

**Biología de plásmidos y dinámica génica en el  
complejo *Pseudomonas syringae***

MAITE AÑORGA GARCÍA

Pamplona, 2017



Memoria presentada por

**MAITE AÑORGA GARCÍA**

Para optar al grado de Doctora por la Universidad Pública de Navarra

**Biología de plásmidos y dinámica génica en el complejo**

***Pseudomonas syringae***

**Directores**

**Dr. JESÚS MURILLO MARTÍNEZ**

Catedrático de Universidad  
Departamento de Producción Agraria  
Universidad Pública de Navarra

**Dra. LEIRE BARDAJI GOIKOETXEA**

Ayudante Doctor  
Departamento de Producción Agraria  
Universidad Pública de Navarra

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA**

Pamplona, 2017



## COMITÉ EVALUADOR

### *Presidente*

**Dr. José Manuel Palacios Alberti**

Departamento de Biotecnología  
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP)  
Universidad Politécnica de Madrid

### *Secretaria*

**Dra. Emilia López-Solanilla**

Departamento de Biotecnología  
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP)  
Universidad Politécnica de Madrid

### *Vocal*

**Dr. Francisco Cazorla López**

Departamento de Microbiología  
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM)  
Universidad de Málaga

### *Suplente*

Dr. Pablo Llop

Departamento de Producción Agraria  
Universidad Pública de Navarra

### *Revisores externos*

Dr. Jaime Cubero Dabrio

Instituto Nacional de Investigación y  
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid

Dr. José Antonio Gutiérrez Barranquero

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM)  
Universidad de Málaga

### *Suplente de los revisores externos*

Dr. José Juan Rodríguez Herva

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP)  
Universidad Politécnica de Madrid



**Dr. JESÚS MURILLO MARTÍNEZ**

Catedrático de Universidad, Área de Producción Vegetal, Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, y

**Dra. LEIRE BARDAJI GOIKOETXEA,**

Ayudante Doctor, Área de Producción Vegetal, Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra

**INFORMAN:**

que la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “**Biología de plásmidos y dinámica génica en el complejo *Pseudomonas syringae***” elaborada por **MAITE AÑORGA GARCÍA** ha sido realizada bajo nuestra dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, firman la presente en Pamplona a de Mayo de 2017,

Dr. Jesús Murillo Martínez

Dra. Leire Bardaji Goikoetxea





## Agradecimientos

Es el momento de echar la vista atrás y ver el camino recorrido... esta Tesis es el fruto de muchas horas de trabajo acompañadas de buenos y malos momentos y en la que, directa o indirectamente, han participado muchas personas opinando, enseñando, teniendo paciencia, dando ánimos, apoyando en los momentos de crisis y compartiendo los momentos de alegría. Por ello, aprovecho este espacio para agradecer a todas las personas que han facilitado que este trabajo este llegando a su final.

En primer lugar dar las gracias a mis directores de Tesis Jesús Murillo y Leire Bardaji por su enseñanza y dedicación. A Jesús por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por haber confiado en mí para realizar esta Tesis bajo su dirección. A Leire por su participación activa en este trabajo y por todo el tiempo que me ha dedicado. Han sido un gran aporte, no solamente en el desarrollo de esta Tesis, sino también en mi formación como investigadora.

A Cayo Ramos, por su disponibilidad durante mis estancias en su laboratorio, por haberme acogido en su grupo de investigación de la Universidad de Málaga donde he tenido la oportunidad de aprender y realizar gran parte de este trabajo. A los miembros de su grupo con los que he coincidido Pilar, Isabel Aragón, Eloy, Alba y Adrián, por su paciencia para enseñarme y ayudarme a inocular olivos.

A todas mis compañeras de laboratorio durante estos años Inés, Lara, Myriam y Diana, ya que hemos compartido muchas horas, pero sobre todo buenos ratos. Nos hemos dado ánimos y eso siempre ayuda. Especialmente dar las gracias a Myriam, con la que he compartido todo este camino, por escucharme, por su respaldo y su amistad.

A mis amigas Miriam y Lourdes, gracias por los buenos momentos, por el apoyo en los difíciles y por ayudarme a desconectar. A Oihana, que desde que la conocí en la carrera siempre he podido contar con ella.

Pero todo esto no hubiera sido posible sin mi familia a la que estoy muy orgullosa de pertenecer. En especial dar las gracias a mi tío Josetxo, por apoyarme y preocuparse de todos mis avances, a mi abuela Tere por cuidarnos tanto y tan bien cuando éramos pequeños a mi hermano Iker y a mí, y sobre todo a mis padres, Justo y Rakel; por la educación que me habéis dado, por los ánimos, por enseñarme a no rendirme. Gracias por vuestro apoyo incondicional y el cariño que me dais.

Y por supuesto, gracias a Dani; no tengo palabras suficientes para expresar mi agradecimiento... ya sabes lo difícil que ha sido para mí llegar hasta aquí... los

momentos de agobio, de frustraciones y aun así, siempre consigues animarme. Gracias por aguantarme, por creer en mí, por hacer más fácil mi día a día y sobre todo por estar siempre a mi lado.

A todos vosotros, GRACIAS.

## Contenido

Resumen .....	13
Capítulo 1 .....	15
Introducción general	
Objetivos.....	41
Capítulo 2 .....	43
Plasmid replicons from <i>Pseudomonas</i> are natural chimeras of functional, exchangeable modules	
Capítulo 3 .....	77
Plasticity and stability of virulence plasmids from <i>Pseudomonas syringae</i> are modulated by IS801 and multiple toxin-antitoxin systems	
Capítulo 4 .....	105
El gen <i>idi</i> , codificado en el plásmido pPsv48C, es esencial para la producción de tumores de tamaño silvestre en plantas de olivo	
Discusión general .....	133
Conclusiones .....	137
Referencias .....	139



## Resumen

La mayoría de las cepas de *Pseudomonas syringae* posee uno o más plásmidos nativos tipo PFP, que suelen albergar genes adaptativos y que facilitan el intercambio de los mismos entre poblaciones bacterianas. *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335 causa la tuberculosis del olivo (*Olea europaea*) y es un patógeno modelo para el estudio de la patogénesis bacteriana en plantas leñosas. Esta cepa contiene tres plásmidos PFP estables que han sido completamente secuenciados —pPsv48A, 80 kb; pPsv48B, 45 kb, y pPsv48C, 42 kb— y que portan varios posibles genes de virulencia. A pesar de la importancia de los plásmidos PFP en el ciclo de vida de *P. syringae*, todavía se desconocen muchos aspectos de su genética y biología, por lo que en esta Tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos: 1) identificación y caracterización funcional de un segundo origen de replicación presente en el plásmido nativo pPsv48C de *Ps* pv. savastanoi NCPPB 3335; 2) identificación de determinantes de mantenimiento presentes en los plásmidos de la cepa NCPPB 3335 y evaluación de su contribución al mantenimiento de dichos plásmidos, y 3) evaluación del papel del plásmido pPsv48C en la patogenicidad y virulencia de la cepa NCPPB 3335 en su interacción con su planta huésped, olivo. Hemos identificado un segundo replicón en pPsv48C, que es una quimera por compartir su región de control y promotor con el replicón no homólogo RepA-PFP. Hemos demostrado que este tipo de quimeras es frecuente en al menos cuatro familias de replicasas no homólogas de *Pseudomonas*, incluyendo bacterias patógenas de plantas, animales y humanos. Estos replicones constan de dos módulos funcionales e independientes correspondientes a las regiones de control (módulo REX-C), que actúa como determinante de incompatibilidad, y de replicación (módulo REX-R). Mediante ensayos funcionales, hemos determinado que los tres plásmidos de NCPPB 3335 utilizan diversas estrategias y mecanismos para aumentar su estabilidad. Así, la presencia de estos dos replicones, y especialmente del replicón RepJ, confiere una alta estabilidad a pPsv48C. Además, hemos documentado que los elementos repetitivos IS801 y MITE *Psy2* generan frecuentes deleciones y reorganizaciones plasmídicas, cuya frecuencia se reduce por un factor entre 3 y 50 debido a la acción de tres sistemas toxina-antitoxina codificados en pPsv48A y otros tres codificados en pPsv48C. Asimismo, estos sistemas reducen en dos órdenes de magnitud la frecuencia de pérdida espontánea del plásmido pPsv48A y contribuyen al mantenimiento de los genes de virulencia *ptz* (en pPsv48A) e *idi* (en pPsv48C). Mediante inactivación funcional de los sistemas de mantenimiento de pPsv48C, hemos obtenido un derivado de NCPPB 3335 curado de sus tres plásmidos nativos (cepa UPN912), que no produce tumores en olivo. Mediante inoculaciones con esta cepa y con mutantes específicos hemos demostrado que el gen *idi* —que codifica una posible isopentenil difosfato isomerasa y está probablemente implicado en la biosíntesis de citoquininas— es esencial para la producción de tumores de tamaño silvestre tanto en plantas micropropagadas como en olivos lignificados. En conjunto, nuestros resultados indican que la cepa NCPPB 3335 contiene tres plásmidos nativos de virulencia, que están expuestos a frecuentes eventos de reorganización genética cuyo efecto se ve contrarrestado por la existencia de múltiples determinantes plasmídicos de estabilidad, que a la vez contribuyen a disminuir la pérdida espontánea de los plásmidos y al mantenimiento de genes de virulencia durante el ciclo de vida de la bacteria.



# CAPÍTULO 1

## Introducción general

---

El complejo *Pseudomonas syringae* (*Ps*) engloba a un grupo heterogéneo de bacterias que, en conjunto, infecta a prácticamente cualquier planta cultivada, tanto herbácea como leñosa, así como a numerosas especies silvestres (Agrios, 2005). Su importancia económica, así como el ser un importante modelo en investigación, ha conducido a que *P. syringae* se considere una de las de bacterias fitopatógenas de mayor relevancia mundial (Mansfield *et al.*, 2012b). Esta gamma proteobacteria es aerobia estricta, posee flagelos polares y produce pigmentos fluorescentes (con alguna excepción), es oxidasa negativa y arginina dihidrolasa negativa (Hirano and Upper, 2000; Kersters and Vancanneyt, 2005). El complejo *P. syringae* se ha dividido tradicionalmente en patovares (actualmente se han descrito más de 60), designados en función de su espectro de huésped (Young, 2010; Parkinson *et al.*, 2011). Así, cada patovar generalmente infecta a un número relativamente pequeño de especies vegetales, provocando síntomas muy diversos pero típicos de cada patovar. Normalmente, estos aparecen en la parte aérea de la planta e incluyen síntomas variados, como moteado y necrosis foliares, grasa, podredumbres blandas, chancros, agallas y tumores en tallos (Horst, 1990; Agrios, 2005; Fatmi *et al.*, 2008).

En la actualidad, se ha descrito la aparición de enfermedades emergentes causadas por *P. syringae* que ocasionan importantes daños económicos; por ejemplo, los chancros que afectan a los castaños de indias (*pv. aesculi*; Green *et al.*, 2010), el chancro bacteriano del kiwi producido por *Ps pv. actinidiae*, que recientemente se ha documentado su presencia en España (Abelleira *et al.*, 2017) y la bacteriosis apical del mango causada por *Ps pv. syringae*, de gran importancia en el sur de España (Cazorla *et al.*, 1998). Además, se ha documentado la infección de nuevos huéspedes, hecho que pone de manifiesto la adaptabilidad y evolución de los patovares de *P. syringae*; un ejemplo de ello son las necrosis foliares y tumores en tallos producidos por un posible nuevo patovar (Eltlbany *et al.*, 2012; Caballo-Ponce *et al.*, 2016) que afecta a la planta ornamental dipladenia (*Mandevilla sanderi*). Estudios filogenéticos basados en genes conservados (*gyrB*, *rpoD*, *gapA* y *rpoA*) revelan que este nuevo patovar está muy relacionado filogenéticamente con el *pv. nerii* (Caballo-Ponce *et al.*, 2016).

La taxonomía de *P. syringae* es muy compleja y su clasificación en patovares, si bien ha sido muy utilizada y beneficiosa para la comunidad científica, no refleja las

relaciones filogenéticas entre las bacterias del complejo. Los datos obtenidos a partir de hibridaciones ADN-ADN permitieron clasificar estas bacterias en nueve genomoespecies (Gardan *et al.*, 1999), que se pueden considerar especies independientes. Esta clasificación se correlaciona con la generada a partir de análisis de MLSA (Multilocus sequence analysis) basados en el genoma básico (core genome) que diferencian 13 filogrupos (Sarkar and Guttman, 2004; Berge *et al.*, 2014).

El patovar *savastanoi* junto con los patovares *fraxini*, *glycinea*, *nerii*, *phaseolicola* y *retacarpa* se reclasificaron en la especie *P. savastanoi* (Gardan *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1996). Los estudios posteriores han establecido, sin embargo, que esta especie es más diversa de lo que se pensaba originalmente; así, estos seis patovares se incluyen en la genomoespecie 2 (Gardan *et al.*, 1999). En esta genomoespecie están agrupados los patovares *aesculi*, *broussonetiae*, *castaneae*, *cerasicola*, *ciccaronei*, *cunninghamiae*, *daphniphylli*, *dendropanacis*, *erobotryae*, *fraxini*, *glycinea*, *hibisci*, *mellea*, *mori*, *morsprunorum*, *myricae*, *nerii*, *phaseolicola*, *photinae*, *retacarpa*, *raphiolepidis*, *savastanoi*, *sesami*, *tabaci* y *ulmi*, así como las especies *P. savastanoi*, *P. ficuserectae*, *P. meliae* y *P. amygdali*, siendo *P. amygdali* el primer nombre válido para esta genomoespecie (Gardan *et al.*, 1999; Berge *et al.*, 2014). Fenotípicamente no se puede distinguir entre los miembros de cada genomoespecie, por lo que las reglas de la nomenclatura bacteriana no permiten la descripción formal de las nueve especies (Gardan 1999). A pesar de que *P. syringae* pv. *savastanoi* y *P. savastanoi* pv. *savastanoi* se consideran sinónimos, en esta Tesis le denominaremos *P. syringae* pv. *savastanoi*.

## ***Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* y la tuberculosis del olivo**

### **Taxonomía de *P. syringae* pv. *savastanoi***

*Ps* pv. *savastanoi* está muy relacionado filogenéticamente con los patovares *fraxini*, *nerii* y *retacarpa*. Los cuatro producen chancros o tumores en plantas leñosas, y muestran cierto solapamiento de espectro de huésped. El patovar *savastanoi* origina tumores en olivo (*Olea europea*) y en fresno (*Fraxinus excelsior*), el patovar *nerii* ocasiona tumores en adelfa (*Nerium oleander*), fresno y olivo, y el patovar *fraxini* produce chancros en fresno y olivo (Janse, 1982; Iacobellis *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2012).

### **La tuberculosis del olivo (olive knot disease)**

*Ps* pv. *savastanoi* es el agente causal de la tuberculosis del olivo (*Olea europea*), una de las enfermedades de mayor relevancia de este cultivo. La tuberculosis del olivo, conocida también como roña o agalla, se caracteriza por la aparición de tumores aéreos



en troncos, ramas, tallos y brotes y, con menor frecuencia e intensidad, en las hojas, raíces y frutos (Trapero and Blanco, 2004; Ramos *et al.*, 2012). Inicialmente los tumores son pequeños, blandos, lisos y de color verde y más tarde aumentan de tamaño, se lignifican y endurecen, presentando una superficie irregular agrietada (Schroth *et al.*, 1973). Aunque no se disponen de datos cuantitativos sobre el impacto de la enfermedad referido al rendimiento o a la calidad de los cultivos (Iacobellis, 2001; Young *et al.*, 2004), se sabe que en infecciones graves se puede dar un debilitamiento progresivo de las ramas, pérdida de vigor y, por lo tanto, de la cosecha (Tjamos *et al.*, 1993). Además, se ha descrito que la calidad de las aceitunas de olivos moderadamente infectados se ve afectada por la enfermedad, presentando olores y sabores desagradables, como amargos, rancios o salados (Schroth *et al.*, 1973; Tjamos *et al.*, 1993).

La tuberculosis del olivo se encuentra presente en todo el mundo habiéndose detectado en más de 35 países de los cinco continentes (Bradbury, 1986) y está considerada una de las enfermedades más importantes que afectan al olivo (Young *et al.*, 2004; Quesada *et al.*, 2010). En la actualidad, no existen cultivares resistentes a este patógeno pero sí cultivares con distintos grados de sensibilidad a la tuberculosis (Young *et al.*, 2004; Penyalver *et al.*, 2006). Como medida preventiva o en fases tempranas de la infección se deben aplicar tratamientos de tipo cúprico con el fin de controlar la población bacteriana desde la primera aplicación (Quesada *et al.*, 2010).

*Ps. pv. savastanoi* sobrevive como bacteria epífita hasta que penetra en la planta a través de estomas o de heridas, muchas veces provocadas por las propias prácticas culturales (Ramos *et al.*, 2012). El patógeno entonces coloniza el sistema vascular y rompe la estructura de las células vegetales que lo rodean, provocando el aumento de su tamaño (hipertrofia) y el incremento de la división celular (hiperplasia). La formación de tumores se acompaña con la proliferación bacteriana en forma de agregados bacterianos que se alojan en sus cavidades. Durante la colonización, el incremento de la densidad poblacional puede ser muy alto y los exudados bacterianos a menudo llegan a alcanzar el exterior, mediante fisuras en los tumores, convirtiéndose en una fuente de inóculo secundario de la enfermedad (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009). El desarrollo de tumores requiere de la producción de las fitohormonas ácido 3-indolacético (IAA) y citoquininas (CKs) por parte de la bacteria (Smidt and Kosuge, 1978; Comai and Kosuge, 1980; Surico *et al.*, 1985; Iacobellis *et al.*, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009; Bardaji *et al.*, 2011b).

### ***P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 335 como modelo de investigación**

*Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (Psv48), aislada en 1984 de un olivo enfermo, se ha convertido en uno de los organismos modelo para el estudio de las bases moleculares de la patogénesis de bacterias que producen enfermedades en plantas leñosas. Su virulencia y su capacidad para adquirir ADN con alta frecuencia (Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009) han favorecido su utilización como modelo de estudio. Además, se dispone del genoma cerrado de esta cepa (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Bardaji *et al.*, 2011b) (C. Ramos, comunicación personal, nº de acceso CP008742) que permite el estudio pormenorizado de los factores genéticos implicados en la supervivencia, virulencia y en la interacción de *Ps* pv. *savastanoi* con el olivo. También ha resultado crucial para el estudio de este patosistema, la puesta a punto de ensayos de patogenicidad con plantas de olivo adultas y micropropagadas (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). La obtención de un derivado de la cepa NCPPB 3335 con el vector pLRM1-GFP (contiene la proteína verde fluorescente), permite el monitoreo en tiempo real de la bacteria y del desarrollo del tumor mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica confocal (SCLM) (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009). Para un análisis más detallado de la histología de los tumores, así como para la visualización de *Ps* pv. *savastanoi* dentro de tejidos del tumor se utiliza microscopía electrónica de barrido y transmisión (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009).

### **Factores de virulencia de *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335**

Se denominan factores de virulencia a los productos de genes que permiten a un microorganismo invadir e infectar al huésped e incluyen genes involucrados en patogénesis de manera directa e indirecta (Chen *et al.*, 2005). Los avances tecnológicos y la secuenciación del genoma de la cepa *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 han permitido la identificación de diversos genes implicados en virulencia y supervivencia (Tabla 1).

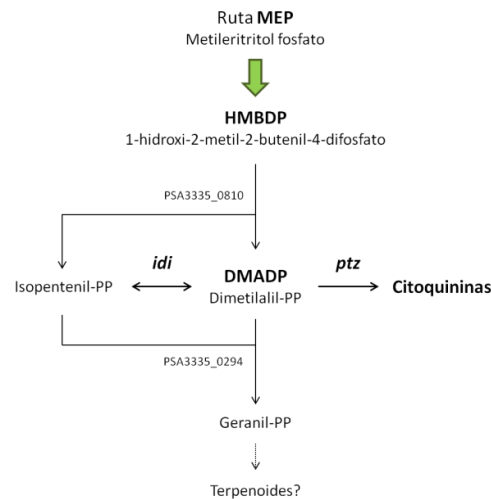
#### **Fitohormonas**

Las cepas del patovar *savastanoi* y otras bacterias fitopatógenas productoras de tumores y agallas, son capaces de biosintetizar fitohormonas como auxinas y citoquininas (CKs).

Las auxinas producidas por la bacteria pueden desequilibrar el balance de auxinas en la planta y así afectar a su crecimiento y desarrollo. La auxina de mayor importancia es el ácido indol-3-acético (IAA), cuya ruta de biosíntesis mejor caracterizada es la del indol-3-acetamida (IAM) en la que la síntesis de IAA se produce a partir de triptófano formando indolacetamida (IAM), mediante la enzima triptófano monooxigenasa (gen *iaaM*) (Zhao, 2010). La enzima indolacetamida hidrolasa (gen *iaaH*) transforma este

producto intermedio en IAA. (Magie *et al.*, 1963; Kosuge *et al.*, 1966). En el patovar nerii —que infecta adelfa— la enzima (indol-3-acetil)-L-lisina sintetasa (gen *iaaL*) es la encargada de transformar IAA en IAA-lisina, compuesto menos activo (Glass and Kosuge, 1988). Los genes *iaaM/iaaH* en las cepas del patovar savastanoi se encuentran formando un operón y muestran homología con los genes *tms1* y *tms2* localizados en el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa NCPPB 3335 presenta dos copias cromosómicas de los genes *iaaM* e *iaaH*, que aparecen organizados en dos operones: *iaaM-1/iaaH-1* e *iaaM-2/iaaH-2*, aunque únicamente es funcional el operón *iaaM-1/iaaH-1* (Aragón *et al.*, 2014). Además, los análisis de un mutante del operón *iaaM-1/iaaH-1* y de un doble mutante (que contienen los operones *iaaM-1/iaaH-1* e *iaaM-2/iaaH-2* mutados) mostraron que estos seguían produciendo auxinas, si bien en cantidades muy reducidas, poniendo de manifiesto que en NCPPB 3335 existe una vía alternativa de biosíntesis de IAA que no se ha identificado hasta la fecha (Aragón *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que el IAA actúa como molécula señal que afecta a la expresión de otros genes relacionados con virulencia, como efectores del sistema de secreción tipo III y tipo VI (Aragón *et al.*, 2014). En cuanto a su distribución, el operón *iaaMH* del patovar savastanoi está presente sólo en algunas cepas del complejo *P. syringae* (Glickmann *et al.*, 1998).

Las CKs están bien descritas por su papel en los procesos de desarrollo de la planta, como la formación de raíces y brotes mediante la regulación del ciclo celular y la diferenciación, así como en las respuestas de defensa frente a estreses (Fosket and Torrey, 1969; Barciszewski *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Carimi *et al.*, 2003; Sakakibara, 2006; O'Brien and Benková, 2013). Las CKs son hormonas vegetales derivadas de la adenosina (AMP, ADP o ATP) que poseen una cadena lateral isoprenoide o aromática en posición N<sup>6</sup>; la cadena isoprenoide puede derivar de dos vías, la vía del mevalonato (MVA) o del metileritritol fosfato (MEP). El primer paso en la biosíntesis de las CKs (en la ruta MVA) es llevado a cabo por la enzima isopentenil transferasa (gen *idi*, isopentenil-difosfato delta isomerasa; anteriormente denominado *ipt*) que transforma el isopentenil pirofosfato en dimetilalil difosfato (DMAPP), que es un paso importante en la ruta del MVA (Sakakibara, 2006). Posteriormente, mediante un proceso de hidroxilación se origina transzeatina (gen *ptz*. *Pseudomonas trans zeatin*; codifica una isopentenil transferasa) usando dimetilalil difosfato (DMAPP) o hidroximetilbutenil difosfato (HMBDP) como substrato (Fig. 1) (Sakakibara, 2006). *Ps. savastanoi* no dispone de los genes de la ruta MVA.



**Figura 1. Ruta simplificada de biosíntesis de citoquininas en la cepa NCPPB 3335.** Participan los genes plasmídicos *idi* y *ptz* y los genes cromosómicos PSA3335\_0810 (posible HMBDP reductasa) y PSA3335\_0294 (posible geranil transferasa) mediante la vía MEP. Ruta modificada de KEGG.

El gen *ptz* se encuentra en el plásmido nativo pPsv48A de NCPPB 3335, así como en cromosomas y plásmidos de otras cepas productoras de tumores pertenecientes a los patovares *savastanoi*, *nerii* y *retacarpa* (datos no mostrados) (Caponero *et al.*, 1995; Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2012). Por otro lado, la mayoría de los aislados del pv. *fraxini* producen IAA en cultivo, pero no CKs, y dan lugar a chancros, excepto la cepa NCPPB 3474, que produce IAA y CKs y genera tumores en olivo y fresno (Iacobellis *et al.*, 1998). Algunos autores (Scott and Horgan, 1984) sostienen que la expresión del gen *ptz* no es constitutiva y se inicia una vez que la concentración de IAA ha alcanzado su nivel máximo.

En cuanto a la distribución del gen *idi*, presente en el plásmido pPsv48C de NCPPB 3335, se han encontrado homólogos de este gen en gran variedad de bacterias (datos no mostrados), sin embargo, su contribución al desarrollo de los tumores es todavía desconocida. En el capítulo 4 de esta Tesis evaluamos el papel de los genes *ptz* e *idi* en la producción de CKs y, por consiguiente, en el desarrollo de los tumores en olivo. Las CKs no son necesarias para la producción de tumores, pero sí lo son para el desarrollo completo de la enfermedad en adelfa y olivo (Iacobellis *et al.*, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008; Bardaji *et al.*, 2011b).

**Tabla 1.** Genes más importantes de función conocida presentes en *Ps. pv. savastanoi* NCPPB 3335.

Rasgo afectado	Gen responsable	Función	Referencia
Producción de fitohormonas	<i>iaaMH</i> (operón)	Biosíntesis de IAA	(Aragón <i>et al.</i> , 2014)
	<i>ptz</i>	Biosíntesis de CKs	(Iacobellis <i>et al.</i> , 1994; Rodríguez-Moreno <i>et al.</i> , 2008; Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
T3SS	<i>hrcC</i>	Formación de poros en la membrana	(Sisto <i>et al.</i> , 2003)
	<i>hrpA</i>	Formación del pilus	(Pérez-Martínez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>hrpR</i>	Expresión de genes del regulón hrp	(Cerboneschi <i>et al.</i> , 2016)
	<i>hrpL</i>		(Matas <i>et al.</i> , 2012)
Efectores T3SS	<i>hopAO1</i>	Tirosina fosfatasa	(Underwood <i>et al.</i> , 2007)
	<i>hopAB1</i>	Ubiquitina ligasa	(Janjusevic <i>et al.</i> , 2006)
Detección del quorum	<i>luxI</i>	Producción	(Hosni <i>et al.</i> , 2011)
	<i>luxR</i>	exopolisacáridos	
Metabolismo di-GMPc	<i>bifA</i>	Motilidad, formación	(Aragón <i>et al.</i> , 2015)
	<i>dgcP</i>	de biofilms, expresión	(Aragón <i>et al.</i> , 2015)
	<i>pleD</i>	de genes del T6SS	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2014)
Metabolismo de fenoles	<i>antABC</i> (operón)	Catabolismo de antranilato	(Caballo-Ponce <i>et al.</i> , 2017)
	<i>catBCA</i> (operón)	Catabolismo de catecol	
	<i>ipoABC</i> (operón)	Actividad oxigenasa	

Tabla adaptada de Caballo-Ponce *et al.*, 2017.

### **Sistema de secreción tipo III**

Muchas bacterias fitopatógenas, entre ellas *P. syringae*, utilizan un sistema de secreción tipo III (T3SS) para translocar proteínas especializadas, llamadas efectores, al

citoplasma de la célula vegetal donde contribuyen a la supresión de las respuestas de defensa de la planta y al establecimiento de una infección (Mansfield, 2009). El T3SS está codificado por el operón *hrp/hrc* (respuesta de hipersensibilidad y patogenicidad), se encuentra conservado en *P. syringae* y muestra características típicas de las islas de patogenicidad (PAI). Los genes *hrcC* codifican proteínas estructurales, los genes *hrpR/S* y *hrpL* regulan la expresión de las proteínas y el gen *hrpA* codifica la proteína estructural del pilus. Mediante la obtención de mutantes defectivos para estos genes, se ha demostrado la implicación del operón *hrp/hrc* en patogenicidad en *P. syringae* (Hutcheson *et al.*, 2001; Mohr *et al.*, 2008; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Matas *et al.*, 2012; Matas *et al.*, 2014).

