E., Martínez-Antonio, A., & Álvarez-Morales, A.** (2009). Transcriptional profile of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121 in response to tissue extracts from a susceptible *Phaseolus vulgaris* L. cultivar. *BMC Microbiology*, *9*, 257. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-257>
- Hettwer, U., Gross, M., & Rudolph, K.** (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology*, *177*(10), 2834–2839. <https://doi.org/10.1128/jb.177.10.2834-2839.1995>
- Hirano, S. S., & Upper, C. D.** (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and*

Molecular Biology Reviews, 64(3), 624–653. <https://doi.org/10.1128/mubr.64.3.624-653.2000>

- Hockett, K. L., Burch, A. Y., & Lindow, S. E.** (2013). Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059850>
- Hockett, K. L., Ionescu, M., & Lindow, S. E.** (2014). Involvement of *rppH* in thermoregulation in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 196(12), 2313–2322. <https://doi.org/10.1128/JB.00057-14>
- Holmes, D. S., & Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114(1), 193–197. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90473-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90473-5)
- Hotinger, J. A., Pendergrass, H. A., & May, A. E.** (2021). Molecular targets and strategies for inhibition of the bacterial Type III Secretion System (T3SS); inhibitors directly binding to T3SS Components. *Biomolecules*, 11(2), 1–35. <https://doi.org/10.3390/BIOM11020316>
- Hrabak, E. M., & Willis, D. K.** (1993). Involvement of the *lemA* Gene in Production of Syringomycin and Protease by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(3), 368. <https://doi.org/10.1094/mpmi-6-368>
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A.** (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huang, Z., Pan, X., Xu, N., & Guo, M.** (2019). Bacterial chemotaxis coupling protein: Structure, function and diversity. *Microbiological Research*, 219, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.001>
- Huertas-Rosales, Ó., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M.** (2016). Selfregulation and interplay of Rsm family proteins modulate the lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5673–5686. <https://doi.org/10.1128/AEM.01724-16>
- Humair, B., González, N., Mossialos, D., Reimmann, C., & Haas, D.** (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *ISME Journal*, 3(8), 955–965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.42>
- Humair, B., Wackwitz, B., & Haas, D.** (2010). GacA-controlled activation of promoters for small RNA Genes in *Pseudomonas fluorescens* †. *Applied and environmental microbiology*, 76(5), 1497–1506. <https://doi.org/10.1128/AEM.02014-09>
- Huynh, T. V., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J.** (1989). Bacterial blight of soybean: Regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science*, 245(4924), 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.2781284>
- Jackson, Robert W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Sesma, A., Arnold, D. L., Gibbon, M. J., Murillo, J., Taylor, J. D., & Vivian, A.** (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10875–10880. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10875>
- Jackson, Robert W., Mansfield, J. W., Ammouneh, H., Dutton, L. C., Wharton, B., Ortiz-Barredo, A., Arnold, D. L., Tsiamis, G., Sesma, A., Butcher, D., Boch, J., Kim, Y. J., Martin, G. B., Tegli, S., Murillo, J., & Vivian, A.** (2002). Location and activity of members of a family of *virPphA* homologues in pathovars of *Pseudomonas syringae* and *P. savastanoi*. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 205–216. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00121.x>
- Jackson, Robert W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J.** (2011). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile Genetic Elements*, 1(1), 55–65. <https://doi.org/10.4161/mge.1.1.16432>
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., & Stebbins, C. E.** (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science*, 311(5758), 222–226. <https://doi.org/10.1126/science.1120131>

- Janssen, K. H., Diaz, M. R., Gode, C. J., Wolfgang, M. C., & Yahr, T. L.** (2018). RsmV, a small noncoding regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* that sequesters RsmA and RsmF from target mRNAs. *Journal of Bacteriology*, 200(16). <https://doi.org/10.1128/JB.00277-18>
- Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J. W., Walters, K., Betteridge, P., Teverson, D., & Taylor, J. D.** (1991). Gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola and *Phaseolus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 4(6), 553–562., 4. https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1991Articles/Microbe04_553.pdf
- Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D. R., & Konieczny, I.** (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Molecular Microbiology*, 44(4), 971–979. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02921.x>
- Jin, Q., & He, S. Y.** (2001). Role of the hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, 294(5551), 2556–2558. <https://doi.org/10.1126/science.1066397>
- Jin, S., Song, Y. N., Deng, W. Y., Gordon, M. P., & Nester, E. W.** (1993). The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6830–6835. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6830-6835.1993>
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R., Durkin, A. S., Giglio, M. G., Madupu, R., Nelson, W. C., Rosovitz, M. J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D. H., Zafar, N., ... Buell, C. R.** (2005). Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6488–6498. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6488-6498.2005>
- Jones, A. M., Lindow, S. E., & Wildermuth, M. C.** (2007). Salicylic acid, yersiniabactin, and pyoverdinin production by the model phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: Synthesis, regulation, and impact on tomato and Arabidopsis host plants. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6773–6786. <https://doi.org/10.1128/JB.00827-07>
- Kearns, D. B.** (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., & Trollinger, D.** (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*, 70(1), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5)
- Kimbrel, J. A., Di, Y., Cumbie, J. S., & Chang, J. H.** (2011). RNA-Seq for plant pathogenic bacteria. *Genes*, 2(4), 689–705. <https://doi.org/10.3390/genes2040689>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E.** (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:002221435490222X>
- Klinkert, B., & Narberhaus, F.** (2009). Microbial thermosensors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(16), 2661–2676. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0041-3>
- Kong, H. S., Roberts, D. P., Patterson, C. D., Kuehne, S. a, Heeb, S., Lakshman, D. K., & Lydon, J.** (2012). Effect of overexpressing rsmA from *Pseudomonas aeruginosa* on virulence of select phytotoxin-producing strains of *P. syringae*. *Phytopathology*, 102(6), 575–587. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-11-0267>
- Konkel, M. E., & Tilly, K.** (2000). Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes and Infection*, 2(2), 157–166. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00272-0)
- Kopfmann, S., Roesch, S. K., & Hess, W. R.** (2016). Type II toxin-antitoxin systems in the unicellular cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803. *Toxins*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/toxins8070228>
- Krüger, D. M., Neubacher, S., & Grossmann, T. N.** (2018). Protein–RNA interactions: Structural characteristics and hotspot amino acids. *RNA*, 24(11), 1457–1465. <https://doi.org/10.1261/rna.066464.118>
- Kumar, A., Alam, A., Bharadwaj, P., Tapadar, S., Rani, M., & Hasnain, S. E.** (2019). Toxin-

antitoxin (TA) systems in stress survival and pathogenesis. In *Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Infection Biology, Pathogenesis, Diagnostics and New Interventions* (pp. 257–274). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9413-4_15

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., & Leibler, S.** (2005). Bacterial persistence: A model of survival in changing environments. *Genetics*, 169(4), 1807–1814. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035352>
- Laflamme, B., Dillon, M. M., Martel, A., Almeida, R. N. D., Desveaux, D., & Guttman, D. S.** (2020). The pan-genome effector-triggered immunity landscape of a host-pathogen interaction. *Science*, 367(6479), 763–768. <https://doi.org/10.1126/science.aax4079>
- Lamppa, R. S., Gross, P. L., & del Río, L. E.** (2002). Identification of races of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola present in North Dakota. *Phytopathology*, 92(Suppl), S139.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H.-T., & Haas, D.** (2007). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241–253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x>
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S., & Ullrich, M. S.** (2006). Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, 152(10), 2909–2918. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28875-0>
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Côte, E., Nasser, W., & Van Gijsegem, F.** (2008). The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environmental Microbiology*, 10(3), 545–559. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01473.x>
- Lelliott, R. A., & Stead, D. E.** (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drze, P., & Van Melderren, L.** (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5513–5525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr131>
- Lewis, K.** (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Li, C. M., Brown, I. R., Mansfield, J. W., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M., & Taira, S.** (2002). The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO Journal*, 21(8), 1909–1915. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1909>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R.** (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, Y., Hao, G., Galvani, C. D., Meng, Y., De, L., Fuente, L., Hoch, H. C., & Burr, T. J.** (2007). Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology*, 153, 719–726. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002311-0>
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A.** (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: Last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*, 20(4), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.003>
- Lindeberg, M., Stavrinides, J., Chang, J. H., Alfano, J. R., Collmer, A., Dangl, J. L., Greenberg, J. T., Mansfield, J. W., & Guttman, D. S.** (2005). Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4), 275–282. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0275>

- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., Oakford, L., Yüksel, Ü., Giedroc, D. P., & Romeo, T.** (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17502–17510. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17502>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López, R.** (2004). *Caracterización de patógenos implicados en bacteriosis de judía-grano (Phaseolus vulgaris L.) en Castilla y León, puesta a punto de un método de inoculación y búsqueda de fuentes de resistencia en variedades locales* [Universidad de Valladolid, Spain].
- Ma, W., & Guttman, D. S.** (2008). Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.001>
- Macho, A. P.** (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist*, 210(1), 51–57. <https://doi.org/10.1111/nph.13605>
- Macho, A. P., Ruiz-Albert, J., Tornero, P., & Beuzón, C. R.** (2009). Identification of new type III effectors and analysis of the plant response by competitive index. *Molecular Plant Pathology*, 10(1), 69–80. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00511.x>
- Macho, A. P., Zumaquero, A., Gonzalez-Plaza, J. J., Ortiz-Martín, I., Rufián, J. S., & Beuzón, C. R.** (2012). Genetic analysis of the individual contribution to virulence of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *PLoS ONE*, 7(4), e35871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035871>
- Mackie, G. A.** (2013). RNase E: At the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 45–57. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2930>
- Makarova, K. S., Aravind, L., & Koonin, E. V.** (1999). A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Science*, 8(8), 1714–1719. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1714>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V.** (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct*, 4. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-19>
- Mann, E. E., & Wozniak, D. J.** (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>
- Manoharan, B., Neale, H. C., Hancock, J. T., Jackson, R. W., & Arnold, D. L.** (2015). The Identification of Genes Important in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola Plant Colonisation Using In Vitro Screening of Transposon Libraries. *PLOS ONE*, 10(9), e0137355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137355>
- Mansfield, J. W., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D.** (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mansfield, J. W., Jenner, C., Hockenull, R., Bennett, M. A., & Stewart, R.** (1994). Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7(6), 726–739. <https://doi.org/10.1094/MPMI-7-0726>
- Marden, J. N., Diaz, M. R., Walton, W. G., Gode, C. J., Betts, L., Urbanowski, M. L., Redinbo, M. R., Yahr, T. L., & Wolfgang, M. C.** (2013). An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 15055–15060. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307217110>
- Marques, A. S. do. A., Corbière, R., Gardan, L., Tourte, C., Manceau, C., Taylor, J. D., & Samson, R.** (2000). Multiphasic approach for the identification of the different classification

- levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola. *European Journal of Plant Pathology*, 106(8), 715–734. <https://doi.org/10.1023/A:1026563831461>
- Marutani, M., Taguchi, F., Ogawa, Y., Hossain, M. M., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y.** (2008). Gac two-component system in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci is required for virulence but not for hypersensitive reaction. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(4), 313–322. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0309-y>
- Matas, I. M., Castañeda-Ojeda, M. P., Aragón, I. M., Antúnez-Lamas, M., Murillo, J., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E., & Ramos, C.** (2014). Translocation and functional analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335 type III secretion system effectors reveals two novel effector families of the *Pseudomonas syringae* complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(5), 424–436. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0206-R>
- McCann, H. C., & Guttman, D. S.** (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist*, 177(1), 33–47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02293.x>
- McCann, H. C., Rikkerink, E. H. A., Bertels, F., Fiers, M., Lu, A., Rees-George, J., Andersen, M. T., Gleave, A. P., Haubold, B., Wohlers, M. W., Guttman, D. S., Wang, P. W., Straub, C., Vanneste, J. L., Rainey, P. B., & Templeton, M. D.** (2013). Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003503. <https://doi.org/10.1371/annotation/af157ddc-200a-4105-b243-3f01251cc677>
- Mendiola, M. V., Bernales, I., & De La Cruz, F.** (1994). Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), 1922–1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1922>
- Meyer, J. M., & Abdallah, M. A.** (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107(2), 319–328. <https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319>
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., & Holder, I. A.** (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 64(2), 518–523. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.2.518-523.1996>
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., & Filloux, A.** (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1666–1681. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x>
- Miller, C. L., Romero, M., Karna, S. L. R., Chen, T., Heeb, S., & Leung, K. P.** (2016). RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiology*, 16(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0771-y>
- Mitchell, R. E.** (1976). Isolation and structure of a chlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry*, 15(12), 1941–1947. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88851-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88851-2)
- Mucyn, T. S., Yourstone, S., Lind, A. L., Biswas, S., Nishimura, M. T., Baltrus, D. A., Cumbie, J. S., Chang, J. H., Jones, C. D., Dangl, J. L., & Grant, S. R.** (2014). Variable suites of non-effector genes are co-regulated in the type III secretion virulence regulon across the *Pseudomonas syringae* phylogeny. *PLoS Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003807>
- Mudgett, M. B.** (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 509–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144218>
- Murillo, J., Bardaji, L., & Führer, M.** (2010). La grasa de las judías, causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Phytoma*, 224, 27–32. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3767170>
- Murillo, J., Butcher, D., Jackson, R., Sundin, G. W., Vivian, A., & Arnold, D.** (2003). Methods for the identification of virulence genes in *Pseudomonas syringae*. In *Pseudomonas*

syringae and related pathogens (pp. 127–135). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0133-4_14