En ocasiones, los efectores son reconocidos por la maquinaria de la planta, lo que lleva a la activación de una respuesta de defensa general conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR), que conduce a un fenotipo de resistencia en la planta codificado por el gen de resistencia (R). En este caso, los efectores reciben el nombre de Avr (avirulence protein). La interacción entre las proteínas Avr (bacteria) y el producto del gen R (planta) dan lugar a la diferenciación de razas en los patovares de *P. syringae* (Alfano and Collmer, 2004; Jones and Dangl, 2006). La localización de los genes *hop* puede ser cromosómica o plasmídica (Vivian and Gibbon, 1997). En el caso de *Ps* pv. savastanoi NCPPB 3335, sólo dos genes *hop* (*hopAF1-1* y *hopAO1*) son de localización plasmídica (Bardaji *et al.*, 2011b). Además, se ha demostrado que siete de los 33 efectores presentes en la cepa NCPPB 3335 (*avrRpm2*, *hopA1*, *hopAA1*, *hopAZ1*, *hopBK1*, *hopBL1* y *hopBL2*) son translocados al interior de la célula e interfieren con la respuesta de defensa de la planta (Matas *et al.*, 2014; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2016). De entre los 33 efectores, dos efectores son homólogos a otros de función conocida, *hopAO1* es una tirosina fosfatasa (Underwood *et al.*, 2007) y *hopAB1* es una ubiquitina ligasa (Janjusevic *et al.*, 2006).

Además del T3SS, las bacterias fitopatógenas disponen de otros cinco sistemas de secreción (I-VI). El T1SS está relacionado con la secreción de proteínas implicadas en virulencia, toxinas y moléculas del sistema de regulación por quórum sensing (QS). El T2SS secreta proteínas al apoplasto y los tipos V y VI están implicados en la translocación extracelular de proteínas. Del sistema de secreción tipo IV hablaremos más adelante por su papel en los procesos conjugativos.

### **Metabolismo del di-GMP cíclico**

El metabolismo del segundo mensajero di-GMP cíclico (c-di-GMP) también contribuye a la virulencia de *Ps* pv. savastanoi y actúa regulando la motilidad (swimming y

swarming), la síntesis de componentes de la matriz extracelular y la producción de exopolisacáridos (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Aragón *et al.*, 2015). La síntesis de este compuesto se produce a partir de diguanato ciclasas y es degradado por fosfodiesterasas. En la cepa NCPPB 3335 se ha demostrado su implicación en virulencia y adaptación, ya que la mutación de genes implicados en este proceso como *bifA* (fosfodiesterasas) y *dgcP* (diguano ciclasas) producen una reducción en el volumen de los tumores en olivo (Aragón *et al.*, 2015).

### **Metabolismo de compuestos aromáticos**

En el genoma de la cepa NCPPB 3335 y en otros patógenos de plantas leñosas, se encuentra presente una región de 15 kilobases denominada VR8, que está relacionada con el metabolismo de compuestos aromáticos (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2012). Estos compuestos forman parte de la maquinaria de defensa natural de la planta contra los ataques de patógenos, produciéndose un incremento de su concentración en los tumores inducidos por *Ps pv. savastanoi* (Cayuela *et al.*, 2006). Estudios más recientes la denominan región WHOP (woody host and *Pseudomonas*) (Caballo-Ponce *et al.*, 2017) y demuestran su implicación en la adaptación de las bacterias a huéspedes leñosos, ya que sólo se encuentra presente en patógenos de plantas leñosas (Ramos *et al.*, 2012; Bartoli *et al.*, 2015; Nowell *et al.*, 2016; Caballo-Ponce *et al.*, 2017). En la cepa NCPPB 3335, la región WHOP se estructura en cuatro operones (*antABC*, *catBCA*, *ipoABC* y *dhoAB*) y tres genes que se transcriben de manera independiente (*antR*, PSA3335\_3206 y *benR*). Los genes que componen esta región presentan actividad catalítica sobre compuestos aromáticos derivados de las plantas como el antranilato (*antABC*) y el catecol (*catBCA*) y favorecen la colonización de órganos leñosos (Caballo-Ponce *et al.*, 2017).

### **Quórum sensing**

Las bacterias fitopatógenas como *P. syringae* han incorporado mecanismos de detección del quórum (QS, quórum sensing) que permiten a la bacteria controlar genes implicados en patogenicidad y colonización del huésped mediante la secreción y detección de pequeñas moléculas señal (von Bodman *et al.*, 2003). La virulencia de *Ps pv. savastanoi* está estrechamente ligada con la regulación del QS; en la cepa DAPP-PG 722 este sistema lo forman un gen homólogo a *luxI* (*pssI*), que codifica una molécula señal y otro gen homólogo a *luxR* (*pssR*) que sintetiza la proteína que se une a la molécula señal modificando de esta forma la transcripción de una serie de genes (Hosni *et al.*, 2011). Debido a que los factores reguladores del QS son necesarios para la patogénesis, el diseño de mecanismos que interfieran en la señalización del QS podría permitir controlar enfermedades bacterianas (von Bodman *et al.*, 2003).



### **Otros factores de virulencia**

Basándonos en la anotación del genoma de NCPPB 3335 se han encontrado 551 genes potencialmente implicados en varios aspectos relacionados con la virulencia y el “fitness” de la bacteria (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). Entre ellos se incluyen genes que codifican enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular, genes implicados en producción de exopolisacáridos (favorecen la adhesión y protección de las células frente al estrés), en producción de sideróforos, de toxinas, así como genes relacionados con procesos de movilidad y quimiotaxis (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). Además, la secuenciación de los plásmidos nativos de NCPPB 3335 reveló la localización plasmídica de genes implicados en procesos de patogénesis en plantas (Bardaji *et al.*, 2011b).

### **El moviloma de *Pseudomonas syringae* está asociado a su virulencia**

El concepto de “moviloma” hace referencia a la totalidad del ADN susceptible de movilizarse en el genoma de la propia célula, así como de transferirse y alojarse en el genoma de otra célula. Esto último se conoce como la transferencia horizontal de genes —HGT, horizontal gene transfer— y tiene gran impacto en los genomas de procariontes, ya que puede generar cambios que permitan a los microorganismos adaptarse a nichos ecológicos desfavorables (Ochman *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2003). De hecho, estudios multilocus realizados con cepas pertenecientes a 21 patovares de *P. syringae*, concluyeron que el moviloma del complejo tiene un gran impacto en la especificidad de huésped (Sarkar and Guttman, 2004). Esto se debe a que multitud de factores de virulencia y de adaptación al medio forman parte de elementos genéticos móviles —MGE, mobile genetic element— que se transfieren con alta frecuencia entre las poblaciones de *P. syringae* (Sundin, 2007; Lindeberg *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2011; Bardaji *et al.*, 2017b).

### **Biología de los plásmidos nativos**

Uno de los tipos de elementos genéticos móviles que frecuentemente se asocia a bacterias, y también a las fitopatógenas como *P. syringae*, son los plásmidos (Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007; Jackson *et al.*, 2011). Básicamente, son moléculas circulares de ADN de cadena doble, que se replican autónomamente en la célula bacteriana y se intercambian entre individuos que, a menudo, pertenecen a especies filogenéticamente muy alejadas. Los plásmidos son MGEs relativamente complejos que, además de contener un ADN cargo (repertorio de genes de interés agrícola, clínico y ambiental) contienen ADN que codifica funciones básicas para la supervivencia del mismo, como



son la replicación, el mantenimiento en la población y la transferencia a otras células (Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007; Lipps, 2008; Jackson *et al.*, 2011).

### **La replicación**

Se denomina replicón al fragmento mínimo de ADN que se replica autónomamente, manteniendo el mismo número de copia que el del plásmido del que proviene (Nordström and Austin, 1989). Normalmente consiste en un origen de replicación (*ori*), genes y estructuras implicadas en el control de la replicación y un gen que codifica para una proteína de iniciación de la replicación (proteína Rep), que reconoce el origen y comienza la replicación (del Solar *et al.*, 1998a). Además, para controlar la replicación, los plásmidos cuentan con un sistema de retroalimentación negativa que limita la propagación del plásmido regulando su número de copia (Nordström and Austin, 1989). Estos sistemas que controlan el número de copia pueden ser secuencias repetidas (iterones) ARN antisentido o proteínas con papel auxiliar o de regulación (proteínas represoras de la transcripción) (del Solar and Espinosa, 1992).

En los plásmidos circulares se pueden distinguir tres modos de replicación, theta, desplazamiento de hebra y círculo rodante (del Solar *et al.*, 1998a; Lilly and Camps, 2015a). La replicación tipo theta ha sido la más ampliamente estudiada en los plásmidos circulares de bacterias Gram negativas (del Solar *et al.*, 1998a). Este modo de replicación es similar a la replicación cromosómica y se divide en 4 clases (A-D) (Bruand *et al.*, 1993a).

La mayoría de los plásmidos pertenecientes a *P. syringae* son de tipo PFP (pPT23A family plasmid); comparten un módulo de replicación altamente conservado, RepA indicando su evolución a partir de un antecesor común (Murillo and Keen, 1994). Estos a su vez, están relacionados con el replicón ColE2 perteneciente a la clase C de replicación vía theta (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999; Sesma *et al.*, 2000; Sundin, 2007). Los PFPs pueden llegar a coexistir de manera estable en la misma célula, aunque se desconocen los mecanismos que permiten superar la incompatibilidad entre replicones tan similares (Novick, 1987; Sesma *et al.*, 1998). Aunque la mayoría de plásmidos de *P. syringae* pertenecen a la familia PFP, se han identificado plásmidos con otros replicones, como por ejemplo, los plásmidos pPMA4326D y pPMA4326E (Stavrinides and Guttman, 2004) de la cepa ES4326 del patovar maculicola o el plásmido pPS10 de la cepa PS93 de savastanoi (Nieto *et al.*, 1990). Además, estudios de macroarrays indican que estos plásmidos no pertenecientes a la familia PFP (no-PFPs), también contienen genes que podrían estar implicados en virulencia y adaptación al huésped (Pérez-Martínez *et al.*, 2008).

## **Sistemas de mantenimiento**

Los plásmidos son elementos genéticos no esenciales para el metabolismo de la célula portadora, por lo que se sitúan a caballo entre parásitos celulares —ya que la célula invierte energía en su replicación— y elementos beneficiosos (Guynet and de la Cruz, 2011). Por esta razón, estos elementos han desarrollado tres estrategias básicas para asegurar su herencia vertical en la población bacteriana, que son la resolución de multímeros de la molécula, la repartición equitativa de los plásmidos a cada célula hija, mediante los llamados sistemas de partición, y finalmente la muerte post segregacional —PSK, postsegregational killing systems—, mediada por los sistemas toxina-antitoxina y que consiste en la eliminación de las células hijas libres de plásmido (Fig. 3) (Sengupta and Austin, 2011).

### ***Resolución de multímeros***

Los multímeros se forman por recombinación homóloga de dos o más copias del mismo plásmido. Este fenómeno produce inestabilidad al reducir el número de unidades de plásmido que se transmiten verticalmente a las células hijas y aumentar, por lo tanto, la probabilidad de obtener células libres de plásmidos en la población (Austin *et al.*, 1981; Summers and Sherratt, 1984; Nordström and Austin, 1989). Las proteínas Mrp (multimer resolution protein) son enzimas tipo recombinasas de tirosina o serina (Sengupta and Austin, 2011; Warth and Altenbuchner, 2013) y se encargan de “resolver” los multímeros en monómeros antes de la división celular, aumentando así el número de moléculas disponibles para su distribución (Sherratt *et al.*, 1995; Zielenkiewicz and Cegłowski, 2001). Los sistemas de resolución de multímeros (Tabla 2) pueden estar codificados en su totalidad en el plásmido, como por ejemplo el sistema Cre/*loxP* del plásmido P1 (Austin *et al.*, 1981), o distribuirse los genes codificantes entre el plásmido y el genoma del huésped, como por ejemplo el sistema *cer* del plásmido ColE1, que forma un complejo con los productos de los genes cromosómicos *xerC*, *xerD*, *argR* y *pepA* (Summers and Sherratt, 1984; Summers and Sherratt, 1988; Sharpe *et al.*, 1999).

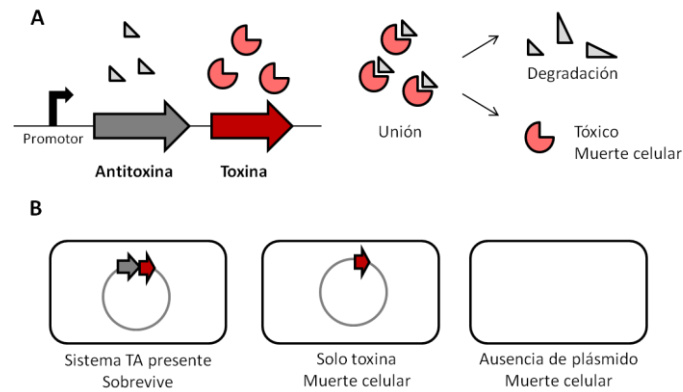
### ***Sistemas de partición***

Los sistemas de partición (sistemas *par*) son sistemas activos que se encargan de que cada célula hija generada en la división celular reciba al menos una copia del plásmido (Gordon *et al.*, 1997; Niki and Hiraga, 1997; Ebersbach *et al.*, 2005; Bouet *et al.*, 2007; Schumacher *et al.*, 2007; Salje *et al.*, 2010). Estos sistemas son especialmente importantes en plásmidos de gran tamaño que, por suponer una carga metabólica muy elevada para la célula huésped, tienden a aparecer en una o muy pocas copias. En ausencia de este sistema, los plásmidos se distribuirían al azar y podrían perderse fácilmente (Guynet and de la Cruz, 2011). Los sistemas *par* tienen tres componentes:

una proteína motora (una NTPasa) que físicamente moviliza cada copia del plásmido hacia los extremos en la división celular, un sitio de partición (reconocimiento) en el plásmido y una proteína adaptadora que se une al sitio *par* y que a su vez se une a la proteína motora (Guynet and de la Cruz, 2011; Baxter and Funnell, 2014). Los sistemas *par* están muy estudiados y se clasifican en tres grupos en función del tipo de proteína motora que emplean (Tabla 2) (Gerdes *et al.*, 2000). Sin embargo, se han descrito sistemas de partición sin actividad NTPasa que podría estar empleando un factor cromosómico como proteína motora.

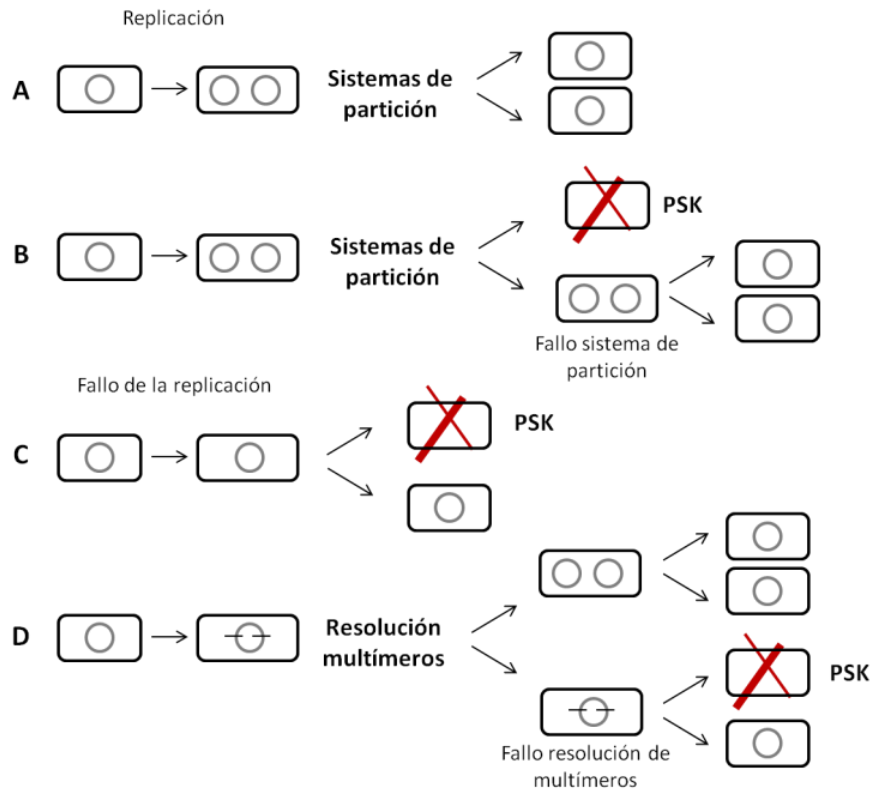
### **Sistemas Toxina-Antitoxina**

Finalmente, los sistemas de adicción se pueden considerar sistemas cuasi parasíticos que aseguran su propia permanencia, y por ende la del plásmido (Jensen and Gerdes, 1995; Engelberg-Kulka and Glaser, 1999; Van Melderen and De Bast, 2009). Se ha postulado también que su éxito evolutivo se corresponde con una mayor capacidad de los plásmidos provistos de este tipo de sistemas para competir con otros plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad (Cooper and Heinemann, 2000b). Estos sistemas de adicción engloban a los sistemas toxina-antitoxina (TA) y a los sistemas de restricción y modificación (RM). Los sistemas TA se encuentran ampliamente distribuidos en plásmidos y cromosomas de células procariotas y generalmente se componen de dos genes organizados en un operón; el primer gen codifica una antitoxina que contrarresta la acción de la toxina codificada por el segundo gen (Gerdes *et al.*, 2005; Leplae *et al.*, 2011). Las toxinas son proteínas estables (en algunos casos son pequeños ARNm) que inhiben algún proceso celular esencial, como por ejemplo la replicación del ADN (Jiang *et al.*, 2002), la traducción (Yamaguchi and Inouye, 2009; Zhang and Inouye, 2011), la síntesis de peptidoglicanos (Mutschler *et al.*, 2011) o la división celular (Tan *et al.*, 2011). Las antitoxinas son lábiles (Buts *et al.*, 2005; Schuster and Bertram, 2013) y su expresión debe ser constante para mantener la inhibición de la correspondiente toxina. En los casos en los que el plásmido con un sistema TA se pierde, la antitoxina se deja de producir y el remanente se degrada con rapidez, por lo que su efecto inhibitorio se pierde y la toxina se activa produciendo la muerte celular (Fig. 2) (Unterholzner *et al.*, 2013).



**Figura 2. Esquema del funcionamiento de un sistema TA tipo II.** La antitoxina de naturaleza proteica se une a la toxina y evita la muerte celular (A). Si el plásmido se pierde, la antitoxina se degrada y la toxina mata a la célula (B). Figura adaptada de Mruk and Kobayashi (2013).

Los sistemas TA se asignan a cinco grandes grupos (I-V), dependiendo de la naturaleza de la antitoxina y de la regulación del sistema (Tabla 2). Los del tipo I y III están provistos de antitoxinas que consisten en ARNs no codificantes, mientras que en el resto de grupos el antídoto es una proteína (Fozo *et al.*, 2008). El tipo II es el mejor caracterizado y en ellos la antitoxina neutraliza el efecto de su toxina mediante su unión directa proteína-proteína (Fig. 3) (Leplae *et al.*, 2011; Rocker and Meinhart, 2016). Además, se ha demostrado que muchos sistemas TA pertenecientes a este tipo son híbridos, y contienen una toxina de una familia y la antitoxina de otra familia, siendo totalmente funcionales (Grady and Hayes, 2003; Schmidt *et al.*, 2007; Unterholzner *et al.*, 2013) (Unterholzner *et al.*, 2013). Los tipos IV y V sólo constan de un miembro, los sistemas CbeA/CbtA (también denominado yeeU/yeeV) y GhoS/GhoT, respectivamente (Masuda *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). En ocasiones, ocurre que sólo se encuentra presente la toxina o la antitoxina en ausencia de su correspondiente pareja. En estos casos, es posible que la pareja de estas “toxinas solitarias” o “antitoxinas solitarias” esté codificada en otro plásmido o en el cromosoma (Mruk and Kobayashi, 2013). De manera similar a los TA, los sistemas de restricción y modificación (RM), especialmente los RM de Tipo II, también pueden llevar a la muerte de aquellas células que no mantengan el plásmido en el que se alojan (Ishikawa *et al.*, 2010; Mruk and Kobayashi, 2013). Los RM consisten en dos genes que codifican para una metiltransferasa (enzima de modificación) que metila una secuencia específica de DNA (antitoxina), y que por tanto evita que sea reconocida por la endonucleasa que codifica el segundo gen (2013).



**Figura 3. Sistemas de mantenimiento presentes en los plásmidos.** La replicación del plásmido duplica el número de plásmidos en cada célula. 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 (A). En algunos casos las células contienen dímeros que se han formado por recombinación (D). Estos se reducen a monómeros mediante el sistema de resolución de multímeros (D). A veces la replicación, el sistema de partición del plásmido o la resolución de multímeros no funcionan correctamente (B, C y D). En cada caso, la división celular produce una célula que contiene un plásmido que se devuelve a la población y una que no tiene copia de plásmido. Los sistemas TA, también llamados PSK, aseguran la supervivencia de las células que heredan el plásmido, si carecen de plásmido sufren la muerte celular.

**Tabla 2.** Ejemplos de sistemas de mantenimiento presentes en plásmidos.

Estrategia de supervivencia y tipo		Plásmido y huésped	Referencia
<b>Sistemas de partición</b>			
Ia	ParA/ParB	P1 profago de <i>E. coli</i>	(Li and Austin, 2002)
Ia	SopA/SopB	F de <i>E. coli</i>	(Mori <i>et al.</i> , 1989)
Ib	RepB/RepC	pAD1 de <i>Enterococcus faecalis</i>	(Clewell, 2007)
Ib,II	ParA/ParB, ParR/ParM	pB171 de <i>E. coli</i>	(Ebersbach and Gerdes, 2001)
II	ParR/ParM	R1 de <i>E. coli</i>	(Gerdes <i>et al.</i> , 1985; Gerdes and Molin, 1986)
III	TubZ/TubR	pXO1 de <i>Bacillus anthracis</i>	(Tinsley and Khan, 2006)
<b>Sistemas de resolución de multímeros</b>			
Tirosina	Cre/ <i>loxP</i>	P1 profago de <i>E. coli</i>	(Austin <i>et al.</i> , 1981)
Tirosina	ResD/ <i>rfs</i>	F de <i>E. coli</i>	(Lane <i>et al.</i> , 1986)
Tirosina	RsdB/ <i>crs</i>	pSDL2 de <i>Salmonella enterica</i>	(Krause and Guiney, 1991)
Serina	ParA/ <i>res</i>	RK2/RP4 de <i>E. coli</i>	(Easter <i>et al.</i> , 1998)
<b>Sistemas TA</b>			
I	Hok/Sok	R1 de <i>E. coli</i>	(Gerdes <i>et al.</i> , 1986)
II	CcdA/CcdB	F de <i>E. coli</i>	(Ogura and Hiraga, 1983)
II	PemI/PemK (Kis/Kid de R1)	R100 de <i>E. coli</i>	(Jensen and Gerdes, 1995)
II	ParD/ParE	RK2/RP4 de <i>E. coli</i>	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
II	Phd/Doc	P1 profago de <i>E. coli</i>	(Lehnherr <i>et al.</i> , 1993)
II	MazF/MazE	Cromosoma de <i>E. coli</i>	(Engelberg-Kulka and Glaser, 1999)
II	RelB/RelE	p307 de <i>E. coli</i>	(Gerdes <i>et al.</i> , 2005)
II	VapB/VapC	<i>Salmonella enterica</i>	(Winther and Gerdes, 2012)
III	ToxI/ToxN	pECA1039 de <i>Erwinia carotovora</i>	(Blower <i>et al.</i> , 2012)
IV	CbeA/CbtA (YeeU/YeeV)	<i>E. coli</i>	(Masuda <i>et al.</i> , 2012)
V	GhoS/GhoT	<i>E. coli</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2012)

Las estrategias mencionadas anteriormente favorecen la herencia vertical de los plásmidos, aunque estos también aumentan su persistencia si tienen un sistema efectivo de transferencia horizontal mediada por conjugación (Cairns *et al.*, 2016). La mayoría de los plásmidos de bacterias fitopatógenas pueden transferirse gracias a que codifican genes del sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Llosa and de la Cruz, 2005; Backert and Meyer, 2006; Sundin, 2007; Juhas *et al.*, 2008; de la Cruz *et al.*, 2010). El T4SS está relacionado con toda la maquinaria implicada en la conjugación, es decir, con la síntesis de los mecanismos de transferencia horizontal de material genético (Ding *et al.*, 2003; Sundin, 2007). La conjugación es empleada por las bacterias para la transferencia de una amplia variedad de elementos genéticos incluyendo islas genómicas, plásmidos y elementos integrativos y conjugativos (ICEs, integrative and conjugative elements) (Juhas *et al.*, 2009). Los T4SS están subdivididos en dos grupos, IVA (genes *vir*) en el que se agrupan los sistemas relacionados con el sistema de translocación VirB/VirD4 del plásmido pTi de *Agrobacterium tumefaciens* y el tipo IVB (genes *tra*) representado por el sistema *tra/trb* del plásmido Colb-P9 de *Shigella* y el sistema Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (Ding *et al.*, 2003; Juhas *et al.*, 2008; Juhas *et al.*, 2009). *P. syringae* dispone de sistemas de transferencia IVA y IVB pudiendo estar presentes ambos, ninguno, uno de ellos, o T4SS incompletos (Zhao *et al.*, 2005). A menudo, los plásmidos nativos de *P. syringae* presentan T4SS parciales (Sundin, 2007) o incluso sólo contienen el *oriT* (origen de transferencia) ya que pueden funcionar *in trans*. Se ha demostrado que muchos plásmidos PFPs son conjugativos (Von Bodman and Shaw, 1987; Gibbon *et al.*, 1999; Vivian *et al.*, 2001). Además, hay evidencias de que el T4SS y el T3SS presentan funciones superpuestas (Llosa and O'callaghan, 2004).

### **Los elementos transponibles promueven la dinámica génica de los genomas**

Los elementos transponibles son elementos genéticos móviles muy diversos, cuya actividad tiene gran impacto en los genomas de sus huéspedes. Por ejemplo, en *P. syringae*, las secuencias de inserción (ISs), los transposones y otros elementos transponibles, están frecuentemente asociados a efectores y a genes implicados en virulencia (Kim *et al.*, 1998; Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2002; Bardaji *et al.*, 2011b), a menudo formando parte de elementos genéticos transferibles como los plásmidos, en los que es muy habitual encontrar una proporción a veces grande de ISs (Jackson *et al.*, 1999; Bardaji *et al.*, 2011b; Jackson *et al.*, 2011).



**Las secuencias de inserción** (ISs) son fragmentos de DNA de pequeño tamaño, generalmente menores de 2.5 kb, que consisten en una o dos pautas abiertas de lectura (ORFs) que codifican para una transposasa, la cual se encuentra casi siempre flanqueada por secuencias repetidas e invertidas (IR) de 10 a 40 nt de longitud y que se encargan de movilizar el ADN contenido entre las IR (Mahillon and Chandler, 1998). Generalmente, las ISs sólo codifican funciones de movilización del propio elemento y no confieren fenotipos observables. Sin embargo, las ISs podrían estar involucradas en la movilización de genes de virulencia en *P. syringae*, ya que se han encontrado frecuentemente flanqueando o adyacentes a estos genes o a islas de patogenicidad. Por ejemplo, IS51 está asociado a genes de biosíntesis de IAA (*iaaM*) en *Ps* pv. *nerii* e IS801 se ha encontrado junto a efectores del T3SS (*hopAB1*, *avrB2*) en *Ps* pv. *phaseolicola* y junto al efector *avrD* en *Ps* pv. *tomato*, así como, adyacente a genes de biosíntesis de IAA y CKs (*iaaL* y *ptz*) en el patovar *nerii* (Murillo *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001; Garcillán-Barcia and Cruz, 2002; Joardar *et al.*, 2005; Bardaji *et al.*, 2011b).

Las ISs están presentes en casi todos los genomas secuenciados del complejo *P. syringae* y generalmente aparecen en más de una copia por genoma (Vivian *et al.*, 2001; Buell *et al.*, 2003; Feil *et al.*, 2005a; Joardar *et al.*, 2005; Sundin, 2007; Bardaji *et al.*, 2011b). Se ha estimado que el porcentaje de ADN perteneciente a ISs en plásmidos de tamaño superior a 20 kb, se encuentra entre un 5-15 %, llegando en algunos casos hasta el 20 %. Sin embargo, en algunos casos se han observado desviaciones significativas de estos valores, como ocurre por ejemplo con los tres plásmidos nativos de la cepa *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (Bardaji *et al.*, 2011b). Así, menos del 4% de las secuencias del plásmido pPsv48B (45 kb) corresponde a MGEs; sin embargo, alrededor de un 30 % de pPsv48A (80 kb) y un 25 % de pPsv48C (42 kb) pertenecen a MGEs (Bardaji *et al.*, 2011b). En este caso, al igual que ocurre en *Ps* pv. *phaseolicola* 1448A, no se cumple la predicción de que el tamaño del genoma se relaciona directamente con la presencia de ISs (Touchon and Rocha, 2007).

Aunque la secuenciación de genomas ha revelado una gran cantidad de potenciales ISs en patovares de *P. syringae* (Vivian *et al.*, 2001; Buell *et al.*, 2003; Feil *et al.*, 2005a; Joardar *et al.*, 2005; Sundin, 2007; Bardaji *et al.*, 2011b) sólo unas pocas de ellas se han caracterizado funcionalmente (Buell *et al.*, 2003; Joardar *et al.*, 2005; Sundin, 2007; Bardaji *et al.*, 2011a). De entre ellos, IS801 es uno de los elementos móviles mejor caracterizados (Richter *et al.*, 1998) y de mayor relevancia por su asociación con genes de virulencia; sus características detalladas se exponen en un apartado independiente.



**Los transposones** son comparables en estructura a las ISs, pero entre sus secuencias repetidas portan genes adicionales, desde uno a docenas, que codifican para una panoplia de funciones, generalmente relacionadas con resistencia a antibióticos, virulencia y especificidad de huésped (Bennett, 2004). En *P. syringae* se han descrito varios tipos de transposones que facilitan la movilización de genes implicados en la definición del espectro de huésped. Por ejemplo, en el plásmido pFKN de *Ps* pv. maculicola M6 los genes que codifican el efector AvrPphE y la transposasa están localizados entre repeticiones invertidas, probablemente constituyendo un elemento transponible (Rohmer *et al.*, 2003). En otro caso se ha documentado que las secuencias que rodean al efector *avrRPM1* del plásmido pFKN son homólogas a las que flanquean hasta cinco genes de avirulencia en *P. syringae* pv. pisi (Arnold *et al.*, 2001), las cuales muestran características de transposones (Rohmer *et al.*, 2003). La secuenciación y anotación del plásmido pPsv48A de *Ps* pv. savastanoi NCPPB 3335 ha revelado la existencia de una copia de ISPsy30, que ha capturado entre sus repeticiones terminales un efector quimérico que consiste en una caja *hrp* y en los primeros 18 aa de *hopAY1*, gen fusionado al alelo de *hopAF1* (Bardaji *et al.*, 2011b). Por otra parte, también se han documentado casos de transposones que portan genes adaptativos que confieren resistencia a bactericidas utilizados para el control químico de enfermedades. Así, el transposón Tn5393, que pertenece a la familia Tn3, porta los genes de resistencia a estreptomicina *strAB* y normalmente se encuentra asociado a plásmidos de bacterias patógenas (Sundin *et al.*, 1995; Mantengoli and Rossolini, 2005). Además, se ha demostrado la transferencia del transposón Tn5393 *in vitro* entre plásmidos incompatibles (Sundin and Bender, 1996a).

Una clase adicional de **pequeñas secuencias móviles** son los **MITEs** (miniature inverted repeat transposable elements), que se cree que derivan de las ISs por deleciones internas y cuyo tamaño no supera los 300 pb. Los MITEs no tienen transposasa pero sí mantienen las repeticiones terminales invertidas, que probablemente son reconocidas por ISs relacionadas y que podrían permitir su movilización *in trans* (Siguier *et al.*, 2006; Delihias, 2008; Bardaji *et al.*, 2011a). En nuestro grupo de investigación se ha identificado un MITE funcionalmente activo en *Ps* pv. phaseolicola 1448A, designado MITEPsy1 (Bardaji *et al.*, 2011a). En el mismo estudio (Bardaji *et al.*, 2011a), se identificó otro MITE en la cepa 1448A, denominado MITEPsy2, que también se encuentra en el plásmido nativo pPsv48C de *Ps* pv. savastanoi NCPPB 3335 (Bardaji *et al.*, 2011a). Aunque este tipo de elementos son comunes en bacterias, y hay evidencias indirectas de su movilidad (Robertson *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008), esta fue la primera vez que se demostraba la movilización

espontánea de un MITE en su huésped natural. A pesar de su pequeño tamaño, los MITEs podrían tener una gran importancia en la evolución de los genomas bacterianos, y se ha demostrado su implicación en la generación de variabilidad génica y de reorganizaciones genómicas. Por ejemplo, la inserción del MITE *Psy1* en el gen efector *avrPphE* (sin. *hopX1*) en una cepa de *Ps pv. phaseolicola* condujo a la generación de un nuevo alelo que ya no indujo la respuesta de hipersensibilidad en las variedades de judía resistentes, causando la ampliación de su espectro de huésped (Stevens *et al.*, 1998). Igualmente, este tipo de pequeñas secuencias repetidas también se han encontrado modificando el espectro de huésped de *Ralstonia solanacearum*, permitiendo la generación de genotipos altamente virulentos del patógeno (Robertson *et al.*, 2004). Por otra parte, en esta Tesis demostramos que se producen recombinaciones entre dos copias directas de MITE *Psy2* en el plásmido nativo pPsv48C, y que conducen a reorganizaciones plasmídicas con alta frecuencia (ver Capítulo 3).

Tanto las ISs como los MITEs, son piezas clave en la dinámica génica de *P. syringae*. Son elementos muy activos ya que al estar presentes en casi todos los genomas representan zonas de recombinación (Jackson *et al.*, 2011). Además, son capaces de transponerse y movilizar ADN adyacente. Todo ello conlleva a la generación de reorganizaciones que incluyen, inserciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones, cointegraciones, inversiones y activación de genes (Sigquier *et al.*, 2014). Esto implica un enorme potencial de alterar el genoma y, por lo tanto, de facilitar la evolución bacteriana (Jackson *et al.*, 2011). También pueden mediar el intercambio de ADN entre los diferentes replicones, como cromosomas y plásmidos, y de esta forma sostener una actividad que contribuye a la propagación horizontal de la información genética (McEvoy *et al.*, 2007; Sundin and Murillo, 2009). Además, la distribución genómica y las inserciones diferenciales de las ISs constituyen una información clave para distinguir entre cepas muy relacionadas (González *et al.*, 1998; Oguiza *et al.*, 2004; Quesada *et al.*, 2008).

La distribución y número de ISs en los genomas de *P. syringae* es muy variado; por ejemplo, el genoma de la cepa NCPPB 3335 alberga ISs con gran similitud a la mayoría de transposasas encontradas en la cepa 1448A de *phaseolicola* (Joardar *et al.*, 2005) incluyendo, IS801, IS*Psy2*, IS*Psy3*, IS*Psy4*, IS*Psy16*, IS*Psy17*, IS*Psy19*, IS*Psy20* e IS*Psy24*; además de homólogos de IS*Pssy*, IS*Psy8* e IS*Psy10* que no se encuentran presentes en la cepa 1448A (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). Los plásmidos nativos de la cepa NCPPB 3335 contienen 11 tipos de ISs y tres MITE (MITE *Psy1*, MITE *Psy2* y MITE *Psy3*) (Bardaji *et al.*, 2011b). A pesar de la identificación de gran variedad de

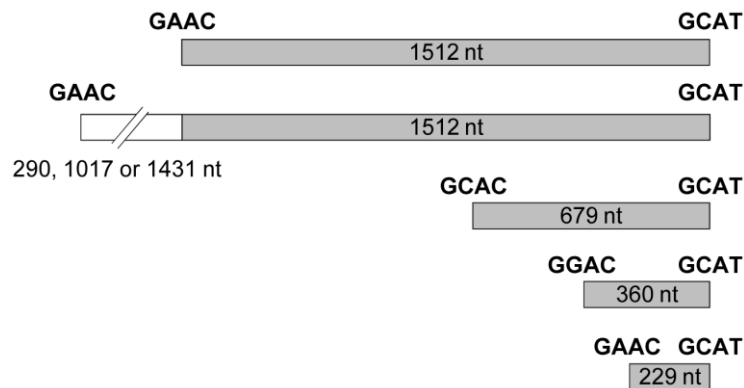
elementos móviles en cepas pertenecientes a *P. syringae*, sólo se ha podido demostrar la transposición de algunos de ellos. Por ejemplo, la cepa *Ps* pv. *phaseolicola* 1448A alberga por lo menos 19 tipos de elementos móviles, sin embargo, sólo se han identificado dos elementos móviles activos, IS801 y MITE*Psy*1. El hecho de no haber observado la transposición de los otros tipos de elementos móviles presentes en la cepa 1448A no significa que sean inactivos, sino que podrían estar movilizándose a frecuencias inferiores a la frecuencia de transposición de la cepa ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$ ) o que se pudieran fijar en el genoma (Bardaji *et al.*, 2011a). Otros casos en los que se ha demostrado la transposición de elementos móviles han sido IS51 e IS52 (Yamada *et al.*, 1986), IS*Psy*2 e IS*Psy*3 (Kamiunten *et al.*, 2002) y el transposón del efector *hopX1* (Landgraf *et al.*, 2006). Uno de los elementos transponibles más ampliamente estudiado y mejor caracterizado es IS801 (Romantschuk *et al.*, 1991; Richter *et al.*, 1998; Bardaji *et al.*, 2011a).

### **IS801**

La secuencia de inserción IS801 se identificó originalmente en el plásmido pMMC7105 de *Ps* pv. *phaseolicola* LR781, ya que el plásmido tiene la propiedad de integrarse y escindir del cromosoma mediante recombinación entre dos copias de este elemento (Szabo and Mills, 1984; Romantschuk *et al.*, 1991). Como ocurre con otros elementos móviles, IS801 puede tener gran impacto en la dinámica génica de la célula huésped ya que favorece la plasticidad de su genoma, generando copias y zonas activas de recombinación, originando mutaciones por transposición del elemento completo o parcial, o movilizándolo al ADN al que se asocia (Richter *et al.*, 1998; Bardaji *et al.*, 2011a).

IS801 pertenece a la familia de IS91, caracterizada por su forma de transponerse mediante un proceso de círculo rodante (Mendiola *et al.*, 1992; Mahillon and Chandler, 1998). La transposición de IS801 podría ocurrir con frecuencia en *P. syringae*, ya que se ha demostrado que en *Ps* pv. *phaseolicola* 1448A varía entre  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  (Bardaji *et al.*, 2011a). La transposición es unidireccional y se inicia cuando la transposasa reconoce el origen de transposición (denominado *ori801*), situado en el extremo 3' del elemento y de un tamaño estimado de 82 nt, y continúa hasta llegar al extremo 5' (GAAC) donde se encuentra la secuencia de terminación de la transposición o *ter801* (Garcillán-Barcia and Cruz, 2002). En ocasiones, este proceso es ineficaz ya que, aunque *ori801* es esencial para el inicio del proceso, en ocasiones la transposición no termina en la secuencia de *ter801* sino en secuencias que contienen un tetranucleótido con similitud al extremo 5' del elemento —incluyendo GGAC, CAAG, CGAC, y GCAC—, que es lo que se conoce como transposición terminal (one-ended transposition) (Mendiola *et al.*, 1994; Richter *et al.*, 1998; Bardaji *et al.*, 2011a). En *Ps* pv. *phaseolicola* 1448A se

ha demostrado la transposición *in vivo* de IS801, tanto del elemento completo (1512 nt; un 65% de las inserciones contenían el fragmento correspondiente a IS801), como de fragmentos derivados de él que oscilan entre 229 y 679 nt (25,7%) y con menor frecuencia (0,7%), la movilización de ADN adyacente a su extremo 5' por transposición terminal de IS801 (Fig. 4) (Bardaji *et al.*, 2011a).



**Figura 4. Estructura y secuencias terminales de IS801 e isoformas derivadas de transposición terminal.** Las cajas grises indican el elemento completo (1512 nt) y los fragmentos derivados de IS801, con su tamaño indicado en el interior de la caja; todos ellos comparten el extremo 3', correspondiente a *ori801*. La caja blanca rota indica tres fragmentos de ADN que fueron movilizados. Figura adaptada de Bardaji *et al.* (2011a).

A menudo, IS801 se encuentra como elemento truncado de diversos tamaños e incluso, la transposasa de IS801 (TnpA\_IS801) puede estar interrumpida con codones de stop prematuros; sin embargo, sigue siendo funcional ya que la transposasa de este elemento puede actuar *in trans*, aunque a frecuencias bajas (Richter *et al.*, 1998). El análisis de estas secuencias derivadas de IS801 presentes en plásmidos y cromosomas de *P. syringae* sugiere que la mayoría de ellos se originaron por recombinación, en vez de por transposición terminal (Bardaji *et al.*, 2011a). De hecho, la variación genética en poblaciones de *P. syringae* parece deberse más a la recombinación que a la mutación (Stavrínides *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2008).

La distribución de IS801 está limitada a la especie *P. syringae* y al igual que ocurre con el resto de ISs, frecuentemente se asocia a genes de virulencia, ya que se han encontrado copias de esta IS, próximas a efectores en los patovares phaseolicola y *syringae* y a genes de biosíntesis de fitohormonas en *savastanoi* (Tabla 3) (Kim *et al.*, 1998; Garcillán-Barcia and Cruz, 2002; Lindeberg *et al.*, 2008).

**Tabla 3.** Ejemplos de asociación de IS801 a determinantes de virulencia.

Gen asociado	Función	Referencia
<i>ptz</i>	Biosíntesis de citoquininas	(Powell and Morris, 1986)
<i>iaa</i> (operón)	Biosíntesis de IAA	(Soby <i>et al.</i> , 1994)
<i>avrB</i> , <i>avrPphC</i> , <i>avrRpm1</i> , <i>avrA</i> , <i>virPphA</i> y <i>psvA</i>	Proteínas de avirulencia y virulencia	(Napoli and Staskawicz, 1987; Tamaki <i>et al.</i> , 1988; Yucel <i>et al.</i> , 1994; Jackson <i>et al.</i> , 1999; Kamiunten, 1999; Rohmer <i>et al.</i> , 2003)

Tabla adaptada de Garcillán-Barcia and de la Cruz (2002).

Los genomas de *P. syringae* contienen diversas isoformas de IS801, correspondientes a fragmentos terminales o internos del elemento, así como a elementos con inserciones internas. La isoforma CRR1 (Fig. 5) es notable porque está muy conservada en diversos genomas; CRR1 (1752-1765 nt) deriva de IS801 y contiene una inserción de 240-253 nt así como una delección que abarca el promotor y el extremo 5' del gen de la transposasa, conduciendo previsiblemente a su inactivación (Fig. 5). CRR1 se identificó inicialmente en los plásmidos pPsv48A (4 copias) y pPsv48C (una copia) de *Ps pv. savastanoi* NCPPB 3335 (Bardaji *et al.*, 2011b), y muestra una alta conservación de organización y secuencia en muy diversos patovares de *P. syringae* (datos no mostrados).



**Figura 5. Estructura comparativa de IS801 y su isoforma CRR1.** En IS801 se indica la posición de *ori801* en su extremo derecho (3') y del *ter801* en su extremo izquierdo (5'). La figura representa una comparación Blast entre IS801 y CRR1, visualizada con ACT, en las que las áreas de homología (al menos 94% de identidad) entre ambos elementos se muestran unidas con sombreado rojo. La flecha indica la dirección en la que progresa la transposición de ambos elementos.

### Los plásmidos nativos de la cepa *Ps pv. savastanoi* NCPPB 3335 portan genes de virulencia

Las cepas de *P. syringae* frecuentemente contienen plásmidos nativos, tanto PFPs como no-PFPs, que codifican gran variedad de genes involucrados en virulencia,

patogenicidad y adaptación al medio (Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Sundin and Murillo, 2009). *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 contiene tres plásmidos nativos tipo PFP que han sido secuenciados completamente, pPsv48A (80 kb), pPsv48B (45 kb) y pPsv48C (42 kb). Los análisis filogenéticos del gen *repA* de estos plásmidos y de otros pertenecientes a patovares de la genomoespecie 2, sugieren su evolución a partir de un antecesor común (Bardaji *et al.*, 2011b); de hecho, las secuencias del gen *repA* de los plásmidos pPsv48B y pPsv48C muestran un 97.5 % de identidad, lo que sugiere que se han originado por duplicación. No se sabe aún qué mecanismos permiten la coexistencia estable de replicones tan relacionados, aunque los resultados previos sugieren que podría deberse a cambios de secuencia en el extremo C-terminal de la proteína iniciadora de replicación, ya que esta región es muy variable (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999). Algo similar ocurre con los replicones tipo ColE2, homólogos a los replicones PFP, en los que variaciones pequeñas en el origen de replicación, situado en el extremo 3' del gen *repA*, permiten la compatibilidad (Tajima *et al.*, 1988). También se ha postulado que la compatibilidad de plásmidos PFP pueda deberse a cambios en las repeticiones invertidas que preceden al gen *repA* (Gibbon *et al.*, 1999; Stavrinides and Guttman, 2004; Ma *et al.*, 2007). Sin embargo, no se han identificado aún los determinantes de incompatibilidad del replicón PFP ni, por tanto, las bases moleculares de la coexistencia estable de plásmidos PFP.

La secuenciación de estos plásmidos ha revelado la existencia de genes que podrían estar implicados en virulencia (Bardaji *et al.*, 2011b). Se han identificado dos genes potencialmente involucrados en biosíntesis de citoquininas, *ptz* (isopentenil transferasa) en pPsv48A e *idi* (isopentenil difosfato delta isomerasa) en pPsv48C. También se han encontrado posibles efectores del sistema secreción tipo III precedidos por cajas *hrp*, y se ha demostrado la translocación a la célula vegetal de los productos de *hopAF1*, capturado por el transposón ISPsy30 en pPsv48A, y de *hopAO1* (sin. *avrPphD2*), codificado en pPsv48B, que presentan homología con otros efectores previamente identificados en el complejo *P. syringae* (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). Además, en pPsv48A, se han identificado tres alelos de una CDS (PSPSV\_A0005, PSPSV\_A0035 y PSPSV\_A0046) conservada en proteobacterias asociadas a plantas, y que están precedidas de una caja *hrp*.

Como es frecuente en *P. syringae*, los plásmidos nativos de la cepa *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 portan diversos elementos transponibles y en diferente proporción. De los 11 tipos de ISs identificadas, las que se encuentran en mayor número de copia son CRR1 (isoforma de IS801; 4 copias en pPsv48A y una en pPsv48C) e IS51 (sin. ISPsy21; 4 copias en pPsv48A, una en pPsv48B y 2 en pPsv48C). El plásmido



pPsv48C contiene además dos copias idénticas de IS*Psy16* que recombinan entre ellas produciendo la inversión (flip-flop) del ADN comprendido entre ambas. También se han encontrado 3 MITEs con número variable de copia. MITE*Psy1* está presente en muchas cepas de *P. syringae* y se demostró que afectaba a la especificidad de huésped al insertarse en el efector *avrPphE* (Stevens *et al.*, 1998); además se demostró su transposición *in vivo* (Bardaji *et al.*, 2011a). El MITE*Psy2* probablemente deriva de IS*Psy30* (Bardaji *et al.*, 2011b) y MITE*Psy3* se parece al transposón IS*Thsp9* del género *Thiomonas*.

En contraposición a pPsv48A y a pPsv48C, el plásmido pPsv48B porta muy pocas secuencias de inserción; sin embargo, contiene 15 CDSs (*virB1-virB11, virD4, traE, mobC* y *mobB*) que podrían formar parte de un sistema de secreción tipo IVA y un origen de transferencia (*oriT*), por ello, es muy probable que sea un plásmido conjugativo. En pPsv48A también se ha encontrado un sistema de secreción tipo IVB (genes *tra*), pero sin origen de transferencia, con lo cual es posible que no sea conjugativo (Bardaji *et al.*, 2011b). Las inoculaciones en olivo adulto con mutantes de *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 defectivos en los genes *virB4* y *traY* mostraron una reducción significativa de la sintomatología, lo que sugiere que el sistema de secreción tipo IV podría estar implicado en la virulencia de esta bacteria (Matas *et al.*, 2012).

En *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 se ha demostrado el papel del plásmido pPsv48A en virulencia, ya que los síntomas producidos por la cepa curada de dicho plásmido fueron menos intensos que los producidos por la cepa silvestre (Bardaji *et al.*, 2011b). La atenuación en los síntomas podría deberse a que en el plásmido pPsv48A se encuentra el gen *ptz*, posiblemente implicado en la biosíntesis de citoquininas (Bardaji *et al.*, 2011b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores, que sugerían que las CKs son un factor de virulencia necesario para el desarrollo de tumores (Iacobellis *et al.*, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). También se obtuvo una cepa curada de los plásmidos pPsv48A y pPsv48B, sin embargo, no hubo diferencias entre los síntomas inducidos por esta cepa y los producidos por la cepa curada sólo de pPsv48A. Estos resultados sugieren que los genes de pPsv48B no contribuyen a la virulencia, o que su contribución queda enmascarada por la reducción de síntomas que conlleva la pérdida del plásmido A (Bardaji *et al.*, 2011b).





## Objetivos

Como se ha detallado en la introducción, los plásmidos nativos de *P. syringae* albergan genes de relevancia para la interacción con la planta huésped y para la supervivencia de la bacteria en condiciones adversas. La mayoría de estos plásmidos pertenecen a la familia PFP, caracterizados por poseer un replicón altamente conservado y por coexistir de manera estable en la misma célula con uno o más plásmidos PFP. A pesar de la notable importancia de los plásmidos PFP en el ciclo de vida y evolución de *P. syringae*, se conoce todavía muy poco sobre la biología y genética de estos plásmidos. En particular, se desconocen los mecanismos que permiten la coexistencia de plásmidos PFP o los que contribuyen a su considerable estabilidad. La identificación de estos mecanismos es importante para entender los procesos de adquisición, intercambio y mantenimiento de genes de virulencia durante la evolución de estos patógenos; asimismo, tiene importancia práctica al facilitar la eliminación de plásmidos de la población bacteriana con el fin de estudiar su contribución a la virulencia.

Por todo lo anterior, en esta Tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Identificación y caracterización funcional de un segundo origen de replicación presente en el plásmido nativo pPsv48C de *Ps pv. savastanoi* NCPPB 3335
2. Identificación de determinantes de mantenimiento presentes en los plásmidos de la cepa NCPPB 3335 y evaluación de su contribución al mantenimiento de dichos plásmidos.
3. Evaluación del papel del plásmido pPsv48C en la patogenicidad y virulencia de la cepa NCPPB 3335 en su interacción con su planta huésped, olivo.



## CAPÍTULO 2

# Plasmid replicons from *Pseudomonas* are natural chimeras of functional, exchangeable modules

---

### Abstract

Plasmids are a main factor for the evolution of bacteria through horizontal gene exchange, including the dissemination of pathogenicity genes, resistance to antibiotics and degradation of pollutants. Their capacity to duplicate is dependent on their replication determinants (replicon), which also define their bacterial host range and the inability to coexist with related replicons. We characterize a second replicon from the virulence plasmid pPsv48C, from *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi, which appears to be a natural chimera between the gene encoding a newly described replication protein and a putative replication control region present in the widespread family of PFP virulence plasmids. We present extensive evidence of this type of chimerism in structurally similar replicons from species of *Pseudomonas*, including environmental bacteria as well as plant, animal and human pathogens. We establish that these replicons consist of two functional modules corresponding to putative control (REx-C module) and replication (REx-R module) regions. These modules are functionally separable, do not show specificity for each other, and are dynamically exchanged among replicons of four distinct plasmid families. Only the REx-C module displays strong incompatibility, which is overcome by a few nucleotide changes clustered in a stem-and-loop structure of a putative antisense RNA. Additionally, a REx-C module from pPsv48C conferred replication ability to a non-replicative chromosomal DNA region containing features associated to replicons. Thus, the organization of plasmid replicons as independent and exchangeable functional modules is likely facilitating rapid replicon evolution, fostering their diversification and survival, besides allowing the potential co-option of appropriate genes into novel replicons and the artificial construction of new replicon specificities.

---

This chapter has been published as: 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*, 8.

## Introduction

Plasmids are extrachromosomal elements that colonize a vast majority of bacteria and other organisms, often carrying genes that confer an adaptive advantage to the host (del Solar *et al.*, 1998b; Jackson *et al.*, 2011). Each cell can have from none to several plasmids of diverse sizes and copy numbers. Plasmids can readily acquire large amounts of foreign DNA from different sources and are transferred between distantly related organisms, including prokaryotes and eukaryotes, which makes them a major contributor to the accessory gene pool and the most important agents in horizontal gene transfer (Halary *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2011). Indeed, plasmids are responsible for the worldwide distribution of genes for resistance to antibiotics and other antimicrobials, rendering current strategies ineffective for the control of human, animal and plant diseases (Sundin, 2007; Jackson *et al.*, 2011; Aviv *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2016).

The basic replicon is the fundamental element for plasmid survival, ensuring timely duplication in coordination with cell division (Nordström, 1993; Summers, 1996; del Solar *et al.*, 1998b). Broadly, basic replicons consist of i) a short *cis*-acting DNA sequence, the origin of replication, ii) genes and structures involved in the control of replication and, for most plasmids, iii) a gene coding a replication initiator (Rep) protein that recognizes the origin and promotes initiation of DNA replication. Plasmid replication is controlled by either directly repeated sequences (iterons) or by antisense RNAs, which can act alone or in coordination with a protein repressing transcription of the *rep* gene, and is tightly regulated so as to maintain the number of plasmid molecules in the cell within acceptable limits (Summers, 1996; del Solar and Espinosa, 2000). An immediate consequence of this is that plasmids sharing elements for replication or replication control cannot coexist in the same cell and are hence incompatible (Novick, 1987).

Replicons are highly diverse and can be grouped based on their general mechanism of replication, the function of their Rep proteins, their structure and genetic organization or their homology (del Solar *et al.*, 1998b; Lilly and Camps, 2015b). Circular plasmids replicate by one of three general modes: rolling-circle, strand-displacement and theta-type mechanisms. According to their mode of replication initiation, the theta-type replicons have been grouped into four classes (A, B, C and D) (Bruand *et al.*, 1993b). Class A theta replicons (e.g. R1, RK2, R6K, pSC101, pPS10, F and P) encode a Rep protein that binds to the origin and mediates melting of the duplex DNA. Class B (ColE1-like) replicons lack a *rep* gene, and melting of duplex DNA as well as synthesis of a pre-primer RNA for replication are achieved by bacterial RNA polymerase-mediated

transcription. Class C (ColE2- and ColE3-like) replicons contain the smallest origins reported so far and encode a Rep primase protein that also mediates unwinding of the DNA (Itou *et al.*, 2015). Finally, functioning of class D replicons (plasmids pAM $\beta$ 1, pIP501 and pSM19035 from Gram-positive bacteria) requires transcription across the origin and participation of a Rep protein in melting of the DNA and primer processing.

The gamma proteobacterial genus *Pseudomonas* comprises very diverse species, present in all kinds of environments, including significant human, animal and plant pathogens as well as species of outstanding biotechnological interest (Ramos, 2004). *P. syringae* is one of the most relevant plant pathogenic bacteria in the world (Mansfield *et al.*, 2012a), and many strains carry one or more highly stable plasmids, ranging from a couple of kilobases to close to 1 Mb (Murillo and Keen, 1994; Sundin, 2007; Romanchuk *et al.*, 2014). Most plasmids from *P. syringae*, and also various from many other *Pseudomonas* species, belong to the PFP (*p*PT23A-family plasmid) group (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999; Sesma *et al.*, 2000; Sundin, 2007). PFPs appear to originate from a common ancestor because they share homologous RepA-PFP replicons, which are related to the ColE2 class C theta replicons (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999; Sesma *et al.*, 2000; Sundin, 2007). ColE2 replicons contain a *rep* gene and an upstream region coding for a small antisense RNA, which is complementary to the 5'-nontranslated region of the *rep* mRNA and negatively controls its expression posttranscriptionally (Yasueda *et al.*, 1994). Similarly, the RepA-PFP replicons consist of the *repA* replication initiator gene, which includes the putative vegetative origin of replication (Yagura *et al.*, 2006), preceded by a short 5' sequence, containing diverse stem-and-loop (SaL) structures, which is probably involved in control of replication (Murillo and Keen, 1994; del Solar *et al.*, 1998b; Gibbon *et al.*, 1999; Brantl, 2014a). PFP plasmids have had tremendous evolutionary success, not only for their ubiquity across pseudomonads, but also because most *P. syringae* strains contain two to six coexisting PFP plasmids (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998). This could be explained in part because they generally carry genes essential for the interaction with the plant host or for survival, fostering their frequent exchange among the bacterial population (Sesma *et al.*, 2000; Vivian *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2007; Sundin, 2007; Sundin and Murillo, 2009). Additionally, their competitiveness among the bacterial plasmid pool might be enhanced by a replication machinery particularly adapted to their bacterial host. Notwithstanding, the coexistence of PFP plasmids in the same cell is difficult to explain because of their potential incompatibility (Novick, 1987; Sesma *et al.*, 1998). In fact, PFP plasmids are generally incompatible with their cloned replicons (Murillo and Keen, 1994; Murillo *et al.*, 1994; Sesma *et al.*, 1998) although subcloning

did not allow for the identification of the sequences responsible for this incompatibility within the replicon (Gibbon *et al.*, 1999).