- Murillo, J., & Keen, N. T.** (1994). Two native plasmids of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain PT23 share a large amount of repeated DNA, including replication sequences. *Molecular Microbiology*, 12(6), 941–950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01082.x>
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A., Cooksey, D. A., & Keen, N. T.** (1994). Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. tomato PT23. *Plasmid*, 31(3), 275–287. <https://doi.org/10.1006/plas.1994.1029>
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L., & Meinhart, A.** (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biology*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001033>
- Nakatsu, Y., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., & Ichinose, Y.** (2019). Quorum-dependent expression of *rsmX* and *rsmY*, small non-coding RNAs, in *Pseudomonas syringae*. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.004>
- Neale, H. C., Laister, R., Payne, J., Preston, G., Jackson, R. W., & Arnold, D. L.** (2016). A low frequency persistent reservoir of a genomic island in a pathogen population ensures island survival and improves pathogen fitness in a susceptible host. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4144–4152. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13482>
- Newberry, E. A., Ebrahim, M., Timilsina, S., Zlatković, N., Obradović, A., Bull, C. T., Goss, E. M., Huguet-Tapia, J. C., Paret, M. L., Jones, J. B., & Potnis, N.** (2019). Inference of convergent gene acquisition among *Pseudomonas syringae* strains isolated from Watermelon, Cantaloupe, and Squash. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00270>
- Newman, J. R., & Fuqua, C.** (1999). Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene*, 227(2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00601-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00601-5)
- Nguyen, Q. M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H.** (2021). Recent advances in effector-triggered immunity in plants: New pieces in the puzzle create a different paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>
- Nimchuk, Z. L., Fisher, E. J., Desveaux, D., Chang, J. H., & Dangl, J. L.** (2007). The HopX (AvrPphE) family of *Pseudomonas syringae* type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 20(4), 346–357. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Noble, T. J., Young, A. J., Douglas, C. A., Williams, B., & Mundree, S.** (2019). Diagnosis and management of halo blight in Australian mungbeans: a review. *Crop and Pasture Science*, 70(3), 195. <https://doi.org/10.1071/CP18541>
- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T.** (2015). FleQ coordinates flagellum-dependent and -independent motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7533–7545. <https://doi.org/10.1128/AEM.01798-15>
- Nordstrom, K., & Austin, S. J.** (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annual Review of Genetics*, 23, 37–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.23.120189.000345>
- Novick, R. P.** (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 51(4), 381–395. <https://doi.org/10.1128/membr.51.4.381-395.1987>
- Nüske, J., & Fritsche, W.** (1989). Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: The influence of temperature. *Journal of Basic Microbiology*, 29(7), 441–447. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620290713>
- O'Brien, H. E., Thakur, S., & Guttman, D. S.** (2011). Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A genomics perspective. *Annual Review of Phytopathology*, 49,

- O’Leary, B. M., Neale, H. C., Geilfus, C. M., Jackson, R. W., Arnold, D. L., & Preston, G. M.** (2016). Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell and Environment*, 39(10), 2172–2184. <https://doi.org/10.1111/pce.12770>
- O’Malley, M. R., Chien, C.-F., Peck, S. C., Lin, N.-C., & Anderson, J. C.** (2020). A revised model for the role of GacS/GacA in regulating type III secretion by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant Pathology*, 21(1), 139–144. <https://doi.org/10.1111/mpp.12876>
- O’Malley, M. R., Weisberg, A. J., Chang, J. H., & Anderson, J. C.** (2019). Re-evaluation of a Tn5::gacA mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uncovers roles for *uvrC* and *anmK* in promoting virulence. *PLoS ONE*, 14(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223637>
- Oh, H. S., Kvitko, B. H., Morello, J. E., & Collmer, A.** (2007). *Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8277–8289. <https://doi.org/10.1128/JB.00998-07>
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Macho, A. P., Mansfield, J. W., & Beuzón, C. R.** (2010). Positive regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. / 665 *MPMI*, 23(5), 665–681. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Owen, J. G., & Ackerley, D. F.** (2011). Characterization of pyoverdine and achromobactin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a. *BMC Microbiology*, 11(218). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-218>
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., & López, M. M.** (2009). PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: Updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 249–297. <https://doi.org/10.4454/jpp.v91i2.957>
- Palmer, D. A., & Bender, C. L.** (1993). Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Applied and environmental microbiology*, 1619–1626. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182128/pdf/aem00034-0373.pdf>
- Paul, P., Sahu, B. R., & Suar, M.** (2019). Plausible role of bacterial toxin–antitoxin system in persister cell formation and elimination. *Molecular Oral Microbiology*, 34(3), 97–107. <https://doi.org/10.1111/omi.12258>
- Peñaloza-Vázquez, A., Kidambi, S. P., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L.** (1997). Characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Bacteriology*, 179(14), 4464–4472. <https://doi.org/10.1128/jb.179.14.4464-4472.1997>
- Pérez-Martínez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G. W., & Ramos, C.** (2008). Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 625–635. <https://doi.org/10.1128/JB.01067-07>
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Cámara, M., Haas, D., & Williams, P.** (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6676–6683. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6676-6683.2001>
- Pfeilmeier, S., Caly, D. L., & Malone, J. G.** (2016). Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective. *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1298–1313. <https://doi.org/10.1111/mpp.12427>
- Pirhonen, M. U., Lidell, M. C., Rowley, D. L., Lee, S. W., Jin, S., Liang, Y., Silverstone, S., Keen, N. T., & Hutcheson, S. W.** (1996). Phenotypic expression of *Pseudomonas syringae* avr genes in *E. coli* is linked to the activities of the hrp-encoded secretion system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(4), 252–260. <https://doi.org/10.1094/MPMI-9-0252>