*P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 contains three virulence PFP plasmids, pPsv48A (78 kb), pPsv48B (45 kb) and pPsv48C (42 kb), of which the smallest two appear to have originated by plasmid duplication and reorganization (Bardaji *et al.*, 2011b). Plasmid pPsv48C is essential for elicitation of disease symptoms in the plant host olive (M. Añorga, unpublished results), and is extremely stable (Bardaji *et al.*, 2011b). In this work, we identified a second replicon on pPsv48C, designated here as RepJ replicon, containing a putative replication control region homologous to that of the pPsv48C RepA-PFP replicon (Bardaji *et al.*, 2011b). We also show that these, and structurally similar replicons, consist of two functional modules corresponding to the putative control region (REx-C module) and the replication region (REx-R module). These modules are functionally separable, do not show specificity for each other, and are dynamically exchanged among replicons of four distinct families. Additionally, a REx-C module from pPsv48C conferred replication ability to a non-replicative *repJ* chromosomal homolog. Thus, the organization of plasmid replicons as independent and exchangeable functional modules is likely fostering their diversification and survival, besides allowing the potential co-option of appropriate genes into novel replicons and the artificial construction of new replicon specificities.

## Results

### Definition of a second replicon in plasmid pPsv48C

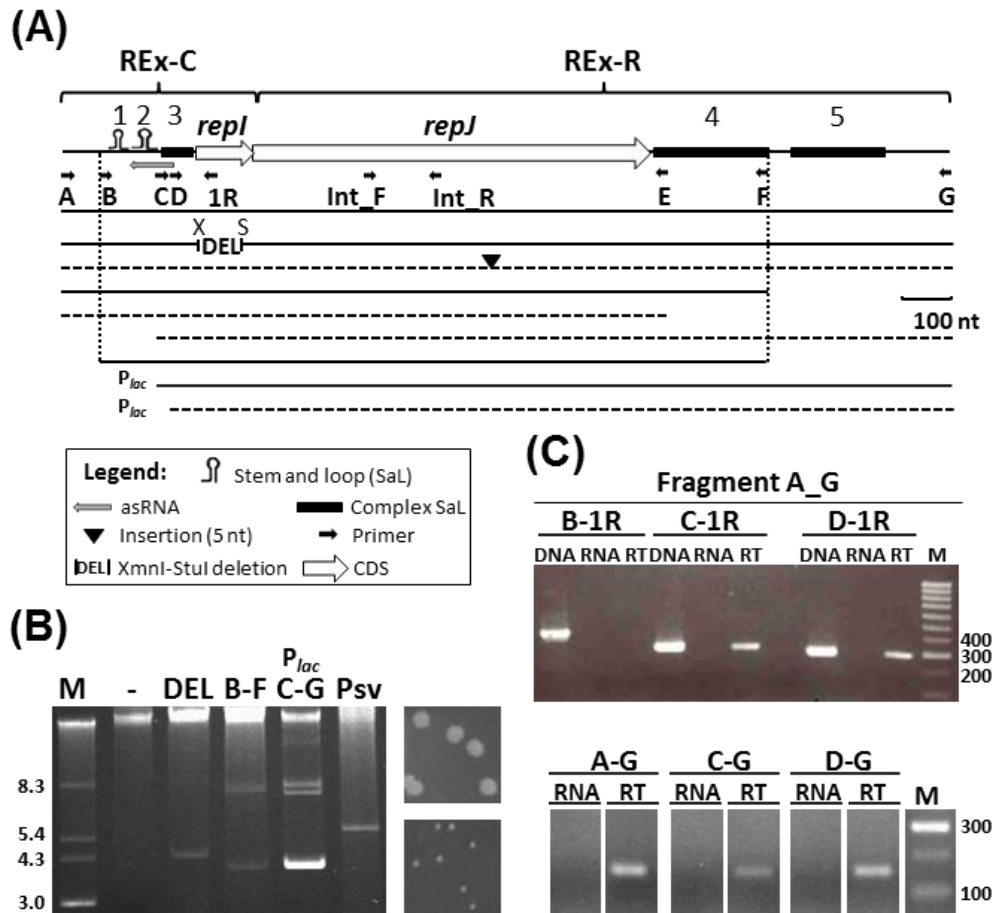
In an independent study (see Chapter 3), we observed the spontaneous generation of autonomously replicating deletion derivatives of pPsv48C lacking the RepA-PFP replicon (Fig. 1B). The smallest derivative contains five putative coding sequences (CDSs) whose annotation is not related to plasmid replication and a 661 nt fragment that appears in two nearly identical copies in pPsv48C (Fig. S1). The second copy of this fragment precedes gene *repA*, matching the typical organization of RepA-PFP replicons, and was previously shown to be essential for replication of PFP plasmids (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999; Sundin *et al.*, 2004).

By cloning diverse PCR fragments into the *E. coli* vectors pK184 or pKMAG (Fig. S2), which do not replicate in *Pseudomonas*, we determined that a 1,375 nt fragment (coordinates 29,386-30,760 in the pPsv48C sequence, accession no. FR820587; fragment B-F, Fig. 1A and S1), comprising around half of the 661 nt repeated fragment, contained all the essential elements for autonomous replication in the plasmidless strains

*P. syringae* pv. *syringae* B728a (Fig. 1B) and *P. syringae* pv. *savastanoi* UPN912. This fragment did not contain any obvious direct repetitions reminiscent of iterons, but was rich in palindromic structures and could adopt a complex folding structure. We could distinguish two well-defined structural regions in this minimal replicating fragment; based on their conservation and functionality (see below), we have defined these regions as plasmid replicon exchangeable (REx) modules: the Rex-C module contains the putative replication control system, whereas the Rex-R module comprises the replication system.

**(i) REx-C module.** This is a 318 nt fragment (coordinates 29,386-29,703 in FR820587) that shows high identity to a fragment (coordinates 41,791-5) preceding the *repA* gene from pPsv48C and including its first two codons (Fig. 1 and S1). The fragment contributes the putative start codon, the promoter(s) and the RBS for the expression of the replication initiator gene *repJ* (see below). It also contains three SaL structures, the third of which is complex, potentially folding in different ways, and gene *repI*. By analogy with replicons lacking iterons (del Solar and Espinosa, 2000; Brantl, 2014a), such as ColE2, this fragment also probably codes for a small antisense RNA, with a putative promoter within SaL 3 and for which SaL 1 could function as a transcription terminator (Fig. S1). Replication assays with clones spanning partial fragments of the minimal replicon showed that deletion of SaL 1 and 2 abolished autonomous replication, although they were dispensable in clones maintaining the complex SaL 3 and the strong *P**lac* promoter of the vector in the same transcriptional direction than *repJ* (fragment CG in Fig. 1A). Nevertheless, bacteria transformed with construct CG required double the time than other replicative fragments to produce visible colonies (Fig. 1B). Additionally, clones lacking the 5' stem of SaL 3 did not sustain autonomous replication (fragment DG, Fig. 1A and S1), even when *repJ* was cloned in the transcriptional direction of the *P**lac* promoter. These results likely suggest that expression of *repJ* from the *P**lac* in this clone causes a lethal runaway replication phenotype (Nordström and Wagner, 1994) or that SaL 3 is also essential for replication.

Gene *repI* (PSPSV\_C0037) is short (123 nt) and appears to be translationally coupled to the replication initiator gene *repJ*, which are characteristics of leader peptide genes needed for the control of replication of certain replicons (del Solar *et al.*, 1998b; Brantl, 2014a). An XmnI-StuI in-frame deletion of 87 nt, spanning most of *repI* (Fig. 1A and S1) did not have any apparent effect in the replication ability of the RepJ replicon, indicating that the product of *repI* is not essential for replication and that spacing between the SaL structures and the start of gene *repJ* is flexible.



**Figure 1. Functional characterization of the RepJ replicon.** (A) The minimal replicon consists of two modules, REx-C and REx-R, whose extent is loosely defined here; stem-and-loop structures 1 to 5 are indicated by symbols (see legend) topped with the structure number; letters under small arrows indicate the primers used for amplification of fragments and for RT-PCR, and a grey arrow, the putative antisense RNA. Lines under the map indicate the relative size of fragments cloned after a transcriptional terminator in pKMAG, or downstream of the  $P_{lac}$  promoter in pK184. Continuous lines indicate constructs able to replicate autonomously in *P. syringae* pv. *syringae* B728a, and dashed lines indicate non-replicative fragments. X, XmnI; S, StuI. (B) Plasmid profiles of B728a transformants harboring constructs from panel A (indicated by letters) able to replicate and that define the minimal replicon; multiple bands correspond to different topological forms and/or multimers with the lowest bands corresponding to monomers and the top intense band to chromosomal DNA and linear plasmids. Lane (-) is the wild type strain B728a and Psv is a derivative of NCPPB 3335 containing a 5.6 kb spontaneous deletion derivative of pPsv48C spanning the RepJ replicon. To the right, 48 h colonies of transformants containing constructs A-G (top) or C-G (bottom). (C) *repJ* is transcribed from at least two promoters. Upper gel: for RT-PCR, cDNA was synthesized from UPN912 containing construct A-G (in pKMAG) using the strand-specific primer Int\_R, internal to *repJ*. Subsequent PCRs were done with primer pairs indicated above the gel and shown on panel (A). Lower gel: for RT-PCR, cDNA molecules were synthesized from UPN912 containing constructs A-G, C-G and D-G (the last two cloned in pKMAG-C) using the strand-specific primer Int\_R. Further PCR amplification of cDNA was done using primer pair Int\_F-Int\_R, internal to *repJ* (see panel A). Amplifications were done with only DNA (DNA), only RNA (RNA) or cDNA (RT); M, molecular weight marker in kb (panel B) or nt (panel C).

**(ii) REx-R module.** This module contains the replication initiator gene, *repJ* (PSPSV\_C0038, 819 nt) and essential downstream sequences. The long, near-perfect ribosome binding site (5'-AAGGcGGTGA-3') of *repJ* and its two first codons probably belong to the REx-C module, because they are part of a sequence highly conserved in



the pPsv48C RepA-PFP replicon (Fig. S1). Gene *repJ* is annotated as a putative transcriptional regulator and did not show significant homology to any domain in an InterPro search. However, the structure of 55 residues (residues 90-145) from RepJ could be modelled by Phyre2 with 81.6 % confidence, being similar to the N-terminal domain of a conserved replication initiator protein (Schumacher *et al.*, 2014). Additionally, a construct containing a mutation causing a premature stop in *repJ* did not replicate in the plasmidless strains B728a and UPN912 (Fig. 1). These results suggest that *repJ* codes for a replication initiator protein essential for autonomous replication.

After the *repJ* stop codon there is a ca. 0.5 kb fragment containing two blocks of repeated sequences that can form complex SaL structures, designated SaL 4 and 5, although only SaL 4 appears to be essential for autonomous replication (Fig. 1A). Nevertheless, a blastn search with this fragment identifies sequences similar to SaL 5 situated 3' of, among others, *rep* genes that are not homologous to *repJ*, such as those from plasmids pRA2 (from *P. alcaligenes* RA2), pP27494\_2 (from *P. antarctica* PAMC 27494), pMBUI6 (from an uncultured bacterium), and pAOVO01 (from *Acidovorax* sp. JS42), and gene *krfA* from plasmid pTer331 (from *Colimonas fungivorans* Ter331).

### The REx-C module contains at least two active promoters

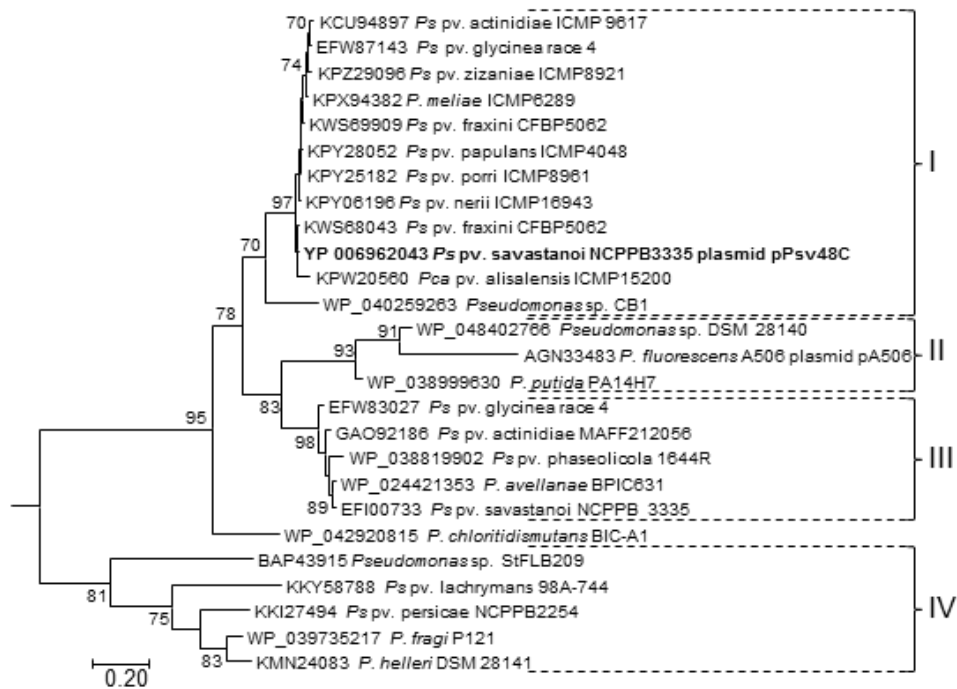
The absolute requirement of SaL 1 and 2 for replication can be overcome when *repJ* is transcribed from the strong *P<sub>lac</sub>* promoter, suggesting a plausible role of these structures in directing *repJ* transcription. We thus examined transcription of this gene by RT-PCR in clones lacking SaL 1, 2 and 3. Using clone AG in pKMAG (Fig. 1C, upper gel), we observed a long *repJ* transcript that extended at least to the annealing site for primer C, but not to that for primer B. This indicates transcription from a promoter situated between the annealing sites for primers A and C (Fig. S1), overlapping the putative antisense RNA, and possibly involved in transcription of *repI* and *repJ*. Amplification from smaller clones showed that *repJ* was transcribed even in the absence of SaL 1, 2 and 3 (fragments CG and DG, Fig. 1C lower gel). Since the vectors used contain a T4 transcriptional terminator upstream of the cloned fragments, this shows that there is an additional active promoter immediately upstream of *repJ*. These results indicate that the REx-C module contains at least two functional promoters for the transcription of gene *repJ* and that the failure of fragments CG and DG to replicate is not due to a lack of transcription of *repJ*, suggesting an additional role for SaL 1 and 2.

The structure of the RepJ replicon is only partially conserved in *Pseudomonas*. Blast comparisons revealed that a region of up to 2,785 nt containing the minimal RepJ replicon (coordinates 28,783-31,067 in FR820587) is syntenic, with very high identity, in

diverse genomoespecies of the *P. syringae* group as well as, with less identity, in a few other pseudomonads (not shown). Most of the homologs are from draft genomes and it is not possible to clearly determine if they localize to the chromosome or to plasmid sequences. Sequence variation among the homologs from *P. syringae* was not distributed randomly (Fig. S3): whereas the stems from SaL 1, 2 and 3 were identical in all sequences, there was a high sequence variation in the loop of SaL 2, in the 3' end of gene *repJ* and in SaL 4 and 5, downstream of this gene. As it occurs with the *repA* gene (Gibbon *et al.*, 1999), the nucleotide variation in *repJ* (Fig. S3) leads to a higher degree of variation in the C-terminal end of the deduced product; the phylogeny of a selection of these products is shown as clade I in Fig. 2.

Using blastp, we found RepJ homologs only within members of Pseudomonadales, mainly in species of *Pseudomonas*, and in a few *Desulfovibrio* spp. strains. An ML tree with selected sequences (Fig. 2) grouped homologs in four well-defined clades; from this tree we can also infer that the RepJ replicon has recently moved horizontally among pathovars and species of the *P. syringae* complex and that certain strains contained two *repJ* homologs (e.g., *P.s. pv. fraxini* CFBP5062 in clade I). The minimal RepJ replicon is moderately conserved and syntenic among homologs from clades I and II (Fig. S4). Of note, the REx-C modules from the RepJ replicons from clade I were more similar among themselves than to the modules from RepA-PFP replicons, indicating that these RepJ replicons are long-time inhabitants of pseudomonads. Conversely, the REx-C module is not conserved among members in clades III and IV whereas the region downstream of *repJ* shows a degree of conservation (Fig. S4); additionally these homologs show a genetic organization that is conserved among clade members, but different than that from members of clades I and II.

A 2,808 nt fragment (positions 35,079-37,886, accession no. KB644113) containing the *repJ* homolog from the chromosome of strain NCPPB 3335 (PSA3335\_1080, clade III; see Fig. S4) cloned in pKMAG did not generate any transformant after electroporation into *P. syringae* pv. *syringae* B728a or *P. syringae* pv. *savastanoi* UPN912, whereas in the same experiments we obtained hundreds of clones using the minimal RepJ replicon from pPsv48C. These results suggest that the chromosomal homolog from strain NCPPB 3335 is not able to sustain autonomous replication.



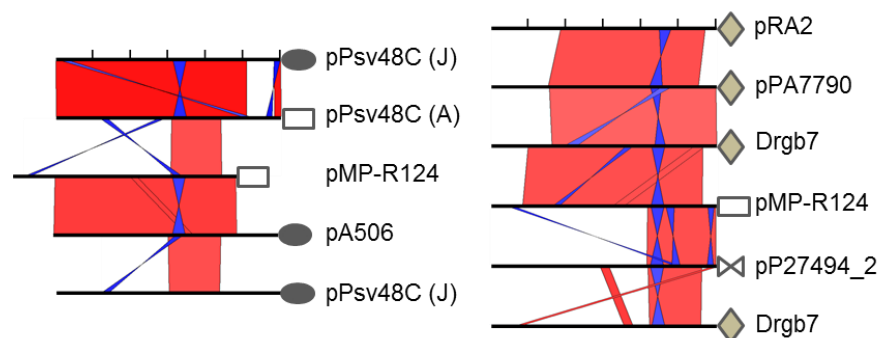
**Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of RepJ.** Protein sequences from species of *Pseudomonas* are indicated by their accession no. followed by strain designation; the first 39 positions of the alignment were discarded to eliminate biases due to differential annotation of the start sites. The tree was rooted with sequence WP\_052264087.1 from *Azotobacter chroococcum* plasmid pAcX50f and bootstrap percentages of 500 replicates higher than 70 % are shown close to each node. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Brackets followed by roman numerals indicate clades discussed in the main text. Pca, *P. cannabina*; Pco, *P. coronafaciens*; Ps, *P. syringae*.

## The REx-C module associates to REx-R modules of diverse families and is exchanged among them

Blastn comparisons showed that the REx-C module is present, with varying degrees of conservation, preceding the *rep* genes from at least four non-homologous replicon families from *Pseudomonas* (Fig. 3; Table S1), whereas nucleotide identity is rapidly lost shortly after the CDS start codon. These families include the RepA-PFP family from *P. syringae* and other bacteria (exemplified by *repA* from pPsv48C) (Bardaji *et al.*, 2011b), the RepJ family (among others, *repJ* from pPsv48C and pA506) (Bardaji *et al.*, 2011b; Stockwell *et al.*, 2013), and what we designated the RepA-RA2 family (named after pRA2) (Kato and Mizobuchi, 1994) and the RepA-Pa family (named here after the *P. antarctica* PAMC 27494 plasmid pP27494\_2). The highest level of sequence conservation of the REx-C module among representatives of the four families is in a 175-192 nt fragment that spans SaL structures 1 to 3 (Fig. S5). The stem sequences from SaL 1 (the putative transcriptional terminator for the antisense RNA), as well as the stretch of adenines in either side of them (Gibbon *et al.*, 1999), are almost perfectly conserved and changes in one arm of the stems are usually compensated with

complementary changes in the other arm (Fig. S5) (Gibbon *et al.*, 1999). The other structures are also well-conserved among the four replicon families; however, the number and position of palindromes, which could form SaL structures, are variable among replicons (Fig. 3; Fig. S5). Therefore, the stark conservation of the REx-C module suggests that it contains features universally essential for plasmid replication in species of *Pseudomonas*. Remarkably, we did not find REx-C sequences conserved in the control region of ColE2 replicons, which contain a replication initiator protein homologous to that from RepA-PFP replicons, or in any other plasmid outside of the genus *Pseudomonas*, indicating a diversity of REx-C modules among homologous theta replicons.

As described above, the REx-C modules accompanying genes *repA* and *repJ* from pPsv48C are nearly identical (Fig. S1), although there is a gradient of conservation of this module along homologs of their corresponding gene families (Fig. 3, S3, and S4) (Gibbon *et al.*, 1999; Sesma *et al.*, 2000; Stavrinides and Guttman, 2004). Additionally, the REx-C module preceding *repJ* from pA506 shows a very high degree of identity to that preceding *repA* from pMP-R124 (a PFP plasmid), whereas they are less similar to REx-C modules from replicons of their same family (Fig. 3). These results show that there is frequent horizontal exchange of REx-C modules among RepA-PFP and RepJ replicons.



**Figure 3. The REx-C module is conserved among four non-homologous replicon families and subjected to recombination among them.** Graphical view of NCBI blastn comparisons of the 600 nt region preceding the start codon of replication initiator protein genes (black bars, ticks every 100 nt), displayed with the ACT software; default algorithm parameters were used, except for a word size of 7. Red and blue bars indicate collinear and inverted regions of identity, respectively, with color intensity proportional to identity; only matches larger than 15 nt are shown. Symbols are followed by their corresponding plasmid name and are identical for *rep* genes of the same homology family. Sequence accession no. are pA506, NC\_021361; plasmid Drgb7, KT351738; pMP-R124, NZ\_CM001562; pP27494\_2, CP015602; pPA7790, CP015000; pPsv48C, FR820587; pRA2, U88088. A and J refer to *repA* and *repJ*, respectively, from pPsv48C.

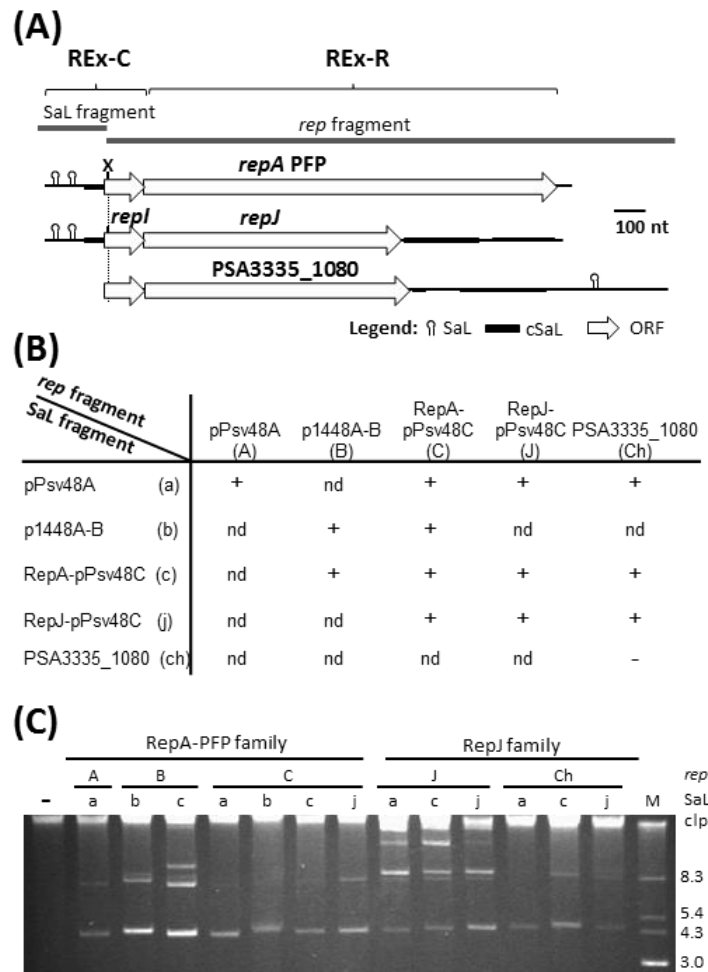
The results of multiple blast comparisons indicate that this exchange of REx-C modules also occurs with other replicon families. To illustrate this, we did a blast comparison against the non-redundant nucleotide collection (December 2016) of the 600 nt fragment immediately preceding the start codon for gene *repA* from the PFP plasmid pMP-R124, which comprises the REx-C module. The *rep* genes found immediately downstream of the first eight homologous sequences retrieved belong to the RepA-PFP, RepJ and RepA-RA2 families (Table S2). As before, and as an example, the REx-C module from pMP-R124 (RepA-PFP) shows a higher identity to pA506 (RepJ) than to the REx-C module from pPT14-32 (RepA-PFP) (Fig. 3; Table S2). Incidentally, pMP-R124 and plasmids from the RepA-RA2 and RepA-Pa families also have a shorter REx-C module lacking the putative leader peptide gene sequence (Fig. 3 and S5). Together, these results indicate that the REx-C modules from these four families evolved vertically within the family, but were also subjected to horizontal exchange between members of other replicon families. Likewise, they indicate that plasmids from these four families have similar mechanisms of initiation of replication and its control.

### **The REx-C module is functionally exchangeable among different replicons**

Our comparative analyses of extant sequences (Fig. 3) suggest that REx-C modules are freely exchanged among different replicons. However, previous works postulated that compatibility of coexisting RepA-PFP replicons was due to specificity between the C-terminal part of RepA and the loop sequence of SaL 2 (Fig. S3 and S6), which are highly variable and could coevolve for complementarity (Murillo and Keen, 1994; Gibbon *et al.*, 1999; Stavrinides and Guttman, 2004; Ma *et al.*, 2007). Additionally, the same pattern of variation is seen in a comparison of RepJ replicons (Fig. S3). We therefore tested this putative specificity by swapping the respective SaL structures from the REx-C module (SaL fragment in Fig. 4) and the *rep* fragments (partial *repI* plus REx-R, see Fig. 4) from plasmids p1448A-B (RepA-PFP) and pPsv48C (RepA-PFP and RepJ) (Fig. 4 and S6). These two RepA-PFP initiator proteins are 88 % identical (92 % similar; Table S1 and Fig. S6), while they are not homologous to RepJ (Table S1). Likewise, the three replicons show a different loop in SaL 2 and 1-3 nt changes within SaL 3 (Fig. S6). In spite of the differences in sequence, all the analyzed chimeras were able to sustain autonomous replication in the plasmidless strain *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Fig. 4), indicating a lack of specificity between the SaL structures from the REx-C module and the rest of the replicon.

To test whether or not sequence variations in SaL 1 (Fig. S1 and S6) would be specific for each Rep protein, we evaluated chimeric clones containing the SaL fragment

from plasmid pPsv48A and the *rep* fragments of the RepA-PFP or RepJ replicons from pPsv48C. These two RepA-PFP proteins, from pPsv48A and pPsv48C, are 97 % identical (Table S1 and Fig. S6), but the pPsv48A REx-C module (and consequently the SaL fragment tested) is comparatively shorter and with several changes in SaL 1 and 2. In spite of the differences, both chimeras replicated autonomously in strain B728a (Fig. 4), indicating that sequence variations in the loop sequence from SaL 1, and in the sequence upstream of this structure, do not significantly impact replication ability.



**Figure 4. The REx-C modules are functionally exchangeable within and among REx-R families.** (A) Schema of the DNA fragments exchanged for the construction of chimeras, which were cloned in vector pKMAG immediately after the transcriptional terminator. X, XmnI restriction site. (B) Autonomous replication in *P. syringae* pv. *syringae* B728a of wild type and chimeric DNA regions: +, autonomous replication; -, no replication; nd, not determined. (C) Undigested plasmid profile gels of B728a harboring the different wild type and chimeric clones, with numbers indicating the combination of SaL and *rep* fragments as in panel (B); discrete plasmid bands evidence autonomous replication, with multiple bands being different topological forms and/or multimers. Lane (-) is the wild type strain B728a, plasmidless; Clp, chromosome and linearized plasmids.

Finally, none of the four SaL fragments cloned in pKMAG generated any transformants when transferred to strains B728a or 1448A (the latter containing two



plasmids that could supply the RepA initiator *in trans*), suggesting that the REx-C module cannot sustain replication by itself.

### **The REx-C module confers replication ability to a non-replicative *repJ* homolog**

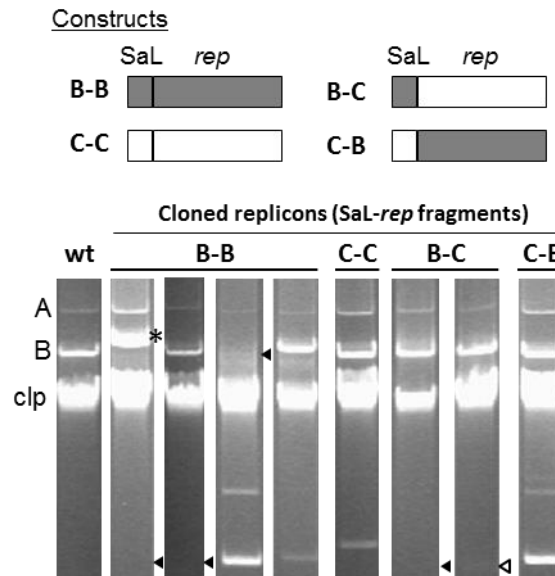
The REx-C module showed no apparent specificity with the associated Rep protein and is readily exchanged among replicons (Fig. 3 and 4), serving as a portable putative replication control region. Therefore, it is feasible that REx-C modules could move within bacterial genomes, co-opt genes with the appropriate characteristics and thereby directly create new autonomous replicons. To broadly test this, we examined the effect of the SaL structures from the RepA-PFP and RepJ replicons from pPsv48C on the replication ability of gene PSA3335\_1080. This gene is located in the chromosome of *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335 and its deduced product shows 72.7 % identity (81.2 % similarity) with that from *repJ* (Fig. 2 and S6; Table S1), but does not replicate autonomously (see above).

We therefore amplified and cloned a 1,772 nt fragment containing gene PSA3335\_1080 plus the upstream 114 nt, to preserve the RBS and a similar spacing to the SaL structures as with *repJ*, and 815 nt downstream, spanning sequences homologous to SaL 5 (Fig. 4). This fragment was ligated in the proper orientation to a partial fragment of the REx-C module containing the SaL structures preceding either *repA* or *repJ* from pPsv48C (279 nt), or preceding *repA* from pPsv48A (203 nt). The three constructions replicated in *P. syringae* pv. *syringae* B728a with very high efficiency (Fig. 4). Disruption of the PSA3335\_1080 reading frame by filling-in an internal restriction site abolished the replication ability of the clone containing the SaL fragment from the RepA-PFP replicon of pPsv48C. These results indicate that acquisition of a REx-C module can immediately confer autonomous replication ability to sequences containing PSA3335\_1080, and that replication is dependent on the activity of this gene.

### **Replicon incompatibility associates to the REx-C module**

Their frequent exchange (Fig. 3), and our experiments with chimeras (Fig. 4), indicate that the REx-C modules have a low, or no specificity for their cognate REx-R module and that they probably confer a strong selective advantage. Among other possibilities, we speculated that the exchange of these modules could be a way to reduce or evade incompatibility, especially for coexisting plasmids carrying related replicons such as the PFP group. The ColE2 replicon, related to the RepA-PFP replicons (Gibbon *et al.*, 1999), contains two incompatibility determinants, corresponding to the control region and to the

origin of replication (Tajima *et al.*, 1988; Hiraga *et al.*, 1994). Importantly, the RepA-PFP replicons contain sequences highly similar to the origin of replication of ColE2 replicons (Fig. S7) (Yagura *et al.*, 2006), including the primer RNA sequence (AGA), and located either within the RepA coding sequences or, for pMP-R124, situated some 300 nt after the *rep* gene stop codon.



**Figure 5. The REx-C module, but not the REx-R module, confers plasmid incompatibility.** The cartoon represents the native replicons and chimeras of the SaL fragment from the REx-C module and the *rep* fragments of plasmids p1448A-B (B) and pPsv48C (C), as indicated by the lettering, cloned in pKMAG. The bottom panels show representative examples of plasmid profiles of strain *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (wt) and transformants containing the native replicons and chimeras. Strain 1448A contains naturally the native RepA-PFP plasmids p1448A-A (A, 132 kb) and p1448A-B (B, 52 kb). Incompatibility is deduced from the loss of p1448A-B, or for the inability of the incoming plasmid to be maintained as an independent molecule. The asterisk indicates cointegrated plasmids; black triangles, missing plasmid band; open triangle, faint plasmid band (visible in the actual gel, but not in the picture). Clp, chromosome and linearized plasmids.

We thus evaluated possible changes in the incompatibility behavior of chimeric replicons by transforming strain *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A with the native RepA-PFP replicons from plasmids p1448A-B (B) and pPsv48C (C), and with their two corresponding chimeras of SaL and *rep* fragments (combinations B-C and C-B of the SaL-*rep* fragments; see Fig. 4 and 5). Strain 1448A contains naturally the native RepA-PFP plasmids p1448A-A (132 kb) and p1448A-B (52 kb). As expected, the native replicon from pPsv48C did not show any obvious incompatibility, producing a large number of transformants and coexisting with the two native plasmids from strain 1448A (Fig. 5, lane C-C). The same results were observed with the C-B chimera (Fig. 5, lane C-B), containing the SaL structures from plasmid C and the *rep* fragment from plasmid



B. Conversely, the native replicon from plasmid B (B-B in Fig. 5) and the B-C chimera generated about half the number of transformants than the two other replicons tested, taking double the time to reach colonies of the same size. Incompatibility mediated by the native replicon from plasmid B and the B-C chimera was evident in plasmid profile gels, where they either cointegrated with p1448A-B or induced its loss, or appeared with an apparently reduced copy number (Fig. 5). These results indicate that strong replicon incompatibility between RepA-PFP replicons is associated to the REx-C module and, unlike what happens with ColE2 replicons (Tajima *et al.*, 1988; Yasueda *et al.*, 1994), not to the Rep protein or the origin of replication and that it can be overcome by only a few nucleotide changes in this module.

## Discussion

Modularity, which can be broadly defined as the degree to which a system is made up of relatively independent but interlocking parts, is ubiquitous in biology at all organization levels (Wagner *et al.*, 2007; Kreimer *et al.*, 2008). In this work, we demonstrate that diverse plasmid replicons from *Pseudomonas* are also modular, being composed of discrete functional units, or modules, that are readily and frequently exchanged among unrelated systems, colliding with the traditional view of minimal replicons as heritable units that evolve as a whole and that can be classified in more or less coherent incompatibility and phylogenetic groups (del Solar *et al.*, 1998b; Petersen, 2011).

We have found extensive evidence of modularity in plasmids from many diverse species of *Pseudomonas*, including environmental species as well as plant, animal and human pathogens of paramount significance, such as *P. syringae* and *P. aeruginosa* (Figs. 2 and 3, Table S2, and not shown). Nevertheless, it is highly likely that this concept is also applicable to plasmid replicons consisting of *rep* gene and control systems from other organisms. In particular, homologous and/or site-specific recombination has been postulated to contribute to a similar exchange of control and *rep* modules in related enterobacterial plasmids of the IncI $\alpha$  and IncFII incompatibility groups (Kato and Mizobuchi, 1994), of the class A theta replicons, as well as different segments of ColE2 replicons (Hiraga *et al.*, 1994); nevertheless, the concept of modularity as a general organizational model for replicons did not emerge from these studies. Based on their properties as functionally independent and exchangeable units, we defined two replicon exchangeable modules and designated them as REx-C (control) and REx-R (replication) modules, respectively (Fig. 1).

Module REx-C consists of the replication control region, and has variable size and configuration. As defined for the RepJ replicon from pPsv48C, REx-C is a small sequence that contains three potential SaL structures, a putative leader peptide, a putative antisense RNA, and the signals for transcription and translation of the *rep* gene (Fig. S1). Based on these characteristics, and by structural similarity to previously described replicons, it is highly likely that the REx-C module is involved in copy number control by the antisense RNA (del Solar *et al.*, 1998b; Brantl, 2014a). Sequence comparison of extant replicons (Fig. 3) and functional assays (Fig. 1 and 4) indicate that this module is an autonomous but essential part of the replicon, and that it is functionally exchangeable among four non-homologous REx-R families (Table S1). The module contains a core region of 175-192 nt highly conserved among members of the four families (Fig. 3 and S5) and that spans the three SaL structures essential for autonomous replication of the minimal RepJ (Fig. 1) and the RepA-PFP replicons (Murillo and Keen, 1994; Gibbon *et al.*, 1999). We showed that chimeric replicons containing different combinations of SaL structures and *rep* genes from the RepA-PFP and RepJ families were fully functional (Fig. 4), demonstrating the independent functionality of the REx-C module and a lack of specificity with the REx-R module. Importantly, the *rep* fragments used for the construction of chimeras retained their corresponding peptide leader gene sequence and the RBS for the *rep* gene (Fig. 4), suggesting that control of replication by the REx-C module does not involve the formation of secondary structures (pseudoknot) with sequences surrounding the *rep* gene. Additionally, the SaL structures also conferred replication ability to the *rep* fragment containing PSA3335\_1080 (Fig. 4), whose sequence is poorly conserved compared with the other replicons used for the construction of chimeras. Work with pA506 suggested that clones containing its REx-C module, without the *repJ* gene, were able to sustain autonomous replication (Stockwell *et al.*, 2013), although these authors did not conclusively eliminate the possibility of ectopic integration. Conversely, evidence presented here and elsewhere (Murillo and Keen, 1994; Kwong *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999; Sundin *et al.*, 2004) shows that diverse REx-C modules were unable to replicate autonomously. Consequently, their functionality and conservation suggest that SaL structures in the REx-C module are essential for replication and replication control of a wide variety of replicons. This likely happens because the REx-C module harbors the signals required for expression of the *rep* gene, whose accessibility and proper recognition would be modulated by the interaction between the antisense RNA and the mRNA. Since the antisense RNA and its target sequence on the *rep* mRNA would be coded for in complementary strands of the same SaL region (Fig. S1), they always show a perfect complementarity independently

of any other downstream sequence. Therefore, the REx-C module would then act as an independent, self-contained portable unit for the control of replication.

The SaL structures are followed by a putative leader peptide that is present in diverse replicons as part of the region for the control of plasmid copy number (del Solar *et al.*, 1998b; Brantl, 2014a). Previous works (Wagner *et al.*, 1987; Blomberg *et al.*, 1992) also showed that the level of expression of the *rep* gene is controlled by the level of translation of the leader peptide gene, and not by its product. This is compatible with the fact that an in-frame deletion of most of the putative leader peptide gene (*repI*) sequence in the *repJ* replicon did not have any significant effect on replication (Fig. 1). Likewise, lack of function for the product of this gene could justify the large sequence differences in the leader peptide genes of the *repJ* and *repA* replicons from pPsv48C, despite the rest of the REx-C module being highly similar (Fig. S1). Remarkably, some of the REx-C modules examined here (e.g., from pMP-R124 and pRA2) lack the leader peptide gene, with the consequence that the start of the *rep* gene is in very close proximity to the end of SaL 3 (Fig. 3 and S5). Nevertheless, the REx-C module is highly flexible and can accommodate different structures to ensure functionality in a diversity of replicon arrangements. For instance, functionality of the pRA2 replicon required a large region upstream of the *rep* gene, containing in this order: four potential iterons, an additional small gene (*repB*, 240 nt), and a fragment containing the conserved SaL structures shown in Fig. S5 (Kwong *et al.*, 1998).

We found four different families of REx-R modules defined by groups of homology of the corresponding Rep proteins (Fig. 3 and Table S1). The family RepA-PFP is composed of a single gene, coding for a large protein of as much as 437 amino acids homologous to many replication proteins from diverse species of Gram-negative and Gram-positive bacteria, including ColE2 replicons (Gibbon *et al.*, 1999; Yagura *et al.*, 2006). The RepA-PFP proteins contain highly conserved primase, PriCT and HTH domains, with the vegetative origin of replication located in the 3' end of the *rep* gene or immediately after this gene (Fig. S7) (Yagura *et al.*, 2006). The other REx-R families contain smaller *rep* genes, with deduced products ranging from 269 to 341 amino acids and lacking homology to protein families and domains included in the InterPro database (Mitchell *et al.*, 2015). These genes might also be accompanied by downstream sequences that can form complex folding structures and that are essential for replication, as it is the case with the RepJ replicon (Fig. 1) and pRA2 (Kwong *et al.*, 1998). Directed mutagenesis of the *repJ* (Fig. 1), PSV3335\_1080 and the *repA*-PFP (Gibbon *et al.*, 1999) *rep* genes, demonstrates that they are essential for replication. Thus the diversity of the

REx-R modules found here again stresses the functional universality of the REx-C module.

The exchange of REx modules among disparate replicons is intriguing and can confer diverse evolutionary advantages, such as increasing their competitiveness by acquiring modules that are better adapted to their particular bacterial host. In this respect, the type of REx-C module characterized here is probably specific to *Pseudomonas* and its general presence in diverse replicons likely facilitates plasmid survival in these bacteria. Indeed, we were unable to find sequences homologous to the REx-C module in any other bacteria outside the genus *Pseudomonas*. Additionally, the RepA-PFP replicons analysed here contain specific REx-C modules that are different from those associated to homologous RepA proteins, such as those from the enterobacterial ColE2 plasmids. Another likely advantage of modularity is to favor the coexistence of highly related replicons. This type of coexistence has been documented for PFP plasmids of pseudomonads (Murillo and Keen, 1994; Sundin, 2007) and *repABC*-type plasmids from rhizobia (Cevallos *et al.*, 2002), and it also likely happens with RepJ replicons (Fig. 2). The analysis of chimeric replicons indicates that plasmid incompatibility is conferred by the REx-C module (Fig. 5), in agreement with previous results indicating a partial incompatibility of the corresponding module from plasmid pPT23A (Gibbon *et al.*, 1999). Additionally, the incompatibility between plasmid p1448A-B and its cloned replicon was bypassed by swapping the REx-C module of the cloned replicon with another one differing in the sequence of the loop from SaL 2, as well as in a few other nt positions (Fig. 5 and S6). Therefore, the exchange of REx-C modules could be a rapid and efficient way of reducing or eliminating incompatibility among highly related PFP plasmids, which usually carry genes conferring important adaptive advantages (Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007). Additionally, it is also likely that the coexistence of related modular replicons, requiring similar cellular resources, could help to streamline the replication process and reduce the metabolic burden of plasmids.

A further and exciting consequence derived from the modularity of replicons, is that their combination could potentially produce new replicons. In particular, the independent functionality of the REx-C module could allow it to co-opt appropriate genes that might then function as Rep initiators and result in new autonomously replicating molecules. But, would the bacterial gene pool contain genes that will function as plasmid replication initiators when associated to a REx-C module? Our experiments indicate that this is indeed the case: the non-replicative chromosomal *repJ* homolog PSA3335\_1080 could replicate autonomously when preceded by a DNA fragment containing the SaL structures

from the REx-C module. PSA3335\_1080 is a chromosomal gene widely distributed in *P. syringae* and related species, conserving synteny with its adjacent sequences, which suggests that is a long time inhabitant of these bacteria possibly having a functional role different from replication. A priori, there could be a variety of genes that could generate new replicons when combined with an appropriate REx-C module and their identification could be challenging. For instance, manual or automatic prediction of structure or function of the RepJ protein and homologs would likely be unsuccessful because they lack obviously conserved domains typical of Rep proteins, and this might also be the case for other genes that could be recruited as replication initiators. Therefore, and as occurs with other systems (Agapakis and Silver, 2009; Lorenz *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2016), modularity of origins of replication will undoubtedly favor their evolution and adaptability, for instance by reducing incompatibility and metabolic load to the bacterial host, but could also be facilitating the generation of new plasmid replicons, with the concomitant possibility of immediate mobilization of associated chromosomal genes.

## Materials and Methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this work are detailed in Table S3. *E. coli* strains DH10B and GM2929 (*dcm*, *dam*), when unmethylated DNA was needed, were used for DNA manipulations and were grown in LB at 37 °C. Strains *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (Joardar *et al.*, 2005), pv. *syringae* B728a (Feil *et al.*, 2005b), and pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010) and UPN912, which derives from strain NCPPB 3335 and is cured of its three native plasmids (M. Añorga, unpublished results), were propagated using King's medium B (King *et al.*, 1954) at 25 °C. When necessary, media were supplemented with 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin or 25 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin. We used a mixture of plasmids pME6031 (8.3 kb), pBBR1MCS-2 (5.4 kb), pKMAG-C (4.3 kb) and pBlueScript II (3.0 kb) (Table S3), purified from *E. coli* using the Illustra plasmidPrep Mini Spin kit (GE Healthcare, UK), as size markers in plasmid profile gels.

### Molecular techniques

DNA was amplified using a high fidelity enzyme (PrimeStar HS, Takara Bio Inc., Japan) and cloned using the CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) or the pGEM-T Easy Vector System (Promega), following the manufacturer's instructions. For plasmid profile gels, DNA was purified by alkaline lysis and separated by electrophoresis in 0.8 % agarose gels with 1xTAE as described (Murillo *et al.*, 1994). Plasmids were transferred

to *P. syringae* by electroporation (Choi *et al.*, 2006). For RT-PCR analysis, DNA-free RNA was obtained from bacterial cultures grown overnight in medium B using TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) and Ambion TURBO DNA-free Kit (Life Technologies). Concentration and purity of RNA were determined spectrophotometrically, and its integrity confirmed by electrophoresis in agarose gels. cDNA was synthesized from RNA using the ImProm-II reverse transcriptase system (Promega), following the manufacturer's recommendations. Primer Int\_R, 5'-GCCGGTGCAGAGATACCC-3', specific for the sense transcript of *repJ*, was used for the reaction: at 25 °C for 5 min for primer annealing, 60 min at 42 °C for reverse transcription, and 15 min at 70 °C for enzyme inactivation. cDNA was amplified using primers B (5'-CGATGTAGATTCACGAATCGCAG-3'), C (5'-CTGATTATGGCGTTCCTACTGC-3') or D (5'-TGCAAGCTGTCTAAAGTGAAGC-3') together with 1R (5'-GCTGTTGTTTCAGAGAGATGACG-3'), to determine the size of the transcript, or primer pair Int\_F (5'-GAGAAGTTTCTGGCCATCGAG-3') and Int\_R (5'-GCCGGTGCAGAGATACCC-3') to analyze the transcriptional activity of gene *repJ* (see Fig. 1). The program used comprised 30 cycles (94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s) plus a final extension step of 6 min at 72 °C. Control reactions included PCR amplification of pure extracted RNA, to verify the absence of contaminating DNA; amplification of purified DNA, to verify the reaction conditions, and amplification of an internal fragment of gene *gyrB*, to confirm the synthesis of cDNA.

### **Bioinformatics**

Multiple-sequence alignments using Muscle, determination of the optimal substitution model, and Maximum likelihood phylogenetic tree construction using the JTT matrix-based model with a gamma distribution with 5 categories were done using MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016); confidence levels of the branching points were determined using 500 bootstraps replicates. Searches for sequence similarity in the NCBI databases were done using the BLAST algorithms (Hubbard *et al.*, 2008) and sequences were aligned on-line using the MULTALIN program (Corpet, 1988) or the tools in the EMBL-EBI server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Search for protein motifs and fold recognition was done using the InterPro (Mitchell *et al.*, 2015) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) and the Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) web servers. Genome and nucleotide sequences were visualized and manipulated using the Artemis genome browser; when necessary, blast comparisons were visualized with ACT (Carver *et al.*, 2008). Oligonucleotide primers were designed using Primer3plus software (Untergasser *et al.*, 2012). Promoters were predicted using the online BPRM server (<http://www.softberry.com>). DNA or RNA Folding predictions were done using the Mfold web server (Zuker, 2003) using the default



settings, except for a folding temperature of 25 °C. Patterns of nucleotide polymorphism were calculated using DnaSP v 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009).

### Construction of vectors

The *E. coli* pKMAG vector and the *E. coli*-*Pseudomonas* pKMAG-C vector were constructed to examine, respectively, the replication ability of cloned fragments and the expression of *repJ* in these fragments. To construct pKMAG, a PCR-amplified fragment from the pK184 vector (positions 71-2,064; accession no. U00800) (Jobling and Holmes, 1990a), retaining the kanamycin resistant gene and the origin of replication and lacking the *lacZ* promoter, and a fragment from pME6041 (Heeb *et al.*, 2000) (positions 3,809-4,255; accession no. AF118812), containing its polylinker and the T4 transcription terminator, were ligated together resulting in the new vector. The RepA-PFP replicon from pPsv48C (positions 41,791-1,428; accession no. FR820587) was then cloned into the unique *Ascl* site of pKMAG, resulting into pKMAG-C. Construction details are included in Fig. S2.

### Replication assays

Fragments used for the definition of a minimal RepJ replicon were amplified by PCR from strain Psv48 $\Delta$ AB (Bardaji *et al.*, 2011b), a derivative of strain NCPPB 3335 containing only pPsv48C, cloned into pJET1.2 (Thermo Scientific) and then subcloned into pK184 in both directions, pKMAG and/or pKMAG-C. Primers used for amplifications were A (5'-AAAGCAGCGGATTTTGTAGG-3'), B, C, and D (described above), as forward, and E (5'-GACGCTAGGAGCCTATCCAG-3'), F (5'-TCCCTGTTTTTCCTGAAAGG-3') and G (5'-GGTCGAACCGACCAACTG-3'), as reverse primers (see Fig. 1 and Fig. S1). For the construction of chimeric replicons we first cloned in pKMAG amplicons containing the RepA-PFP and RepJ replicons, including the REx-C module in a 390-391 nt upstream fragment, from plasmids pPsv48C (coordinates 41,714-1,336, for RepA-PFP, and 23,309-31,027, for RepJ, from accession no. FR820587) and p1448A-B (coordinates 51,624-1,650 from accession no. CP000060). The SaL (coordinates 78,056-78,262, from accession no. FR820585) and the *rep* (coordinates 78,254-1,360, from FR820585) fragments from pPsv48A were amplified by PCR and cloned separately in pJET1.2 to reconstruct an *XmnI* site present in many RepA-PFP replicons and missing from pPsv48A, resulting in a T $\rightarrow$ C change in pos. 78,263. A double digestion *XmnI*-*EcoRI* or *XmnI*-*XhoI* of the resulting clones liberated the *rep* genes (*rep* fragment), leaving a 203-280 nt fragment attached to pKMAG that contained SaL structures 1 to 3 from the REx-C module (SaL fragment). The SaL and *rep* fragments were then separated by electrophoresis, purified and ligated in the appropriate combinations for the construction

of chimeras. A 2,808 nt amplicon containing PSA3335\_1080 (35,079-37,886 from accession no. KB644113), including 1,150 nt upstream and 815 nt downstream of the CDS, was cloned in pKMAG to evaluate replication of this gene in its native configuration. Additionally, an amplicon similar to the previous one but lacking the first 1,036 nt (36,115-37,886 from accession no. KB644113), and with an A→T change in pos. 36,115, was ligated in the proper orientation to the appropriate XmnI-EcoRI clones in pKMAG generated above and containing the SaL fragments from *repA* or *repJ* from pPsv48C, or from pPsv48A. For functional analyses of replication initiation protein genes, replicative constructions containing *repJ* and PSA3335\_1080 were digested using a unique restriction site internal to each CDS, filled-in with Klenow enzyme (New England BioLabs Inc., UK) and subsequently religated. Enzymes used for disrupting the CDSs by changing the reading frame were SexAI, adding 5 nt to the *repJ* CDS, and EcoNI, adding 1 nt to the CDS of PSA3335\_1080. For all replication experiments, at least two amplicons from two separate amplification experiments were cloned and tested; the identity and integrity of all clones was confirmed by sequencing. Replication ability was assessed by electroporation into the plasmidless strains *P. syringae* pv. *syringae* B728a and UPN912. Plasmids were confirmed to replicate autonomously by their ability to generate antibiotic-resistant transformants and, necessarily, by their appearance as independent bands in undigested plasmid profile gels, basically as described (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998). Experiments were repeated at least three times, with similar results.

### **Incompatibility assays**

Incompatibility between native plasmids and cloned replicons was analyzed essentially as described (Nordström, 1993; Sesma *et al.*, 1998). Briefly, constructs in pKMAG containing the native RepA-PFP replicons from plasmids pPsv48C (strain *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335) and p1448A-B (strain *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A) and the corresponding chimeras of SaL and *rep* fragments, were isolated from *E. coli* and individually transferred to *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, which naturally contains the native plasmids p1448A-A (132 kb) and p1448A-B (52 kb) (Joardar *et al.*, 2005). Resulting km<sup>R</sup> transformants of strain 1448A were cultured overnight in liquid B medium with kanamycin at 25 °C with shaking, and their plasmid content visualized by electrophoresis in plasmid profile gels to determine the possible eviction of native plasmids.



### **Accession numbers**

Sequences of vectors pKMAG and pKMAG-C are deposited in GenBank under accession numbers KX714576 and KX714577.

## Supplementary material

```

1
repJ GCACTGAAACGCTAACTGAGGAAAGACCACCATGACAAACCACCTTTCAAAATTCATCTGCAACGACGATGGGCG
repA .....C.....T.....

150
repJ CAACGATGAAGCGTATCAGCTGATCAGCCAGGGTCGGCTCGACGGTGCGCCCTCGGGACGCGTGGGAGGCCAGTGC
repA .....A.....A.....TG.....

225
repJ CGCCTGGCTTGACGCTGCTGATTTTCAGCGGTTCCGGCGGGGCTTTACCCACGGCTGTTGAGCAAATCGAGCCA
repA .C.....T.....A.....

300
repJ TGAAGGGCTGGTGGTGGCCAGGAAAGCGTCTAGCTCGTTGAAAGCAGCGGATTTGTAGGGCGAAAAGCGGAGG
repA ....A..C.....

375
repJ TCCCATGCTACTATCCGGCACAGTTTATTTCAGGAAAGCGACGATGTAGATTCACGAAATCGCAGAAACCAAAA
repA .....A..AT.....

450
repJ AGCCCCGCTTGCCGGCGGGGCTTTTGGAAAATCTTGAACAGGCCGTTAACGAGCGGATTACCTGTTCAACACAC
repA .....C.....TGGTTT...A.....

525
repJ ATAACGTGAGCTGATTATGGCGTTCCTGCGGCTTTGTGCAAGCTGTCTAAAGTGAAGCCTTCAGTTCACCGCTG
repA .....TC..A.....

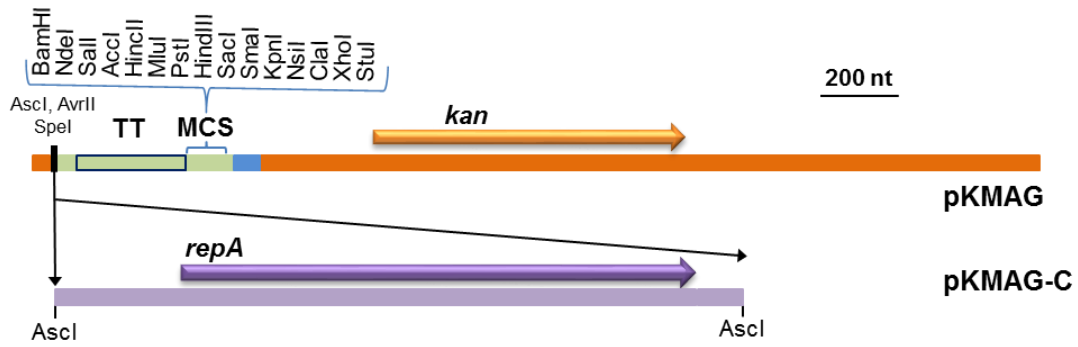
600
repJ AACGGTGGACTTATGGAAAAGATTCTTCAGCAGGCTGTGCCCTTCTAAAGGCAGACC-TGGACCCCCAGCATCA
repA .....T-.....GT.G..G.TGAC.GC...C..CC.....TTGAC

675
repJ TCAAAACCTGACACGTTTACCGTAGCCCAAGGCC TTCATGGCCAAGGCGGTGAAGCATGAGGCACCTCAAGGCT
repA C.CTTG.G.C...CC...CA.CGC.TTGGCCAA.CAGT.....A.C.GA.C.C..G

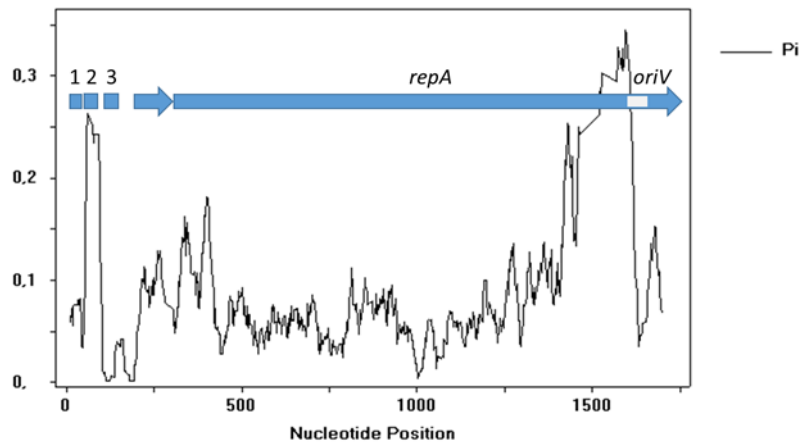
750
repJ GTCAGGCTCCCCCTTCTGACCCTCACTCCGCTTTACGTCGCCCGG--GTCGGGCAATGCCGTCGCCGTTACGCGG
repA A...T..TG..ATCG.GAC.T.A.C.A.G..CA-...C..AT...CT.G.CA...GCA..CA..T.CCG.CT.C

```

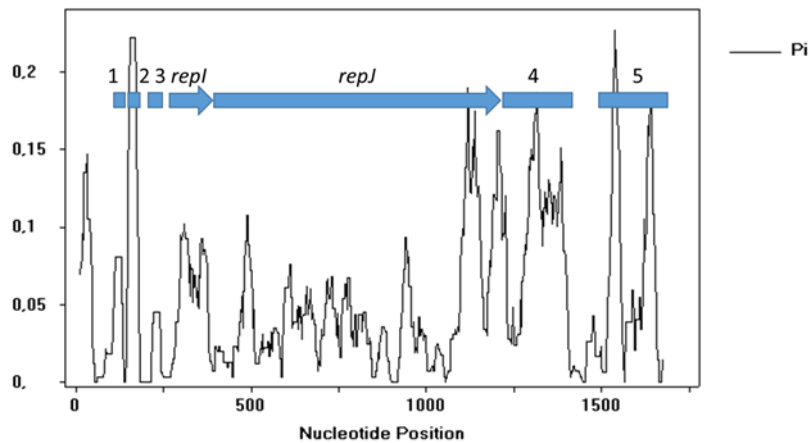
**Figure S1. Global alignment of the REx-C modules preceding genes *repJ* and *repA* from plasmid pPsv48C.** Sequences from coordinates 29,043-29,789 (*repJ*) and [41,488-42,103]-[1-92] (*repA*) from pPsv48C (accession no. FR820587) were aligned with Multalin, with identical positions in both sequences shown as red dots and mismatches as black nucleotides; dashes indicate gaps to maximize the alignments. Homology is lost before the first nucleotide shown here. Orange boxes correspond to stem-and-loop structures 1, 2 and 3, in this order; structure 3 is complex and can potentially fold in different ways. Angled arrows topped with letters indicate the position and start of primers used to define the minimal replicon, as depicted in Fig. 1. Blue boxes indicate restriction sites used for creating an in-frame deletion in *repI* and for constructing chimeric replicons. Asterisks and hashes indicate the putative start and stop codons, respectively, of both the leader peptide (*repI*) and the replication initiator (*repJ*) coding sequences; putative ribosome binding sites (RBS) are underlined for *repI* and boxed in grey for *repJ*. Boxes labelled as -35 and -10 are putative promoters; leftwards purple arrows indicate predicted -35 and -10 boxes of a putative antisense RNA promoter, with the predicted transcriptional terminator also indicated in purple. All promoters were predicted using BPROM.