- Prentki, P., & Krisch, H. M.** (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29(3), 303–313. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90059-3)
- Preston, G. M.** (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato : the right pathogen, of the right plant, at the right time . *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263–275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., & Liguori, M. J.** (2019). Comparison of RNA-Seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Frontiers in Genetics*, 10(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636>
- Records, A. R., & Gross, D. C.** (2010). Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* Type VI secretion and virulence factors. *Journal of Bacteriology*, 192(14), 3584–3596. <https://doi.org/10.1128/JB.00114-10>
- Rich, J. J., Hirano, S. S., & Willis, D. K.** (1992). Pathovar-specific requirement for the *Pseudomonas syringae lemA* gene in disease lesion formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1440–1446. <https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1440-1446.1992>
- Rich, J. J., Kinscherf, T. G., Kitten, T., & Willis, D. K.** (1994). Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 176(24), 7468–7475. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8002569>
- Richter, G. Y., Björklöf, K., Romantschuk, M., & Mills, D.** (1998). Insertion specificity and trans-activation of IS801. *Molecular and General Genetics*, 260(4), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s004380050907>
- Rico, A., Erdozain, M., Ortiz-Barredo, A., Ruiz De Galarreta, J. I., & Murillo, J.** (2006). Short communication. Detection by multiplex PCR and characterization of nontoxicogenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola from different places in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(3), 261–267. <https://doi.org/10.5424/sjar/2006043-203>
- Rico, Arantza, López, R., Asensio, C., Aizpún, M. T., Asensio-S-Manzanera, C., & Murillo, J.** (2003). Nontoxicogenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. 93(12), 1553.
- Rivas, L. A., Mansfield, J. W., Tsiamis, G., Jackson, R. W., & 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(7), 3778–3785. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3778-3785.2005>
- Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., & Barras, F.** (2013). Reprint of: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(8–9), 923–937. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.05.001>
- Rohmer, L., Guttman, D. S., & Dangl, J. L.** (2004). Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Genetics*, 167(3), 1341–1360. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.019638>
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E. L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., & He, S. Y.** (1997). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3459–3464. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3459>
- Romeo, T., & Babitzke, P.** (2019). Global Regulation by CsrA and Its RNA Antagonists. In *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea* (pp. 341–354). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0009-2017>
- Romsang, A., Dubbs, J. M., & Mongkolsuk, S.** (2016). The iron-sulfur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, 2, 1090–1102. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch106>

- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., & Martin, G. B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448(7151), 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature05966>
- Rowley, K. B., Xu, R., & Patil, S. S. (2000). Molecular analysis of thermoregulation of phaseolotoxin-resistant Ornithine Carbamoyltransferase (*argK*) from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant Pathology*, 13(10), 1071–1080. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI.2000.13.10.1071>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3401?lang=es®ion=ES>
- San José, M., Rodicio, M. R., Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & González, A. J. (2010). Regional variations in the population structure of *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola from Spain are revealed by typing with PmeI pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiling and virulence gene complement. *Microbiology*, 156(6), 1795–1804. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036152-0>
- Santander, R. D., & Biosca, E. G. (2017). *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: Evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. *PeerJ*, 2017(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.3931>
- Sarkar, S. F., & Guttman, D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1999–2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999-2012.2004>
- Sarris, P. F., Skandalis, N., Kokkinidis, M., & Panopoulos, N. J. (2010). In silico analysis reveals multiple putative type VI secretion systems and effector proteins in *Pseudomonas syringae* pathovars. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2010.00644.X>
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- Schreiber, K. J., Chau-Ly, I. J., & Lewis, J. D. (2021). What the wild things do: Mechanisms of plant host manipulation by bacterial type III secreted effector proteins. *Microorganisms*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9051029>
- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F. C., Jelesarov, I., Haas, D., & Allain, F. H. T. (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(9), 807–813. <https://doi.org/10.1038/nsmb1285>
- Schuster, C. F., & Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiology Letters*, 340(2), 73–85. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12074>
- Schuster, M., & Grimm, C. (2000). Domain switching between *hrpR* and *hrpS* affects the regulatory function of the hybrid genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant Pathology*, 1(4), 233–241. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00028.x>
- Sesma, A., Sundin, G. W., & Murillo, J. (1998). Closely related plasmid replicons coexisting in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* show a mosaic organization of the replication region and altered incompatibility behavior. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3948–3953.
- Sevin, E. W., & Barloy-Hubler, F. (2007). RASTA-Bacteria: A web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biology*, 8(8), R155. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r155>
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., & Dixon, J. E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in

bacterial pathogenesis. *Cell*, 109(5), 575–588. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00766-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00766-3)

- Sherratt, D. J., Arciszewska, L. K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N., & McCulloch, R.** (1995). Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 347(1319), 37–42. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0006>
- Shi, X. Y., Dumenyo, C. K., Hernandez-Martinez, R., Azad, H., & Cooksey, D. A.** (2009). Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: Genes and phenotypes controlled by *gacA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2275–2283. <https://doi.org/10.1128/AEM.01964-08>
- Shidore, T., & Triplett, L. R.** (2017). Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 161–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035559>
- Siguier, P., Filée, J., & Chandler, M.** (2006). Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 526–531. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.005>
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Römling, U.** (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 53(4), 1123–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>
- Simonich, M. T., & Innes, R. W.** (1995). A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(4), 637–640. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0637>
- Singh, S. P., & Schwartz, H. F.** (2010). Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. *Crop Science*, 50(6), 2199–2223. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.03.0163>
- Sirko, A., Hryniewicz, M., Hulanicka, D., & Bock, A.** (1990). Sulfate and Thiosulfate Transport in *Escherichia coli* K-12: Nucleotide Sequence and Expression of the *cysTWAM* Gene Cluster. *Journal of bacteriology*, 172(6), 3351–3357.
- Sirko, A., Zatyka, M., Sadowy, E., & Hulanicka, D.** (1995). Sulfate and Thiosulfate Transport in *Escherichia coli* K-12: Evidence for a Functional Overlapping of Sulfate- and Thiosulfate-Binding Proteins. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 177(14), 4134–4136.
- Smadja, B., Latour, X., Trigui, S., Burini, J. F., Chevalier, S., & Orange, N.** (2004). Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 19–27. <https://doi.org/10.1139/w03-099>
- Smirnova, A., Li, H., Ullrich, H. W., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K., Schenk, A., & Ullrich, M. S.** (2001). Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Arch Microbiol*, 176, 393–399. <https://doi.org/10.1007/s002030100344>
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R. A., Phillips, D. H., & Archer, S. A.** (1992). *Manual de enfermedades de las plantas*. Mundi-Prensa.
- Sobrero, P. M., & Valverde, C.** (2020). Comparative genomics and evolutionary analysis of RNA-binding proteins of the CsrA family in the genus *Pseudomonas*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00127>
- Sonnleitner, E., & Haas, D.** (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(1), 63–79. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3332-1>
- Staskawicz, B. J., & Panopoulos, N. J.** (1979). A Rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. *Phytopathology*, 69(6), 666. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-663>
- Staskawicz, B. J., Panopoulos, N. J., & Hoogenraad, N. J.** (1980). Phaseolotoxin-insensitive ornithine carbamoyltransferase of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: Basis for immunity to phaseolotoxin. *Journal of Bacteriology*, 142(2), 720–723. <https://doi.org/10.1128/jb.142.2.720-723.1980>
- Stavrinos, J., Ma, W., & Guttman, D. S.** (2006). Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens. *PLoS Pathogens*, 2(10), 0913–0921.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020104>