**Figure S2. Schematic representation of pKMAG and pKMAG-C cloning vectors (accession numbers KX714576 and KX714577, respectively).** Vectors were constructed by combining PCR amplification and ligation of DNA from diverse plasmids, as indicated by colors: green, from vector pME6041 (positions 3,809-4,255, accession no. AF118812); blue, from pGEM-T Easy; orange, from the *E. coli* vector pK184 (positions 71-2,064, accession no. U00800). Vector pKMAG-C contains the *repA* replicon from the native plasmid pPsv48C (positions 41,791-1,428, accession no. FR820587), cloned at the Ascl site of pKMAG and allowing replication in *P. syringae*. The orange and purple arrows indicate the kanamycin resistance gene from pK184 and the *repA* gene from pPsv48C, respectively. All restriction sites shown in pKMAG are unique in the sequence. Sequences are drawn to scale; TT, transcriptional terminator; MCS, multiple cloning site.

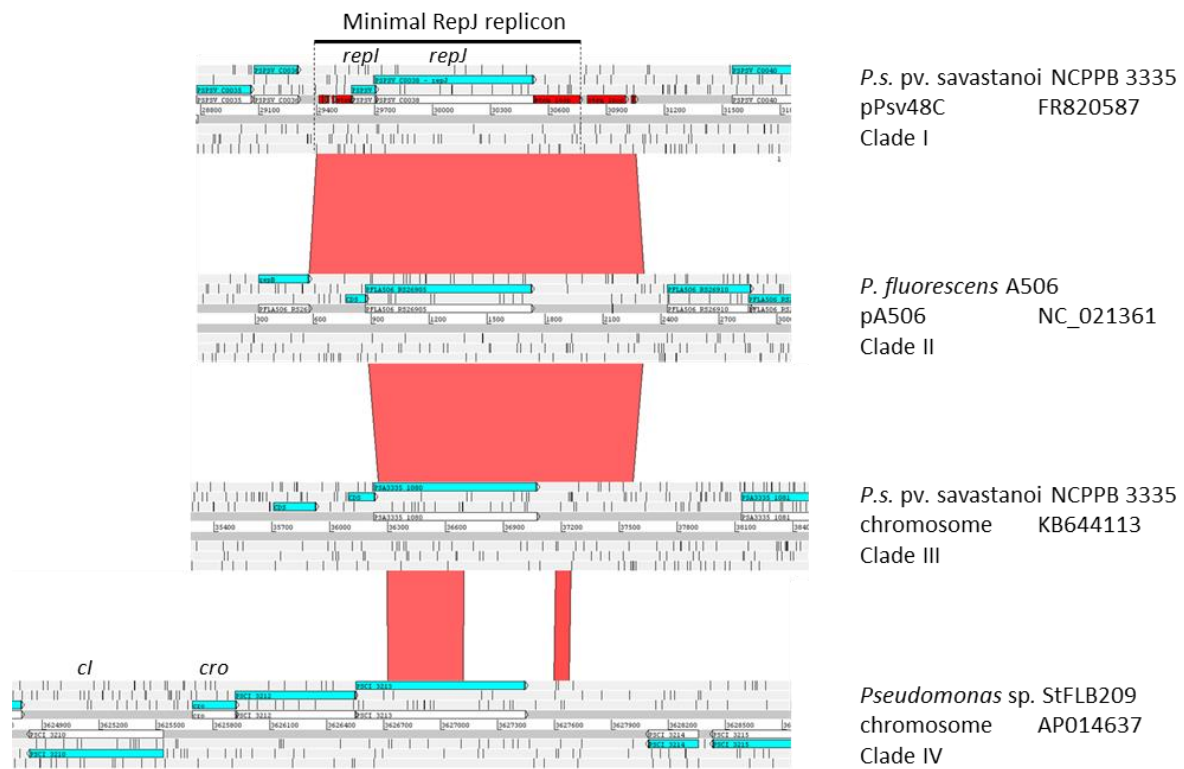


RepA-PFP replicon

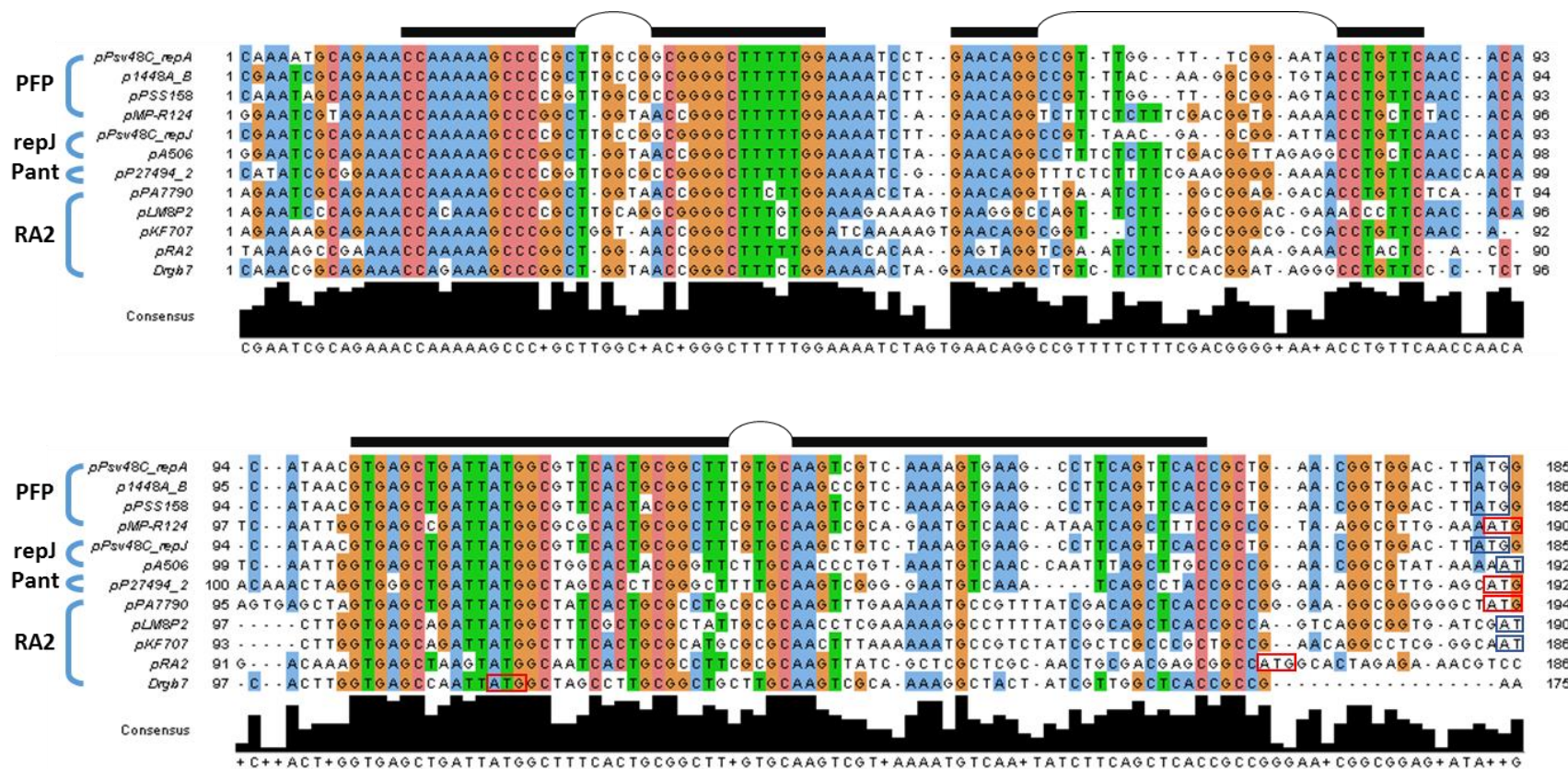


RepJ replicon

**Figure S3. Sliding window analysis of nucleotide diversity ( $\pi$ ) of RepA-PFP and RepJ replicons.** Alignments consisted of 171 sequences (1,599 nt) for RepA-PFP and 23 sequences (1,688 nt) from clade I (see Fig. 2) for RepJ, all from strains of the *P. syringae* group. Nucleotide diversity was calculated using the program DnaSP v5.10.01 with a window length of 25 nt and a step of 2 nt and excluding all sites with gaps from the analysis. The approximate location of stem-and-loop structures (rectangles) and CDSs for the putative leader peptide (small arrows) and replication initiator proteins (large arrows) are shown; the origin of replication of RepA-PFP replicons is denoted as a white rectangle within the *repA* CDS.

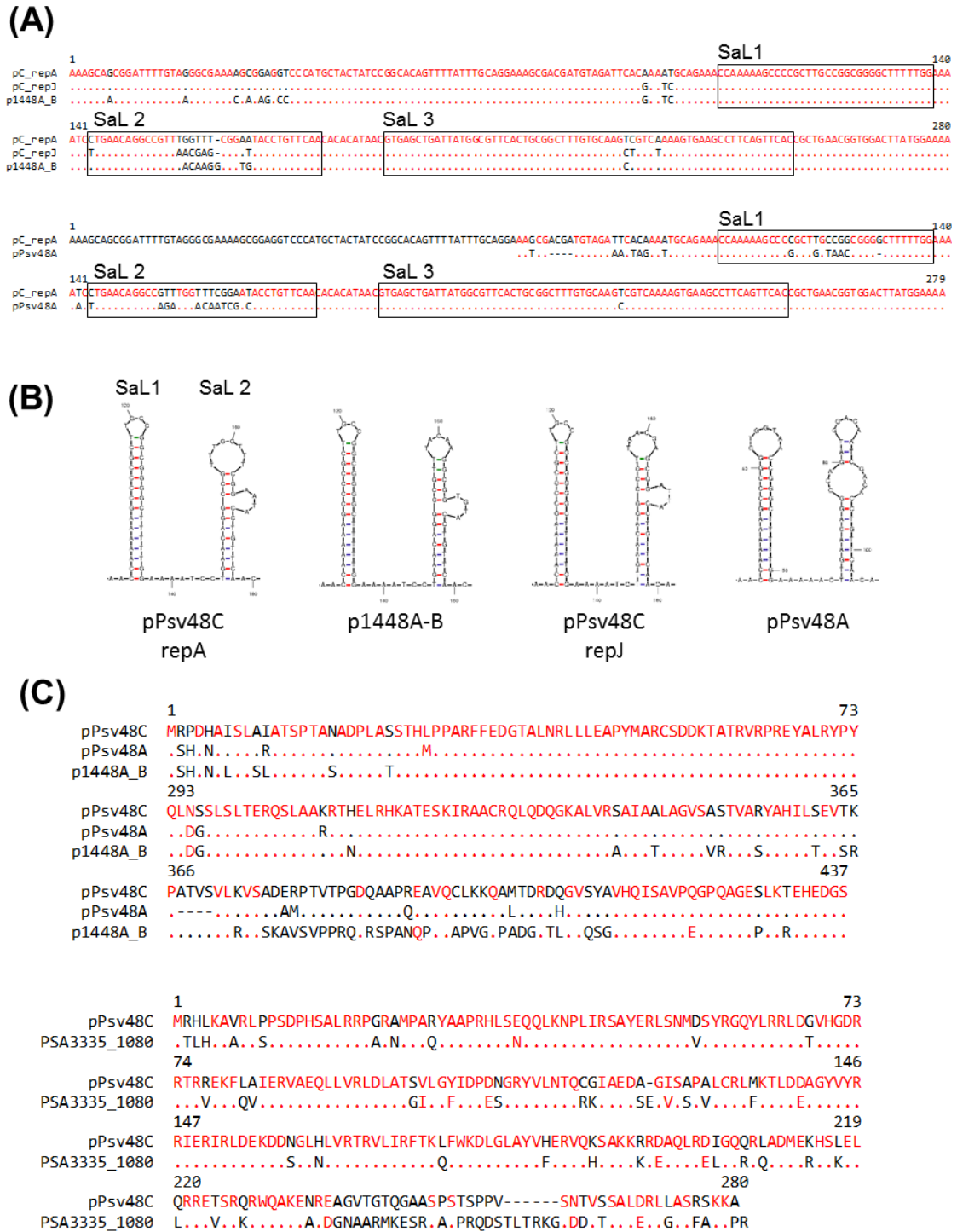


**Figure S4. Genomic context of different RepJ homologs.** Sequences are indicated by strain designation, genomic location and accession number. The extent of the minimal RepJ replicon (defined in Fig. 1) is indicated above the first sequence; stem-and-loop structures in the RepJ replicon from pPsv48C are shown as red boxes. Sequences were compared in pairs using blastn at the NCBI with default settings, except for a word size of 7 and a gap cost of 2/2 (existence/extension) to maximize alignment. Relevant areas were visualized using ACT; red shading connects homologous regions. In the lower sequence, *cl* and *cro* denote genes for putative repressor *cl* and regulatory Cro proteins, respectively.



**Figure S5. Sequence conservation of the REX-C modules from four replicon families.** Alignment was done using the T-Coffee server at the EMBL-EBI website (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) with default parameters. Shown are partial sequences immediately preceding or overlapping the start of the *rep* genes from plasmids (accession no.:coordinates in parenthesis) *pPsv48C* (FR820587.1:41,804-41,988, *repA*, and 29,399-29,583, *repJ*); *p1448A-B* (CP000060.1:3-188); *pPSS158* (CP005971.1:26,897-27,081); *pMP-R124* (JQ737005.1:43,608-3); *pA506* (CP003042.1:578-769); *p27494\_2* (CP015602.1:6,766-6,957); *pPA7790* (CP015000.1:c46,674-46,481); *pLM8P2* (KJ940994.1:22,563-2); *pKF707* (AP014863.1:c44,123-43,928); *pRA2* (U88088.2:c8,241-8,056), and *Drgb7* (KT351738.1:c17,735-17,561). Sequences are grouped by groups of homology of their respective replication initiator proteins, indicated at left; nucleotides conserved in at least half of the sequences are highlighted in color. Blue boxes indicate the start codon of the putative leader peptide, and red boxes the start codon of the annotated *rep* gene. Bars above the sequence indicate stem-and-loop structures 1, 2 and 3, as discussed in the main text and Fig. S2.





**Figure S6. Sequence differences among the stem-and-loop structures and deduced products of *rep* genes used for the construction of chimeras.** (A) Alignment with Multalin of the SaL fragments from the REx-C modules used for the construction of chimeras (see Fig. 4A), which end in the common XmnI site. Stem-and-loop structures 1, 2 and 3 are boxed. (B) Mfold predicted folding at 25 °C of the sequences shown in A. (C) Alignment of the deduced products of replication initiators of the RepA-PFP (top) and the RepJ (bottom) replicons. For clarity, long stretches of sequence identity were removed from the RepA-PFP comparison. Residues identical to the topmost sequences are shown as dots and mismatches as black characters; dashes indicate gaps to maximize the alignments.

**Table S1.** Amino acid identity among plasmid replication initiator proteins from four different replicon families<sup>a</sup>

Replicon family	PFP				RepJ			RepA-RA2				RepA-Pa
Accession number	CBZ40037	CBZ39919	AAZ38092	EJZ60922	CBZ40073	CP003042 <sup>c</sup>	EFI00733	AAB70929	AP014863 <sup>b</sup>	ALG88764	AIT41777	ANF89329
Plasmid	pPsv48C (RepA)	pPsv48A	p1448_B	pMP-R124	pPsv48C (RepJ)	pA506	PSA3335_1080	pRA2	pKF707	Drgb7	pLM8-P2	pP27494_2
pPsv48C (RepA)	100.0	96.5	88.1	65.0	20.1	18.8	19.5	16.3	12.9	16.8	15.48	16.9
pPsv48A	96.5	100.0	88.9	65.1	20.5	19.1	19.9	15.7	12.7	16.7	15.06	16.9
p1448A-B	88.0	88.9	100.0	65.7	20.5	17.8	20.3	13.4	13.3	15.4	13.39	17.3
pMP-R124	65.0	65.1	65.7	100.0	16.5	15.5	15.3	12.0	9.3	14.7	11.84	15.8
pPsv48C (RepJ)	20.1	20.5	20.5	16.5	100.0	65.9	72.7	23.8	19.8	19.2	21.74	14.7
pA506	18.8	19.1	17.8	15.5	65.9	100.0	63.3	25.6	20.8	20.9	23.20	15.3
PSA3335_1080	19.5	19.9	20.3	15.3	72.7	63.3	100.0	24.2	20.8	17.7	20.63	15.0
pRA2	16.3	15.7	13.4	12.0	23.8	25.6	24.2	100.0	58.3	65.6	67.29	22.2
pKF707	12.9	12.7	13.3	9.3	19.8	20.8	20.8	58.3	100.0	51.8	56.51	21.2
Drgb7	16.8	16.7	15.4	14.7	19.2	20.9	17.7	65.6	51.8	100.0	60.97	22.0
pLM8-P2	15.5	15.1	13.4	11.8	21.7	23.2	20.6	67.3	56.5	61.0	100.00	22.0
pP27494_2	16.9	16.9	17.3	15.8	14.7	15.3	15.0	22.2	21.2	22.0	21.97	100.0

<sup>a</sup> Figures represent percentage of amino acid identity in pairwise comparisons. The percent identity matrix was obtained from a multiple sequence alignment done with T-Coffee in the EMBL-EBI web server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>).

<sup>b</sup> The corresponding gene is not annotated in the sequence of plasmid pKF707; therefore, we compared the product deduced from positions 43,929-43,093 of sequence accession no. AP014863.

<sup>c</sup> The annotation of the deduced product of *repA* from pA506 (AGN33483.1) makes it 25 aa shorter than the products of *repJ* and PSA3335\_1080; therefore, we used the product deduced from positions 872-1,729 of sequence accession no. CP003042, which contains a more likely start codon and that is the same size than RepJ from pPsv48C.



**Table S2.** Blastn comparison of the 600 nt situated 5' of the *repA* gene from *Pseudomonas fluorescens* R124 plasmid pMP-R124 (coordinates 43195-43794, accession no. JQ737005.1).<sup>a</sup>

Description	Replicon type	Total score (bits)	Query coverage	nt Identity	E value	Accession number
<i>P. fluorescens</i> L228, plasmid	RepA-PFP	616	85%	87%	2e-172	CP015640.1
<i>P. fluorescens</i> A506 plasmid pA506	RepJ	499	85%	82%	4e-137	CP003042.1
<i>P. syringae</i> strain PT14 plasmid pPT14-32	RepA-PFP	479	80%	83%	4e-131	JQ418536.1
Uncultured bacterium plasmid Drgb7	RepA-RA2	221	79%	71%	2e-53	KT351738.1
<i>P. aeruginosa</i> PA7790 plasmid pPA7790	RepA-RA2	165	77%	69%	1e-36	CP015000.1
<i>P. aeruginosa</i> PSE305	RepA-RA2	165	77%	69%	1e-36	HG974234.1
<i>P. balearica</i> plasmid pKF707	RepA-RA2	131	78%	67%	2e-26	AP014863.1
<i>P. alcaligenes</i> plasmid pRA2	RepA-RA2	127	66%	68%	3e-25	U88088.2

<sup>a</sup> The comparison was done using the blastn tool from the NCBI against the non-redundant nucleotide collection in December, 2016, with default parameters; shown are all hits with more than 65 % identity over more than 65 % of the query sequence. Rows with the same colour correspond to homologous replicons.

**Table S3.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Host of isolation; description	Source or reference
<b>Bacteria</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
NEB10β	$\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrB)$ <i>deoR recA1 endA1 araD139 <math>\Delta(ara, leu)7697</math> <i>galU galK</i> <math>\lambda^-</math> <i>rpsL nupG</i></i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
GM2929	F <sup>-</sup> , <i>araC14, leuB6, fhuA13, lacY1, tsx-78, glnX44, galK2, galT22, \lambda^-, <i>mcrA0, dcm-6, hisG4, rfbC1, rpsL136 (strR), dam-13::Tn9, xylA5, mtl-1, recF143, thiE1, mcrB9999, hsdR2</i></i>	(Palmer and Marinus, 1994)
<i>Pseudomonas syringae</i>		
pv. <i>phaseolicola</i>		
1448A	<i>Phaseolus vulgaris</i> ; pathogen of bean, it contains two native plasmids (p1448A-A and p1448A-B)	(Joardar <i>et al.</i> , 2005)
pv. <i>savastanoi</i>		
NCPPB 3335	<i>Olea europaea</i> ; plant pathogen, causes aerial tumors on olive trees, it contains three native plasmids (pPsv48A, pPsv48B and pPsv48C)	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
UPN912	Derivative of strain NCPPB 3335 and cured of its three native plasmids	Maite Añorga, unpublished
pv. <i>syringae</i>		
B728a	<i>Phaseolus vulgaris</i> ; pathogen of bean, plasmidless, Cu <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> .	(Feil <i>et al.</i> , 2005a)
<b>Native plasmids</b>		
p1448A-A	RepA-PFP replicon; virulence plasmid from strain 1448A, 132 kb; CP000059.1	(Joardar <i>et al.</i> , 2005)
p1448A-B	RepA-PFP replicon; from strain 1448A, 52 kb; CP000060.1	(Joardar <i>et al.</i> , 2005)
pPsv48A	RepA-PFP replicon; virulence plasmid from strain NCPPB 3335, 78 kb; FR820585	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)

pPsv48B	RepA-PFP replicon; from strain NCPPB 3335, 45 kb; FR820586	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48C	Contains two replicons (RepA-PFP and RepJ); virulence plasmid from strain NCPPB 3335, 42 kb; FR820587	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)

### Plasmids

pBBR1MCS-2	Broad host range cloning vector, 5.4 kb, Km <sup>R</sup>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBlueScript II SK	Cloning vector, 2.96 kb, Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pK184	<i>E. coli</i> vector, does not replicate in <i>Pseudomonas</i> ; 2.4 kb, Km <sup>R</sup>	(Jobling and Holmes, 1990b)
pKMAG	Vector derived from pK184, devoid of the <i>Plac</i> promoter and containing the transcriptional terminator and polylinker from pME6041; 2.6 kb, Km <sup>R</sup> ; KX714576	This work
pKMAG-C	pKMAG containing the minimal RepA-PFP replicon, replicates in <i>E. coli</i> and in <i>Pseudomonas</i> ; 4.3 kb, Km <sup>R</sup> ; KX714577	This work
pME6031	Cloning vector ; 8.3 kb, Tc <sup>R</sup>	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)
pME6041	Cloning vector; 5.6 kb, Km <sup>R</sup>	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)

---



## CAPÍTULO 3

# Plasticity and stability of virulence plasmids from *Pseudomonas syringae* are modulated by IS801 and multiple toxin-antitoxin systems

---

### Abstract

*Pseudomonas syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335 contains three virulence plasmids of the widespread PFP family, and here we sought to investigate the mechanisms involved in their stable inheritance. Plasmid pPsv48C is extremely stable, and we previously showed that it contains two independent functional replicons (*repA* and *repJ*) and 29.5% of its sequence occupied by putative mobile elements. Here we show that this plasmid spontaneously suffers the deletion of an 8.3 kb fragment, with a frequency  $4 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ , by recombination between two direct copies of MITEP<sub>sy2</sub>. Likewise, we showed that insertion sequence IS801 promotes the occurrence of deletions of pPsv48C by one-ended transposition with an average frequency of  $1.8 \pm 0.7 \times 10^{-4}$ , half of them resulting in the loss of a virulence gene. These deletion derivatives were stably maintained in the population by replication mediated by *repJ*, which is adjacent to IS801. We demonstrated that IS801 also promotes deletions in plasmid pPsv48A, either by recombination or failed transposition. The accumulation of these type of deletions *in vivo* is prevented by the occurrence in these plasmids of functional postsegregational killing systems, which also increased in two orders of magnitude the stability of pPsv48A. Together, our results indicate that maintenance of pathogenicity genes in bacterial populations of *P. syringae* results from the combination of diverse antagonistic evolutionary forces that are unrelated and independent of the pathogenicity process.

## Introduction

Plasmids are dispensable extrachromosomal elements widely distributed in bacteria, facilitating their survival and the colonization of eukaryotic hosts (Vivian *et al.*, 2001; Norman *et al.*, 2009; Sundin and Murillo, 2009). Their plasticity and transmissibility contributes to the rapid dissemination of resistance and virulence genes in the environment, thus promoting the emergence of uncontrollable bacterial diseases both in clinical and agricultural settings (Sundin, 2007; Kelly *et al.*, 2009; Carattoli, 2013; Aviv *et al.*, 2016; Porse *et al.*, 2016). However, plasmids are usually large and exists in several copies per cell. This can impose a significant metabolic burden to the cell that might facilitate the emergence of plasmid-free derivatives in the absence of selection for plasmid-borne characters (Dahlberg and Chao, 2003; Harrison and Brockhurst, 2012; Romanchuk *et al.*, 2014; Porse *et al.*, 2016). This metabolic cost can be lowered by diverse plasmid-host adaptations, including specific deletions of the plasmid backbone, mutations in the plasmid replication machinery, or chromosomal mutations, among others (Dahlberg and Chao, 2003; Harrison and Brockhurst, 2012; Porse *et al.*, 2016). Additionally, plasmids can increase their stability by conjugal transfer and/or carry an additional battery of determinants specifically dedicated to ensure their stable inheritance and maintenance in the bacterial population, which can be classified into three categories (De Gelder *et al.*, 2007; Sengupta and Austin, 2011). The first category are partition determinants, which direct the active segregation of plasmid molecules during cell division. All low-copy plasmids appear to contain a partition system, which usually consists of an operon of two genes plus a specific DNA sequence for recognition. Multimer resolution systems comprise the second category and include recombinases that, through site-specific recombination, resolve plasmid cointegrates into the corresponding monomers, thus maximizing the number of copies available at cell division. The postsegregational killing systems, in the third category, ensure plasmid maintenance by selective killing of plasmid-free cells and include toxin-antitoxin (TA) systems and, with less prominence, restriction-modification loci.

The *Pseudomonas syringae* complex is considered the most important bacterial plant pathogen in the world (Mansfield *et al.*, 2012a). Most *P. syringae* strains contain plasmids carrying a diverse array of adaptive genes, including virulence genes, contributing to increase aggressiveness or expand host range, and genes for resistance to antibacterials and UV light (Jackson *et al.*, 1999; Sundin and Murillo, 1999; Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007; Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2017). Most of these plasmids belong to the so-called PFP group, characterized by sharing the highly conserved RepA-

PFP replicon; these replicons are highly plastic and adaptable, and strains often contain two or more stably co-existing PFP plasmids (Murillo and Keen, 1994; Stavrinides and Guttman, 2004; Sundin, 2007; Bardaji *et al.*, 2011b). PFP plasmids also often contain several types of insertion sequences, transposons and miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs), which can account for up to at least a third of the plasmid, and that participate in the acquisition and exchange of adaptive characters (Alarcón-Chaidez *et al.*, 1999; Rohmer *et al.*, 2003; Stavrinides and Guttman, 2004; Bardaji *et al.*, 2011a; Bardaji *et al.*, 2011b). Insertion sequence IS801 (1.5 kb), and its isoforms, is particularly significant for its relatively high transposition frequency, its common association with virulence genes and its ability to undergo one-ended transposition, whereby the element can mobilize adjacent DNA (Alarcón-Chaidez *et al.*, 1999; Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2002; Bardaji *et al.*, 2011a). Additionally, plasmids of *P. syringae* have a mosaic structure and often share extensive regions of similarity, suggesting their evolution through a multistep process involving the acquisition and loss of large DNA regions (Murillo and Keen, 1994; Sesma *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1999; Rohmer *et al.*, 2003; Stavrinides and Guttman, 2004; Ma *et al.*, 2007; Bardaji *et al.*, 2011b; O'Brien *et al.*, 2011; Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2017). Despite this, plasmid profiles of individual strains appear to be in general characteristic and stable, although certain plasmids can be lost with high frequency depending on the culture conditions (Murillo *et al.*, 1994; Sundin and Bender, 1994; Sundin *et al.*, 1994; Vivian *et al.*, 2001; Pérez-Martínez *et al.*, 2008). Although diverse potential stability determinants were identified among PFP plasmids (Gibbon *et al.*, 1999; Stavrinides and Guttman, 2004; Sundin *et al.*, 2004; Joardar *et al.*, 2005; Bardaji *et al.*, 2011b; Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2017), it is not yet clear if they are functional and what is their relative role in the bacterial life cycle.

*P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 causes aerial tumors in olive (*Olea europaea*) and is a prominent model for the study of the molecular basis of pathogenicity on woody hosts (Ramos *et al.*, 2012). This strain contains three native PFP plasmids pPsv48A (80 kb), pPsv48B (45 kb) and pPsv48C (42 kb). Plasmid pPsv48A is essential for full virulence, probably because it carries gene *ptz*, which is potentially involved in the biosynthesis of cytokinins (Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Bardaji *et al.*, 2011b); likewise, pPsv48B carries the effector gene *hopAO1*, contributing to fitness and virulence in olive plants (Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017a). Plasmid pPsv48C also carries a gene potentially involved in cytokinin biosynthesis, gene *idi*, and was shown to be remarkably stable, perhaps because it carries two different replicons (Bardaji *et al.*, 2017a). We were interested in the identification and characterization of the stability determinants of the

plasmid complement of strain NCPPB 3335, to gain insights into the mechanisms allowing the coexistence of PFP plasmids and the dynamics of virulence genes, as well as to develop better strategies to obtain plasmid-cured strains. In this work we determined that the stability of plasmids pPsv48A and pPsv48C is modulated by diverse mechanisms. The presence of two replicons in pPsv48C contributes to its very high stability, whereas three TA systems in both plasmids A and C are necessary to avoid the occurrence of high frequency deletions and rearrangements mediated by IS801 isoforms and MITE*Psy2*. The TA systems also favored the maintenance in pPsv48C of the virulence gene *idi*, potentially involved in the biosynthesis of cytokinins, while outside the plant. Together, our results indicate that maintenance of pathogenicity genes in bacterial populations of *P. syringae* results from the combination of diverse antagonistic evolutionary forces that are unrelated and independent of the pathogenicity process.

## Results

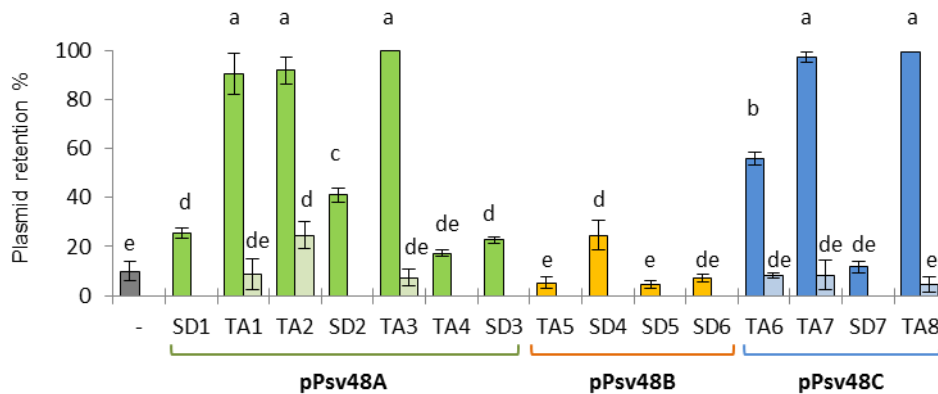
### Identification of functional stability determinants in the three native plasmids.

We selected 28 coding sequences from pPsv48A, pPsv48B and pPsv48C that could be involved in plasmid maintenance (Table 1). Some of these were considered to be TA systems (operons named TA1 to TA8) because of their homology to other TA genes and/or presence of typical protein domains in at least one of the two components of the operon (Table 1); the remaining determinants were designated as stability determinants SD1 to SD7. All these were then cloned into pKMAG-C either individually or in pairs, when suspected to form an operon, and the stability conferred to the vector assayed in *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Fig. 1).

Among the seven determinants tested from plasmid pPsv48A (Table 1), we identified four putative determinants that significantly increased stability of pKMAG-C (Fig. 1). Three of these belong to putative TA systems and, as expected, conferred very high levels of stability only when cloned complete, but not when the putative antitoxin was cloned by itself (Fig. 1). System TA3 is widespread in pseudomonads (e.g., Hanekamp *et al.*, 1997; Buell *et al.*, 2003; Joardar *et al.*, 2005) and appears to be an operon of the TA genes *stbCB* plus the putative resolvase *stbA* (Table 1). A construct containing operon *stbCBA* conferred equal high levels of stability as another construct with only genes *stbCB* (Fig. 1); therefore, we evaluated the possible contribution of *stbA* to stability by cloning it separately. However, *stbA* is the last CDS in the *stbCBA* operon and predictably lacks a promoter; in consequence, we tested functionality of the *stbA*



allele PSPPH\_A0042, which is the first CDS of another putative operon (system SD2 in Fig. 1). Operon SD2 also significantly increased stability of pKMAG, likely through resolution of plasmid multimers by the StbA resolvase (Sengupta and Austin, 2011), suggesting that operon *stbCBA* might contribute to stability through different mechanisms.



**Figure 1. Functional analysis of putative stability determinants from the three native plasmids of *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.** Bars indicate the average percentage of *P. syringae* pv. *syringae* B728a cells retaining pKMAG-C (-) or the indicated putative stability determinants cloned into pKMAG-C (see Table 1 for abbreviations). For TA systems leading to at least a 50 % of plasmid retention, we show to their right the stability conferred by the corresponding antitoxin cloned in pKMAG-C, conferring each construct. Largest bar for system TA3 of pPsv48A corresponds to operon *stbCB*, which gave the same plasmid retention percentage as the cloned *stbCBA* operon. Bars topped with different letters indicate means that are significantly different according to a two-way ANOVA ( $P < 0.01$ ) followed by Tukey's test.

None of the four systems from pPsv48B evaluated here (Table 1) appeared to contribute to plasmid stability (Fig. 1). This was unexpected because low-copy number plasmids usually carry diverse maintenance determinants (Nordström and Austin, 1989); nevertheless, it is possible that this plasmid contains stability genes that were not included or whose activity was not detected in our functional assays.

Three out of the four systems tested from pPsv48C (Table 1) contributed to plasmid stability. These three determinants are also identified as TA systems and, again, the putative antitoxins did not confer any stability by themselves (Fig. 1). Remarkably, system TA6 conferred significantly lower stability levels than the other two systems.

### The two replicons from pPsv48C confer distinct stability.

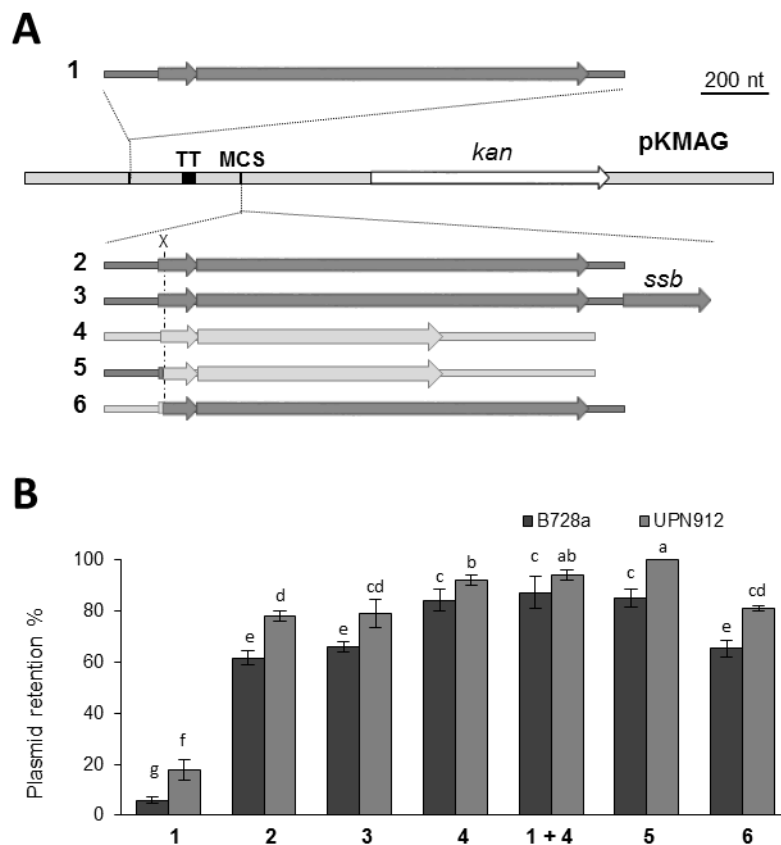
We were interested on the basis for the very high stability of plasmid pPsv48C and, thus, also wanted to evaluate the contribution of the RepA-PFP and RepJ replicons to its maintenance. For this, we cloned them together and separately into the *E. coli* vector pKMAG and evaluated their stability into the plasmidless strain *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Fig. 2).

**Table 1.** Putative stability determinants identified in the three native plasmids of *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335.

Abbreviation	Locus Tag	Deduced product (InterPro family)
<b>pPsv48A</b>		
SD1	PSPSV_A0015	ribbon-helix-helix protein, CopG family
	PSPSV_A0016	putative partition protein A
TA1	PSPSV_A0019	putative toxin of the YafQ-DinJ toxin-antitoxin system, addiction module toxin, RelE/StbE family
	PSPSV_A0020	putative addiction module antitoxin, RelB/DinJ family protein
TA2	PSPSV_A0031	putative plasmid stabilization system protein; RelE/ParE toxin family
	PSPSV_A0032	predicted transcriptional regulator, ribbon-helix-helix protein, CopG
SD2	PSPSV_A0041	MvaT-like transcriptional regulator
	PSPSV_A0042	StbA, putative stability/partitioning determinant, resolvase
TA3	PSPSV_A0043 <sup>a</sup>	StbC, Arc-type ribbon-helix-helix protein, putative antitoxin (IPR013321)
	PSPSV_A0044 <sup>a</sup>	StbB, putative ribonuclease of the VapC family (IPR022907)
	PSPSV_A0045 <sup>a</sup>	StbA, resolvase (IPR006119, IPR006120)
TA4	PSPSV_A0050	Toxin-antitoxin system, RelE/ParE toxin family (IPR007712)
	PSPSV_A0051	putative RelB/DinJ family addiction module antitoxin (no domain)
SD3	PSPSV_A0067	Putative transcriptional regulator; CopG/Arc/MetJ DNA-binding domain-containing protein, possibly responsible for the regulation of plasmid copy number
<b>pPsv48B</b>		
TA5	PSPSV_B0011	putative mazf-like toxin, <i>ccdB</i> family
	PSPSV_B0012	hypothetical protein, putative plasmid maintenance component
SD4	PSPSV_B0013	parA/yafB type stability/partitioning protein, cobyrinic acid ac-diamide synthase
	PSPSV_B0014	stability/partitioning protein
SD5	PSPSV_B0038	IncN plasmid killer protein
SD6	PSPSV_B0042	putative stability/partitioning determinant
	PSPSV_B0043	hypothetical protein
<b>pPsv48C</b>		
TA6	PSPSV_C0003	putative antitoxin (no domains)
	PSPSV_C0004	putative addiction module toxin, RelE/ParE toxin family (IPR007712)
TA7	PSPSV_C0007	putative addiction module toxin, plasmid stabilization protein
	PSPSV_C0008	putative CopG family transcriptional regulator
SD7	PSPSV_C0017	putative ParA family protein
TA8	PSPSV_C0050	putative antitoxin (no domains)
	PSPSV_C0051	putative addiction module toxin, RelE/ParE toxin family (IPR007712)

<sup>a</sup> Genes PSPSV\_A0043/44/45 are 100% identical to genes PSPSV\_A0007/8/9, respectively.

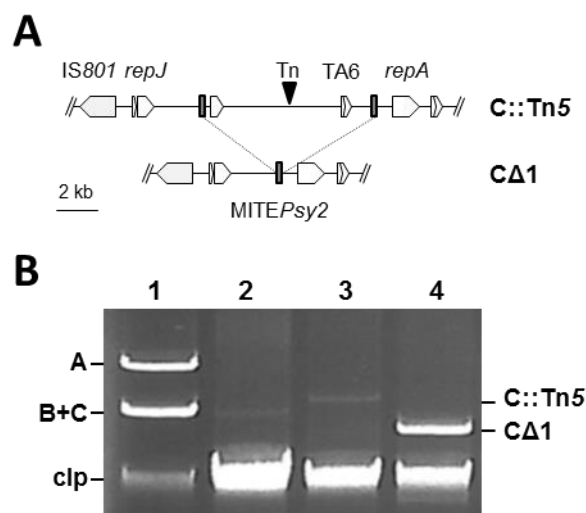
Construct pKMAG-C (Bardaji *et al.*, 2017a), containing the RepA-PFP replicon cloned outside the polylinker of the vector, was highly unstable and was nearly completely lost after only one night of growth in the absence of selection (Fig. 2). However, cloning this replicon after the transcription terminator of pKMAG significantly increased stability to  $62 \pm 3\%$ , which was not further increased in a clone containing the *ssb* gene that often accompanies these type of replicons (Fig. 2)(Stavrinos and Guttman, 2004; Sundin *et al.*, 2004; Bardaji *et al.*, 2011b). Likewise, the construct containing the RepJ replicon was quite stable and only an average of 15% of the B728a colonies tested had lost the plasmid in the test conditions (Fig. 2). The stability provided by these replicons was not additive, because a construct containing both the RepA-PFP and the RepJ replicons showed stability values that were not significantly different from the construct containing only the RepJ replicon (Fig. 2).



**Figure 2. Stability of constructs containing the native RepA-PFP and RepJ replicons from pPsv48C, and their chimeras.** **A)** Fragments of the RepA-PFP (dark grey) or RepJ (light grey) replicons cloned in the indicated positions of the *E. coli* vector pKMAG; the small and large arrows represent the leader peptide and the replication initiator genes, respectively. Fragments 5 and 6 are chimeras of the control and replication fragments of both replicons. TT, T4 transcription terminator; MCS, multiple cloning site; *kan*, kanamycin resistance gene. **B)** Bars indicate the average percentage of *P. syringae* pv. *syringae* B728a cells retaining each construct. Plasmid constructs are pKMAG containing the replicon fragments indicated by numbers in the X axis (see panel A). Bars topped with different letters indicate means that are significantly different according to a two-way ANOVA ( $P < 0.01$ ) followed by Tukey's test.

The RepA-PFP and RepJ replicons share very similar, but not identical control regions preceding the Rep gene (Bardaji *et al.*, 2017a) and it is feasible that their differences could potentially influence replicon stability. We therefore evaluated the stability of constructs containing chimeric replicons, in which the replication control region (Rex-C module) has been reciprocally swapped between the RepA-PFP and the RepJ replicons (Bardaji *et al.*, 2017a). This showed that the highest stability in UPN912, but not in strain B728a, was reached with the chimera RepA-PFP:RepJ (control:*rep* gene; Fig. 2) and indicates that stability is mostly dependent on the activity of each Rep protein, but it can be modulated by the replication control module (Fig. 2).

Strain UPN912 derives from NCPPB 3335 and is cured of its three native plasmids. Noticeably, all the assayed constructs were significantly more stable in strain UPN912 than in B728a (Fig. 2), suggesting that these replicons are adapted to the bacterial host in which they occur naturally to maximize their survival.



**Figure 3. Recombination between two copies of MITEPsy2 causes an 8.3 kb deletion on pPsv48C. A)** Partial map, drawn to scale, of pPsv48C::Tn5-GDYN1 (C::Tn5) showing the relative positions of its only copy of the IS801 isoform, its two replicons (*repJ* and *repA*), and the toxin-antitoxin system 6 (TA6). Small dark rectangles denote the two copies, in direct orientation, of MITEPsy2; the inverted black triangle denotes Tn5-GDYN1. CΔ1 is pPsv48CΔ1, containing an 8.3 kb deletion after recombination between the two copies of MITEPsy2. **B)** Representative gel electrophoresis of uncut plasmid preparations from: (1) the wild type strain *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335, containing the three native plasmids pPsv48A (A), pPsv48B (B) and pPsv48C (C); (2) Psv48ΔAB, containing only pPsv48C; (3) UPN827, containing only pPsv48C::Tn5-GDYN1 (C::Tn5), and (4) UPN864, containing pPsv48CΔ1 (CΔ1). Clp, chromosomal DNA and linearized plasmids. Equivalent amounts of purified plasmid DNA were loaded per gel lane.

Additionally, we were able to observe significant values of plasmid loss even though the assay evaluates stability after only one night of bacterial growth, indicating that we did not clone all the replicon sequences needed for stable replication and/or that plasmid

pPsv48C must use alternative mechanisms to attain its outstanding high stability (Bardaji *et al.*, 2011b).

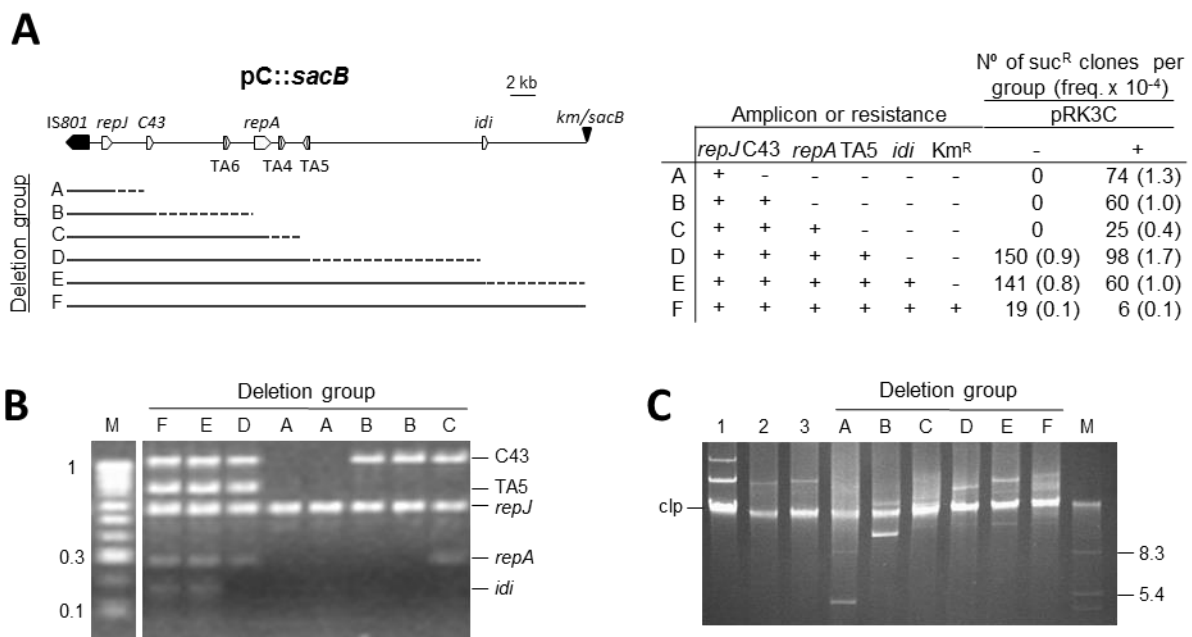
### **A toxin-antitoxin system prevents a deletion in pPsv48C mediated by MITEs.**

We initially sought to obtain derivatives of NCPPB 3335 cured of plasmid pPsv48C, as well as to evaluate the contribution of its three TA systems to stability. For this, we constructed strain UPN827, containing a transposon carrying the *sacB* gene (Tn5-GDYN1) inserted into pPsv48C (Fig. 3; Table S1); this allowed us to easily select for plasmid loss by growth in the presence of sucrose (Flores *et al.*, 1993). To facilitate plasmid loss, we introduced into UPN827 the construct pRK3C, containing the three antitoxins from pPsv48C cloned in tandem behind the  $P_{lac}$  promoter in pRK415 (Table S1).

After plating in medium SNA, we routinely obtained 50 times more sucrose-resistant colonies with strain UPN827(pRK3C) ( $38 \pm 3 \cdot 10^{-4}$  suc<sup>R</sup> colonies) than with its parental strain UPN827 ( $0.8 \pm 0.4 \cdot 10^{-4}$  suc<sup>R</sup> colonies). All of the suc<sup>R</sup> colonies examined contained an 8.3 kb deletion in pPsv48C caused by recombination between two direct copies of MITE $\Psi$ 2 flanking the transposon insertion site (Fig. 3A), thus eliminating the *sacB* transposon Tn5-GDYN1; one of these plasmids was retained and designated pPsv48C $\Delta$ 1 (Fig. 3A). In plasmid profile gels of the wild type strain NCPPB 3335, pPsv48C routinely appears with lower intensity than the other two native plasmids bands (Bardaji *et al.*, 2011b) (Fig. 3B). Remarkably, bands of plasmid pPsv48C $\Delta$ 1 were repetitively more intense than those of the wild type plasmid or of pPsv48C::Tn5-GDYN1 (Fig. 3A), suggesting that plasmids suffering the 8.3 kb deletion replicate with a higher copy number. As expected for medium-size native plasmids (Summers, 1996), we estimated a low copy number for plasmids pPsv48A ( $8.0 \pm 1.0$ ), pPsv48B ( $8.6 \pm 1.6$ ) and pPsv48C ( $6.6 \pm 1.2$ ), with no significant differences among them. Contrarily to our expectations, the estimated copy number of pPsv48C $\Delta$ 1 ( $6.9 \pm 0.8$ ) was not significantly different from that of pPsv48C. These results indicate that each of the three native plasmids from strain NCPPB 3335 exist in 6-9 copies per cell, and that the 8.3 kb fragment from pPsv48C does not carry any determinant involved in copy number control.

## Toxin-antitoxin systems from pPsv48C prevent accumulation of plasmid deletions mediated by IS801.

Our preliminary experiments (not shown) soon indicated that inactivation of the three TA systems of pPsv48C did not facilitate the isolation of plasmid-cured strains but, instead, lead to the recovery of deletion derivatives generated by the one-ended transposition of an IS801 isoform (Bardaji *et al.*, 2011b). Therefore, strain UPN1007 was used to better estimate the frequency of the different deletions and the possible effect of the three TA systems of pPsv48C on their generation (Fig. 4). This strain carries plasmid pPsv48C::*sacB*, derived from pPsv48C by insertion of a Km<sup>R</sup>-*sacB* cassette immediately preceding the only IS801 copy of pPsv48C (Fig. 4 and Table S1); thus, the selection of suc<sup>R</sup> colonies would allow for the identification and quantification of deletions of all sizes mediated by one-ended transposition events of IS801.



**Figure 4. Frequency and types of deletions occurring on pPsv48C::sacB as influenced by functional toxin-antitoxin systems.**

**A)** Left: Map of pPsv48C::*sacB* (C::*sacB*) showing the position of relevant determinants; see Table 1 for the genes corresponding to the toxin-antitoxin systems TA4, TA5 and TA6; C43 is locus PPSV\_C0043; the inverted triangle shows the position of the Km<sup>R</sup>-*sacB* cassette cloned 0.1 kb before the IS801 isoform. Lines under the map indicate the minimal (black line) and maximal (dotted line) extent of deletions on each group of suc<sup>R</sup> plasmids derived from pPsv48C::*sacB*. Right: Presence (+) or absence (-) of specific amplicons for each of the genes shown, or of resistance to kanamycin. Last two columns indicate the number (and percentage) of suc<sup>R</sup> clones from strains UPN1007 and UPN1007(pRK3C) containing deletions of each group. Gel electrophoresis showing typical patterns of multiplex PCR amplifications (**B**) and uncut plasmids (**C**) of clones from each deletion group. M, molecular weight markers, in kb; clp, chromosomal DNA and high-molecular-weight multimers and linearized plasmids. Lanes: (1) *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335; (2) Psv48ΔAB, containing only pPsv48C, and (3) UPN864, containing only pPsv48C::*sacB*.

The frequency of  $\text{suc}^R$  colonies was  $1.8 \pm 0.7 \times 10^{-4}$  for UPN1007 containing the empty vector but of  $5.5 \pm 2.1 \times 10^{-4}$  for strain UPN1007(pRK3C), in which the three TA systems are functionally inactivated with the cloned antitoxins from pPsv48C (Table S1). The plasmid profile and PCR analyses of more than 700 independent clones, plus sequencing of 13 of them, indicated that none of them had lost pPsv48C but showed a plasmid band of *ca.* 4 to 42 kb resulting from deletions of variable size in this plasmid. All deletion derivatives contained IS801 and *repJ* (Fig. 4), and sequencing showed that all had a common left end corresponding to position 27,019 of pPsv48C (accession no. FR820587) (Fig. 2B). This position corresponds to the 3' end of IS801, which contains the *ori801* and initiates the rolling-circle transposition of this element (Garcillán-Barcia *et al.*, 2002). The left border of the deletions was GAAC (5 clones) or CAAG (8 clones), which were already described as consensus tetramers immediately adjacent to insertions of IS801 and places for one-ended transposition events (Richter *et al.*, 1998; Bardaji *et al.*, 2011a).

The extent and frequency of deletions generated in pPsv48C by one-ended transposition of IS801, both in UPN1007 and in UPN1007 (pRK3C), was evaluated in clones growing in SNA by a multiplex PCR analysis (Fig. 4); additionally, loss of kanamycin resistance estimated loss of the Km-*sacB* cassette in the largest deletions. Strain UPN1007 contains functional TA systems and the resulting 310  $\text{suc}^R$  clones examined contained derivatives of pPsv48C with deletions of variable sizes of not less than approximately 22 kb (Fig. 4A). All of these clones retained the three TA operons (TA4-6) and, consequently, the RepA replicon (Fig. 4A). Around half of the clones had lost gene *idi*, indicating the spontaneous loss of this gene in cultured bacteria with a frequency of  $0.9 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ . The types of deletions were more varied in  $\text{suc}^R$  clones of UPN1007(pRK3C), containing functionally inactivated TA systems, with nearly half of the clones losing the RepA replicon and around 80 % ( $4.4 \pm 1.9 \times 10^{-4}$ ) of them lacking gene *idi* (Fig. 4). Remarkably, IS801 was able to transpose the complete length of pPsv48C in both strains (deletion group F in Fig. 4), although at a low frequency of around  $10^{-5}$ , suggesting that IS801 is potentially capable of mobilizing at least 40 kb of adjacent DNA. Incidentally, the generation of circular deletion variants of pPsv48C mediated by IS801 also indicates that, as predicted (Richter *et al.*, 1998), this element transposes by a rolling circle mechanism.



### Toxin-antitoxin systems also reduce the loss of plasmid pPsv48A and the occurrence of deletions.

Since IS801 is pervasive in *P. syringae* genomes, we wanted to know if deletions mediated by this element also occurred in other plasmids and whether or not TA systems are also contributing to reduce the occurrence of plasmid reorganizations. For this, we used strain UPN508, a derivative of strain NCPPB 3335 containing plasmid pPsv48A with an insertion of Tn5-GDYN1 (Bardaji *et al.*, 2017a) located 1.9 kb 3' of gene *repA* and between two of the five copies of the IS801 isoform. The fact that pPsv48A contains only one replicon and that the *sacB* gene is situated between two copies of IS801, limits the types and sizes of deletions that we can detect, although the experimental setting still allows us to evaluate the possible occurrence of deletions.

**Table 2.** Type and frequency of sucrose-resistant derivatives of pPsv48A::Tn5-GDYN1 in the presence or absence of functional toxin-antitoxin systems.

Size (kb) <sup>a</sup>	Number of suc <sup>R</sup> clones (freq. × 10 <sup>-4</sup> ) <sup>b</sup>			Deletion resulting from
	UPN508	UPN508(pRK3A)	<i>ptz</i> <sup>c</sup>	
- (cured)	2 (0.01)	110 (1.32)	-	
57	1 (0.01)	38 (0.46)	+	Recombination <sup>d</sup>
70	16 (0.09)	4 (0.05)	+	Reorganizations <sup>e</sup>
76	251 (1.42)	111 (1.34)	+	Recombination? <sup>f</sup>
89	9 (0.02)	2 (0.01)	+	Spontaneous mutation in <i>sacB</i>
>90	3 (0.05)	1 (0.02)	+	Reorganizations <sup>g</sup>
Total	282	266		

<sup>a</sup> Approximate size of the deletion derivative. Total size of pPsv48A::Tn5-GDYN1 is around 89 kb.