- Stevens, C., Bennett, M. A., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Taylor, J. D., & Mansfield, J. W.** (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. *Molecular Microbiology*, 29(1), 165–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00918.x>
- Stothard, P.** (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6). <https://doi.org/10.2144/00286ir01>
- Summers, D. K.** (1996). The Biology of Plasmids. In *The Biology of Plasmids*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444313741>
- Summers, D. K., & Sherratt, D. J.** (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: Cole 1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, 36(4), 1097–1103. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90060-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90060-6)
- Sundin, G. W., & Murillo, J.** (2009). Gene Traders: Characteristics of native plasmids from plant pathogenic bacteria. In R. W. Jackson (Ed.), *Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology* (pp. 295–310). Caister Academic Press. <https://www.caister.com/hsp/abstracts/ppb/14.html>
- Taguchi, F., & Ichinose, Y.** (2013). Virulence factor regulator (Vfr) controls virulence-associated phenotypes in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605 by a quorum sensing-independent mechanism. *Molecular Plant Pathology*, 14(3), 279–292. <https://doi.org/10.1111/mpp.12003>
- Taira, S., Tuimala, J., Roine, E., Nurmiäho-Lassila, E. L., Savilahti, H., & Romantchuk, M.** (1999). Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Molecular Microbiology*, 34(4), 736–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01635.x>
- Tampakaki, A. P., Skandalis, N., Gazi, A. D., Bastaki, M. N., Panagiotis F., S., Charova, S. N., Kokkinidis, M., & Panopoulos, N. J.** (2010). Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 347–370. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407>
- Tamura, K., Imamura, M., Yoneyama, K., Kohno, Y., Takikawa, Y., Yamaguchi, I., & Takahashi, H.** (2002). Role of phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae in the formation of halo lesions of kiwifruit canker disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(4), 207–214. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0405>
- Tan, Q., Awano, N., & Inouye, M.** (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Molecular Microbiology*, 79(1), 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07433.x>
- Tang, X., Xiao, Y., & Zhou, J. M.** (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(11), 1159–1166. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1159>
- Taylor, J. D., Dudley, C., & Presly, L.** (1979). Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Annals of Applied Biology*, 93(3), 267–277. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb06541.x>
- Taylor, J. D., Phelps, K., & Dudley, C. L.** (1979). Epidemiology and strategy for the control of halo-blight of beans. *Annals of Applied Biology*, 93(2), 167–172. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb06527.x>
- Taylor, J. D., Teverson, D. M., Allen, D. J., & Pastor-Corrales, M. A.** (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathology*, 45(3), 469–478. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-147.x>
- Templeton, M. D., Sullivan, P. A., & Shepherd, M. G.** (1984). The inhibition of ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* W by phaseolotoxin. *Biochemical Journal*, 224(2), 379–388. <https://doi.org/10.1042/bj2240379>

- The R Development Core Team.** (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <http://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>.
- Timmermans, J., & Van Melder, L.** (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(17), 2897–2908. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0381-z>
- Tourte, C., & Manceau, C.** (1995). A strain of *Pseudomonas syringae* which does not belong to pathovar phaseolicola produces phaseolotoxin. *European Journal of Plant Pathology*, *101*(5), 483–490. <https://doi.org/10.1007/BF01874471>
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., & Pachter, L.** (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, *7*(3), 562–578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>
- Trigalet, A., & Bidaud, P.** (1978). Some aspects of epidemiology of bean halo blight. *Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Vol. II., 895–902.
- Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Hockenhull, R., Jackson, R. W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M. A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J. D., & Murillo, J.** (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, the cause of bean halo-blight disease. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3204>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G.** (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T.** (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(2), 193–224. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14>
- Valentini, M., & Filloux, A.** (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 291, Issue 24, pp. 12547–12555). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., & Haas, D.** (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*, *50*(4), 1361–1379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x>
- Van Dijk, K., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Hill, A. R., Collmer, A., & Alfano, J. R.** (1999). The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *Journal of Bacteriology*, *181*(16), 4790–4797. <https://doi.org/10.1128/jb.181.16.4790-4797.1999>
- Vencato, M., Tian, F., Alfano, J. R., Buell, C. R., Cartinhour, S., Declerck, G. A., Guttman, D. S., Stavrinides, J., Joardar, V., Lindeberg, M., Bronstein, P. A., Mansfield, J. W., Myers, C. R., Collmer, A., & Schneider, D. J.** (2006). Bioinformatics-enabled identification of the HrpL regulon and type III secretion system effector proteins of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A. / *1193 MPMI*, *19*(11), 1193–1206. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Vila-Sanjurjo, A., Schuwirth, B. S., Hau, C. W., & Cate, J. H. D.** (2004). Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nature Structural and Molecular Biology*, *11*(11), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nsmb850>
- Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L.** (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, *15*(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
- Vivian, A., Murillo, J., & Jackson, R. W.** (2001). The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: Mobile arsenals? *Microbiology*, *147*(4), 763–780. <https://doi.org/10.1002/pssb.201350403>

- Webster, D. M., Atkin, J. D., & Cross, J. E.** (1983). Bacterial Blights of Snap Beans and Their Control. *Plant Disease*, 67(9), 935. <https://doi.org/10.1094/pd-67-935>
- Wen, Y., Behiels, E., & Devreese, B.** (2014). Toxin-Antitoxin systems: Their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and Disease*, 70(3), 240–249. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12145>
- Wilson, M. A., St. Amour, C. V., Collins, J. L., Ringe, D., & Petsko, G. A.** (2004). The 1.8-Å resolution crystal structure of YDR533Cp from *Saccharomyces cerevisiae*: A member of the DJ-1/ThiJ/Pfpl superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1531–1536. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308089100>
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D. G. O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S. A., & Kamoun, S.** (2012). Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 235–247. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.015933>
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J. O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., & Parsek, M. R.** (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7907–7912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1231792100>
- Wu, X., Zeng, Q., Koestler, B. J., Waters, C. M., Sundin, G. W., Hutchins, W., & Yang, C.-H.** (2014). Deciphering the components that coordinately regulate virulence factors of the soft rot pathogen *Dickeya dadantii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10), 1119–1131. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0026-R>
- Xie, L., Zeng, J., Luo, H., Pan, W., & Xie, J.** (2014). The roles of bacterial GCN5-Related N-acetyltransferases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1), 77–87. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2014007988>
- Xie, Y., Shao, X., & Deng, X.** (2019). Regulation of type III secretion system in *Pseudomonas syringae*. *Environmental Microbiology*, 21(12), 4465–4477. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14779>
- Xie, Y., Shao, X., Zhang, Y., Liu, J., Wang, T., Zhang, W., Hua, C., & Deng, X.** (2019). *Pseudomonas savastanoi* two-component system RhpRS switches between virulence and metabolism by tuning phosphorylation state and sensing nutritional conditions. *MBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02838-18>
- Xin, X.-F., Kvitko, B., & He, S. Y.** (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Yamaguchi, Y., & Inouye, M.** (2009). mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin-antitoxin systems. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 85(C), 467–500. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00812-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00812-X)
- Yeom, J.-H., Go, H., Shin, E., Kim, H.-L., Han, S. H., Moore, C. J., Bae, J., & Lee, K.** (2008). Inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E-related enzymes imply conserved functions in the regulated enzymatic cleavage of RNA. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01205.x>
- Yessad, S., Manceau, C., & Luisetti, J. A.** (1992). A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Dis.*, 76, 370–373. <https://doi.org/doi:10.1094/PD-76-0370>
- Young, J. M.** (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i1sup.2501>
- Yu, X., Lund, S. P., Greenwald, J. W., Records, A. H., Scott, R. A., Nettleton, D., Lindow, S. E., Gross, D. C., & Beattie, G. A.** (2014). Transcriptional analysis of the global regulatory networks active in *Pseudomonas syringae* during leaf colonization. *MBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01683-14>
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X. F.** (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102030.

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>

- Yucel, I., Slaymaker, D., Boyd, C., Murillo, J., Buzzell, R. I., & Keen, N. T.** (1994). Avirulence gene *avrPphC* from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 3121: A plasmid-borne homologue of *avrC* closely linked to an *avrD* allele. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7(5), 677–679. <https://doi.org/10.1094/MPMI-7-0677>
- Zhang, L., Shi, Y., Wu, Z., & Tan, G.** (2018). Characterization of response regulator GacA involved in phaseolotoxin production, hypersensitive response and cellular processes in *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae A18. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.07.001>
- Zhang, Y., & Inouye, M.** (2011). RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1418–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07506.x>
- Zhou, C., Yang, Y., & Jong, A.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*, 8(2), 172–173. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2317372/>
- Zielenkiewicz, U., & Ceglowski, P.** (2001). *Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems.*
- Zumaquero, A., Macho, A. P., Rufián, J. S., & Beuzón, C. R.** (2010). Analysis of the role of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A in interaction with the plant. *Journal of bacteriology*, 192(17), 4474–4488. <https://doi.org/10.1128/JB.00260-10>