<sup>b</sup> Strain UPN508 contains pPsv48A::Tn5-GDYN1, with functional TA systems. The three TA systems of this plasmid are functionally inactivated in the presence of pRK3A, containing the three cloned antitoxins from pPsv48A.

<sup>c</sup> Presence (+) or absence (-) of the virulence gene *ptz*, for cytokinin biosynthesis, in the resulting deletion derivatives.

<sup>d</sup> Recombination between IS801-1 and IS801-4.

<sup>e</sup> Diverse group of clones with different, uncharacterized intramolecular reorganizations.

<sup>f</sup> The sequence of five clones confirmed that they resulted from recombination between IS801-1 and IS801-2, but we cannot discard the possibility that some or all of the remaining clones resulted from a transposition of IS801-2.

<sup>g</sup> These plasmids appeared to result from a transposition of IS801-2, precisely ending at the end of IS801-2 as determined by sequencing, that eliminate Tn5-GDYN1. According to their relative size on plasmid profile gels, these plasmids must contain an uncharacterized insertion.

Strain UPN508(pRK415) generated suc<sup>R</sup> clones with a frequency of  $1.1 \pm 0.8 \times 10^{-4}$ .

4. From 282 of these suc<sup>R</sup> clones, plasmid pPsv48A::Tn5-GDYN1 was lost in two clones,



it contained spontaneous mutations inactivating gene *sacB* in nine clones, and was reorganized or contained deletions in the remaining clones (Table 2). The majority of the *suc*<sup>R</sup> clones, around 90 % of the total, contained derivatives of ca. 76 kb; sequencing of three of these clones showed that they resulted from recombination between the two isoforms of *IS801* adjacent to *repA*, effectively eliminating Tn5-GDYN1 (Table 2). Functional inactivation of the three TA systems in strain UPN508(pRK3A) lead to only a modest increase of the frequency of *suc*<sup>R</sup> clones to  $3.6 \pm 1.5 \times 10^{-4}$ , but to a dramatic change on the plasmid content of these clones (Table 2). The first difference was that around 40 % of the 266 *suc*<sup>R</sup> clones analysed had lost pPsv48A, corresponding to a frequency of plasmid loss of around  $1.3 \times 10^{-4}$  and two orders of magnitude higher than that in UPN508 (Table 2). The second difference was that the pPsv48A::Tn5-GDYN1 deletion derivatives of approx. 57 kb, all of which were confirmed by PCR to have lost system TA1, appeared with a frequency more than 40 times higher than in strain UPN508 (Table 2). The frequency of occurrence of the other reorganizations observed in pPsv48A (Table 2) were roughly the same in both strains

## Discussion

Here we show that the three virulence native plasmids from *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 use diverse mechanisms to attain their high stability. The presence of two replicons in pPsv48C contributes to its very high stability, whereas three TA systems in both plasmids A and C are necessary to avoid the occurrence of high frequency deletions and rearrangements mediated by *IS801* isoforms and MITE*Psy2*. On the other hand, none of the determinants identified in plasmid pPsv48B (Table 1) conferred high levels of stability in our assays. This is remarkable because plasmids with less than 10 copies per cell must use active maintenance mechanisms to avoid being loss by random segregation (Summers, 1996), and suggests that our assays were not sensitive enough or that this plasmid uses different mechanisms for its maintenance.

The three native plasmids from strain NCPPB 3335 are maintained at a low copy number of 6-8 copies per cell, as determined by qPCR. Previous results suggested that pPsv48C was maintained at lower copy numbers than the other two plasmids, based on the intensity of plasmid bands after electrophoresis in agarose gels (Fig. 3B) (Bardaji *et al.*, 2011b). This technique has been traditionally used to estimate plasmids copy number (Friehs, 2004), although it has been replaced by the most sensitive, precise and cost-effective technique of qPCR (Providenti *et al.*, 2006). We used an alkaline lysis

procedure for plasmid purification, and it is possible that structural differences among the plasmids could differentially impact their ability to fully reassociate during purification. Nevertheless, our results questions the use of agarose gel electrophoresis to estimate relative plasmid DNA quantities concentrations using methodologies similar to the ones used in this work.

Plasmid pPsv48C is noteworthy in that it contains two functional replicons, the RepA-PFP and the RepJ replicons (Bardaji *et al.*, 2017a). While the cloned RepA-PFP replicon appears to be somewhat unstable (Fig. 2), the RepJ replicon was significantly more stable (Fig. 2), the cloned RepJ replicon was lost from approximately 15 % of the clones when transformed into strain *P. syringae* pv. *syringae* B728a, but only from an average 8 % from clones of *P. syringae* pv. *savastanoi* UPN912. Additionally, a 5.5 kb plasmid resulting from an one-ended transposition of IS801 and containing *repJ*, but none of the identified stability determinants, was retained by 100 % of the UPN912 cells after five days of continuous subculturing in liquid medium; however, the RepJ replicon cloned in pKMAG was retained by only 67 % of the clones in these conditions (M. Echevarría, unpublished data). This suggest that in our assays we used a RepJ replicon lacking some sequences that are needed to confer full functionality, and that the wild type RepJ replicon is probably responsible for the remarkably high stability of pPsv48C. We also repetitively observed a significantly higher stability of the cloned replicons when assayed in derivatives of the parental strain NCPPB 3335 than in strain B728a. This indicates that both replicons are maximizing their stability by adaptation to the host cell, as it occurs in other bacterium-plasmid combinations (Dahlberg and Chao, 2003; Harrison and Brockhurst, 2012). However, the diminished stability in a new host might reduce the opportunities for the horizontal transfer of PFP plasmids among *P. syringae* populations (Porse *et al.*, 2016), particularly if they have to compete with other PFP plasmids showing varying degrees of incompatibility with the incoming plasmid (Sesma *et al.*, 1998). The existence of native plasmids with two replicons has not been described previously in *P. syringae*, although the RepJ replicon is present in the draft genomes of many diverse pathovars of *P. syringae* (Bardaji *et al.*, 2017a). Additionally, a Blastn analysis indicates that plasmids p58T2 (accession no. LT222314), from *Pseudomonas* sp. 58 isolated from sour cherry, and pPMA4326 (accession no. NC\_005918), from *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326, also contain the RepA-PFP and the RepJ replicons, although gene *repJ* is truncated in pPMA4326. Incidentally, the automatic annotation of the *repJ* gene was not related to replication and was only identified as a replication initiator gene after functional analyses (Bardaji *et al.*, 2011b; Bardaji *et al.*, 2017a); indeed, bioinformatics analyses did not find any identifiable replicon in in the complete

sequence of plasmids pPMA4326D and pPMA4326E (Stavrínides and Guttman, 2004). It is thus feasible that sequenced plasmids might contain as yet unidentified replicons, or both RepA-PFP and RepJ replicons, and that the existence of plasmids with two replicons in *P. syringae* strains is a frequent phenomenon.

Plasmid pPsv48A appears to only contain a RepA-PFP replicon and it is less stable than pPsv48C, making it possible to readily obtain derivatives of strain NCPPB 3335 cured of this plasmid (Bardaji *et al.*, 2011b). Three of the four TA systems identified in pPsv48A conferred high levels of stability to the unstable shuttle vector pKMG-C (Fig. 1). In agreement with these results, the functional inactivation of the three systems using the cloned antitoxins in plasmid pRK3A, lead to an increase of two orders of magnitude in the loss rate of pPsv48A (Table 2), underscoring the importance of the TA systems in the long-term maintenance of this plasmid. Nevertheless, the presence of three different TA systems do not completely ensure the maintenance of pPsv48A, which is lost with a low but detectable frequency (Bardaji *et al.*, 2011b); although the operon *stbCBA* is in two nearly identical copies, the first operon (PSPSV\_A0009-0007) is probably inactive because of an insertion of an IS801 isoform between the promoter and the start of *stbC*. This plasmid might have therefore accumulated multiple TA systems, working additively and redundantly, in order to increase its persistence in the bacterial populations. However, we cannot discount alternative explanations because TA systems are apparently selfish entities that are difficult to eliminate once acquired, creating addiction (Van Melderen and Saavedra De Bast, 2009); moreover, they might also contribute to the exclusion of competing plasmids acquired by horizontal exchange (Cooper and Heinemann, 2000a). pPsv48A also carries three copies of a putative resolvase gene, *stbA*, one of which significantly increased the maintenance of pKMG-C (Fig. 1), likely contributing additively to the stability of this native plasmid. Gene *stbA* is widely distributed in *P. syringae* (e.g., Hanekamp *et al.*, 1997; Stavrínides and Guttman, 2004), and is likely a common maintenance determinant in PFP plasmids.

Native plasmids of strain NCPPB 3335 showed to be structurally very fragile, because they are subjected to high frequency intramolecular deletions and reorganizations which were most frequently promoted by MITEPsy2 and IS801. The two copies of MITEPsy2 present in pPsv48C recombined with a very high frequency of around  $4 \times 10^{-3}$ , causing the deletion of an 8.3 kb DNA fragment (Fig. 3A). This fragment contains a putative RelB/ParE family TA system (TA8 in Table 1), homologous to the TA6 system also carried by pPsv48C (Table 1), although in our assays it conferred higher levels of stability (Fig. 1); indeed, TA8 caused a reduction of 50 times in the frequency of deletions mediated by MITEPsy2. The 228 nt element MITEPsy2 is present in at least

one copy in the three native plasmids of strain NCPPB 3335 (Bardaji *et al.*, 2011b), as well as in the genome of *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (Bardaji *et al.*, 2011a) and those of many pathovars of the *P. syringae* complex. Although in previous assays we could not detect the transposition of MITE $P_{\text{sy}2}$  in strain 1448A (Bardaji *et al.*, 2011a), our results indicate that this element still has the potential to cause frequent deletions and reorganizations in strains of the *P. syringae* complex.

Plasmids pPsv48A and pPsv48C contain 4 and 1 copies, respectively, of the IS801 isoform CRR1 (Bardaji *et al.*, 2011b). This element is nearly identical to IS801, but contains an insertion of 365 nt, causing a deletion of 112 nt that overlaps the promoter and start of the transposase gene, potentially inactivating it (see Fig. 5, Capítulo 1). Nevertheless, the terminal recognition sites for transposition, *ori801* and *ter801*, appear to be intact (Garcillán-Barcia *et al.*, 2002), which will allow for CRR1 transposition by an IS801 transposase supplied *in trans* by a functional copy in the bacterial chromosome (Richter *et al.*, 1998). Indeed, we observed the occurrence of frequent one-ended transposition events of CRR1 from pPsv48C, of up to  $5.5 \pm 2.1 \times 10^{-4}$  when the TA systems of this plasmid were functionally inactivated (Fig. 4). In these transpositions, CRR1 did not efficiently recognize *ter801*, perhaps because it only spans the last 26 nt of the native element, and continued transposition until it encountered a compatible ending site containing variations of the tetranucleotide GAAC (Richter *et al.*, 1998; Bardaji *et al.*, 2011a). The fragments resulting from one-ended transposition could immediately establish as independent plasmids because the RepJ replicon is immediately adjacent to CRR1 in pPsv48C (Fig. 4); this would effectively result in the generation of derivatives of pPsv48C with deletions of diverse size (Fig. 4). Incidentally, our results also indicate that IS801 isoforms can transpose up to at least 42 kb of adjacent DNA. The TA systems present in pPsv48C reduced the occurrence of deletions mediated by the IS801 isoform by a factor of 3 (Fig. 4), indicating that they are only moderately effective. However, it is noteworthy that the majority of the deletions occurring in the absence of the TA systems in strain UPN1007(pRK3C) lead to the loss of the virulence gene *idi* (Fig. 4), potentially involved in the biosynthesis of cytokinins (see Capítulo 4). However, the loss of gene *idi* by one-ended transposition of CRR1 occurred with a frequency approximately 5 times lower in strain UPN1007, where the three TA systems of pPsv48C are functional. A similar situation was observed with plasmid pPsv48A, where the functional inactivation of the three TA systems led to an increase of 3 times in the frequency of plasmid curing and occurrence of deletions and rearrangements. However, we have to take into account that the insertion of the *sacB* transposon between two direct copies of CRR1 situated after the RepA-PFP replicon,

greatly limits the amount and diversity of possible pPsv48A variants recovered. This, of course, potentially results in an underestimation of the actual frequency of deletions promoted by the IS801 isoform. Nevertheless, these results highlight the contribution of multiple TA systems for the maintenance of pPsv48A, which increase by two orders of magnitude the stability of this plasmid and, hence, the maintenance of the virulence gene *ptz* (Table 2). Taken together, our results indicate that plasmids of *P. syringae* are subjected to frequent reorganization events that are countered by the presence in plasmids of multiple TA systems, which also increase the frequency of retention of important virulence genes in the absence of selection for their activity. Additionally, these TA systems also provide a significantly higher plasmid stability, ensuring a continued vertical inheritance of important traits for the bacterial life cycle.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions.

Table S1 summarizes strains, native plasmids and constructions used in this study. LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) was routinely used for growing both *E. coli* (at 37 °C) and *Pseudomonas* strains (at 25 °C). Counterselection of cells carrying the *sacB* gene, which confers lethality in the presence of sucrose, was done in nutrient agar medium (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 5 % sucrose (medium SNA). When necessary, and unless otherwise indicated, media were supplemented with (final concentrations, in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ): ampicillin, 100; gentamicin, 12.5; kanamycin, 5 for *P. syringae* and 50 for *E. coli*; tetracycline, 12.5.

### General molecular procedures and bioinformatics.

DNA was amplified using a high fidelity enzyme (PrimeStar HS, Takara Bio Inc., Japan), or a standard enzyme (BIOTaq, Bionline, UK), using primers detailed in Table S2, and cloned using the CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) or the pGEM-T Easy Vector System (Promega). Purification of plasmids from *E. coli* was done following a boiling method (Holmes and Quigley, 1981b) or using a commercial kit (Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare). For plasmid profile gels, DNA was purified by alkaline lysis and separated by electrophoresis in 0.8 % agarose gels with 1xTAE as described (Murillo *et al.*, 1994). Plasmids were transferred to *P. syringae* by electroporation (Choi *et al.*, 2006).

DNA sequences were compared and aligned using the BLAST algorithms (Hubbard *et al.*, 2008), as well as the on-line MULTALIN (Corpet, 1988) and EMBL-EBI server tools (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Search for protein motifs was done using the InterPro

interface (Mitchell *et al.*, 2015) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Nucleotide sequence visualization and manipulation was done using the Artemis genome browser and ACT (Carver *et al.*, 2008). Primers were designed using the Primer3plus software (Untergasser *et al.*, 2012).

### **Manipulation of native plasmids of *P. syringae* pv. *savastanoi*.**

Native plasmids of *P. syringae* pv. *savastanoi* were tagged with Tn5-GDYN1 by conjugation using *E. coli* S17.1 as a donor; this transposon carries the levansucrase gene *sacB*, which allows for the selection of derivatives cured of plasmids by selection in medium with sucrose (Flores *et al.*, 1993; Bardaji *et al.*, 2011b). Sites of Tn5-GDYN1 insertion were determined by sequencing of cloned EcoRI fragments containing the Gm<sup>R</sup> end of the transposon and the adjacent sequences using primer IS50\_F (Table S2).

We constructed a derivative of pPsv48C containing a Km<sup>R</sup>-*sacB* cassette immediately 5' of the IS801 isoform (100 nt upstream), as a tool to analyze the diverse deletions generated by the activity of this mobile element. The Km<sup>R</sup>-*sacB* cassette was amplified from pK18mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) by PCR with specific primers (Table S2), and introduced into an EcoRV site of pPsv48C (position 26,919 in accession no. FR820587) by allelic exchange recombination.

### **Estimation of plasmid copy number.**

Plasmid copy number (PCN) was estimated by quantitative PCR (qPCR) using total DNA as template, which was purified with the JET flex Genomic DNA Purification Kit (Genomed). qPCR was performed using the CX96™ Real-Time System and analyzed using CFX Manager software version 3.0 (BioRad), essentially as described (Matas *et al.*, 2014). A ten-fold serial dilution series of DNA was used to construct the standard curve for the single-copy chromosomal gene *gyrA*, used as reference (Matas *et al.*, 2014), and the plasmids genes *ptz* (PSPSV\_A0024; pPsv48A), *hopAO1* (PSPSV\_B0010, pPsv48B) and *idi* (PSPSV\_C0024, pPsv48C), using the primers indicated in Table S2. The PCN was determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak and Schmittgen, 2001), where  $\Delta C_t$  is defined as the  $C_t$  value of the gene of interest subtracted from the  $C_t$  of the reference gene (*gyrA*). The  $\Delta\Delta C_t$  values were then converted to absolute values by utilizing the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Rotenberg *et al.*, 2006) (Tao *et al.*, 2006).

### **Identification of putative plasmid stability determinants.**

For identification of putative stability determinants from plasmids pPsv48A (FR820585), pPsv48B (FR820586) and pPsv48C (FR820587), we manually inspected the annotation



of the three plasmids and searched for CDSs whose annotation contained terms (stability, partition and related forms) or whose products contained typical domains associated to plasmid maintenance. Additionally, we selected putative toxin-antitoxin operons with a significant score (higher than 70) in the web tool RASTA-bacteria (Sevin and Barloy-Hubler, 2007). The complete set of loci identified and tested is summarized in Table 1.

### **Replication and stability assays.**

For functional analyses, the putative stability determinants from plasmids A, B and C were amplified by PCR with their own promoters, using specific primers (Table S2), and cloned as BamHI fragments into the polylinker of vector pKMAG-C (Table S1). The stability of these constructions, as well as that of the RepA-PFP and RepJ replicons from the pPsv48C plasmid and previously constructed chimeras (Bardaji *et al.*, 2017a), was tested after transformation into the plasmidless strain *P. syringae* pv. *syringae* B728a, essentially as described (López-Villarejo *et al.*, 2012). Briefly, Psy B728a transformants were grown overnight on LB plates with kanamycin, and twenty colonies per clone were collected and resuspended together in 500 µl of Ringers solution (1/4 strength; Oxoid, Basingstoke, UK). Serial dilutions were then plated on LB agar to get isolated colonies and, once developed, 100 colonies were picked to LB plates with and without kanamycin to determine the percentage of plasmid-containing colonies (Km<sup>R</sup>). The unstable cloning vector pKMAG-C (KX714577), which contains the RepA-PFP replicon cloned outside the polylinker for replication in *Pseudomonas* and which can also replicate in *E. coli*, was also included in the analyses as the baseline reference. Experiments were repeated at least six times, with three technical replicates each for each of the tested clones. Statistical data analysis was performed by ANOVA ( $P \leq 0.05$ ) followed by Tukey's test using R Project 3.3.3 (R Core Team (2017); Vienna, Austria).

### **Inactivation of TA systems and estimation of deletion frequencies**

To evaluate the role of the TA systems on plasmid maintenance, we proceed to their functional inactivation in derivative strains of NCPPB 3335 by supplying *in trans* the cognate antitoxins cloned in the broad-host range vector pRK415 (Table S1; Keen *et al.*, 1988). Antitoxin genes PSPSV\_A0043, PSPSV\_A0032 and PSPSV\_A0020 from pPsv48A were amplified by PCR (Table S2) with their own promoters, cloned into pGEM-T Easy, excised as BamHI, AatI-NcoI, and EcoRI fragments, respectively, and sequentially cloned into the same sites of vector pME6041 (Table S1; Heeb *et al.*, 2000). The three antitoxins cloned in tandem (in the transcriptional order PSPSV\_A0043, PSPSV\_A0032 and PSPSV\_A0020) were amplified with primers A1\_R and TA\_8F

(Table S2) and cloned into the BamHI site of pRK415 in the same transcriptional direction than the  $P_{lac}$  of the vector, resulting in pRK3A. Essentially the same procedure was followed to clone in tandem, and in this order, antitoxin genes PSPSV\_C0051, PSPSV\_C0008 and PSPSV\_C0003 from pPsv48C into the vector pRK415, resulting in pRK3C. The integrity and fidelity of all clones was confirmed by nucleotide sequencing.



## Supplementary material

**Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study.**

Strain/plasmid	Main features	Reference
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
NEB10β	$\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrB)$ <i>deoR recA1 endA1 araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU galK</i> $\lambda^-$ <i>rpsL nupG</i>	(Grant et al., 1990)
S17-1	Strain used to transfer pDR1 plasmid	(Flores M. et al., 1993)
<b><i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i></b>		
NCPPB 3335	Pathotype strain, isolated from a disease olive tree; contains three native plasmids (pPsv48A, pPsv48B and pPsv48C)	NCPPB <sup>a</sup>
UPN508	Derivative of NCPPB 3335 containing pPsv48A::Tn5-GDYN1	(Bardaji et al., 2011b)
Psv48ΔAB	NCPPB 3335 derivative, cured of pPsv48A and pPsv48B	(Bardaji et al., 2011b)
UPN827	Derivative of Psv48ΔAB containing plasmid pPsv48C::Tn5GDYN1-1 instead of pPsv48C.	(Pérez-Martínez, 2007)
UPN864	UPN827 derivative, which contains plasmid pPsv48CΔ1 instead of pPsv48C	This work
UPN1007	UPN629, which contains plasmid pPsv48C::km/ <i>sacB</i> instead of pPsv48C	This work
<b><i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i></b>		
B728a	Plasmidless bean pathogen Cu <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	(Feil et al., 2005b)
<b>Plasmids</b>		
pBlueScript II SK	<i>E. coli</i> cloning vector; 2.96 kb, Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pDR1	Delivery vector for Tn5-GDYN1, based on pSUP2021; Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; confers sucrose-dependent lethality	(Flores et al., 1993)

pGEM-T Easy	<i>E. coli</i> cloning vector; 3 kb, Amp <sup>R</sup>	Promega
pJET1.2	<i>E. coli</i> cloning vector 2.9 kb, Amp <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific
pK184	<i>E. coli</i> cloning vector, 2.4 kb, Km <sup>R</sup> ; accession no. U00800	(Jobling and Holmes, 1990a)
pK18 <i>mobsacB</i>	Mobilizable cloning vector, confers sucrose-dependent lethality; Km <sup>R</sup> , Suc <sup>S</sup>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pKMAG	<i>E. coli</i> vector derived from pK184, devoid of the <i>Plac</i> promoter and containing the transcriptional terminator and polylinker from pME6041; 2.6 kb, Km <sup>R</sup> ; accession no. KX714576	(Bardaji <i>et al.</i> , 2017a)
pKMAG-C	pKMAG containing the minimal RepA-PFP replicon from pPsv48C, replicates in <i>E. coli</i> and in <i>Pseudomonas</i> ; 4.3 kb, Km <sup>R</sup> ; accession no. KX714577	(Bardaji <i>et al.</i> , 2017a)
pME6041	Broad host range cloning vector; 5.6 kb, Km <sup>R</sup>	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)
pPsv48A	Virulence plasmid of NCPPB 3335 (accession n° FR820585); with RepA-PFP replicon; 78 kb	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48A::Tn5-GDYN1	Plasmid pPsv48A tagged with Tn5-GDYN1 at position 1,469	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48B	Native plasmid of NCPPB 3335 (accession no. FR820586); with RepA-PFP replicon; 45 kb	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48C	Virulence plasmid of NCPPB 3335 (accession no. FR820587); with RepA-PFP and RepJ replicons; 42 kb	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48C:: <i>sacB</i>	pPsv48C derivative containing the Km <sup>R</sup> - <i>sacB</i> cassette from pK18 <i>mobsacB</i> inserted at position 26,916; Km <sup>R</sup> , Suc <sup>S</sup>	This work
pPsv48C::Tn5GDYN1	pPsv48C containing Tn5-GDYN1 inserted at position 37,036; Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Suc <sup>S</sup>	This work
pPsv48CΔ1	Derives from pPsv48C::Tn5GDYN1 by the spontaneous deletion of 8.8 kb	This work

---

	(positions 32,807-41,121) mediated by recombination between two copies of MITE $P_{sy2}$	
pRK3A	pRK415 derivative with PSPSV_A0020, -32 and -43 cloned in tandem and preceded by a transcriptional terminator; Tc <sup>R</sup>	This work
pRK3C	pRK415 derivative containing genes PSPSV_C0003, PSPSV_C0008 and PSPSV_C0050 cloned in tandem, each with their own promoter, and preceded by the transcriptional terminator from pME6041; Tc <sup>R</sup>	This work
pRK415	Broad host range cloning vector; 10.5 kb, Tc <sup>R</sup>	(Keen <i>et al.</i> , 1988)

---

<sup>a</sup> National collection of Plant Pathogenic bacteria, York , United Kingdom. <sup>a</sup> NEB, New England Biolabs (Ipswich, MA).

**Table S2:** List of primers used in this work.

Primer name <sup>a</sup>	Sequence <sup>b</sup>	5' position <sup>c</sup>	Remarks
<b>Cloning of putative stability determinants</b>			
<b>pPsv48A</b>			
SD1_F	<u>GGATCC</u> GATGGTAACCGCCAATGTTC	19883*	Cloning of SD1 into pKMAG-C
SD1_R	<u>GGATCC</u> TTCTGGGATTCCGGCTTAC	18511	
TA1_F	<u>GGATCC</u> ACATAGGCTTGCGATTGAGC	22496*	Cloning of TA1 into pKMAG-C
TA1_R	<u>GGATCC</u> TTGATTGCTAATTCCGACACTG	21683	
TA2_F	<u>GGATCC</u> CGTTCTCTATCGGTCTTCG	36225*	Cloning of TA2 into pKMAG-C
TA2_R	<u>GGATCC</u> TTCCATCTCGTTTGCTGATG	35925	
SD2_F	<u>GGATCC</u> ATGCACTTCATCGGGTAGATTTTC	51566*	Cloning of SD2 into pKMAG-C
SD2_R	<u>GGATCC</u> CATGAGCGAAGTGTAGTGACAG	50301	
TA3_F	<u>GGATCC</u> CCACGTAAGTAGCCCGATGC	51306	Cloning of TA3 into pKMAG-C
TA3_R	<u>GGATCC</u> TCAGGGAGCACGAAACATC	52942*	
TA4_F	<u>GGATCC</u> GATCACCGCTGACATCGAG	62971 <sup>c</sup>	Cloning of TA4 into pKMAG-C
TA4_R	<u>GGATCC</u> CGGCCAAGAACAAGAAAGAC	62045	
SD3_F	<u>GGATCC</u> ACCCGTGTAGCGGTTAATTC	77655	Cloning of SD3 into pKMAG-C
SD3_R	<u>GGATCC</u> TTCCAAAAAGCCCGGTTAC	78118*	
<b>pPsv48B</b>			
TA5_F	<u>GGATCC</u> CCTTGGATACGCACCGAAAAC	11832*	Cloning of TA5 into pKMAG-C
TA5_R	<u>GGATCC</u> CAGGTGTCAATTGGCGATACC	11066	
SD4_F	<u>GGATCC</u> CCCCAAATAGACCCAGCATATC	11884	Cloning of SD4 into pKMAG-C

SD4_R	<u>GGATCCGGATGGTTACCGCCATACC</u>	13274*	
SD5_F	<u>GGATCCACCGTCGAAGCCAAGGTG</u>	31991	Cloning of SD5 into pKMAG-C
SD5_R	<u>GGATCCGCTGCCGCACTCGAAATAG</u>	32672*	
SD6_F	<u>GGATCCAGCGCACACTTGACGCTAC</u>	35775	Cloning of SD6 into pKMAG-C
SD6_R	<u>GGATCCCTATGACACCCGCTGACTTTC</u>	37405*	

#### **pPsv48C**

TA6_F	<u>GGATCCCTGCCAAGAAAGTCGTCAAG</u>	1760	Cloning of TA6 into pKMAG-C
TA6_R	<u>GGATCCCGAAGCATGAATACCAGCAC</u>	2442*	
TA7_F	<u>GGATCCTTTTCGACCGGAATTGATTG</u>	4752*	Cloning of TA7 into pKMAG-C
TA7_R	<u>GGATCCGTACCCCATCATGCGATTG</u>	3866	
SD7_F	<u>GGATCCCTTCATGGAAAATGCTACCG</u>	11121	Cloning of SD7 into pKMAG-C
SD7_R	<u>GGATCCCCTTAATAGGTAGGTGTGAGCTA</u> TCC	9861*	
TA8_F	<u>GGATCCGCAATACAGTGCAAACCAATG</u>	39465	Cloning of TA8 into pKMAG-C
TA8_R	<u>GGATCCTGATCAACATCCCCCAACAG</u>	40244*	

#### **Construction of pRK3A and pRK3C**

#### **pPsv48A**

A1_R	<u>GGATCCATCCCTGGCTTCGGTCATAG</u>	21950	with TA1_F
A2_R	<u>GGATCCGGCCAGAACTCGTATAGCC</u>	35515	with TA2_F
A3_R	<u>GGATCCGCTGCGGTTCTGAAATTACG</u>	51818*	with TA3_F

#### **pPsv48C**

A6_R	<u>GGATCCGTTCTGAAAGGGGCAGAACG</u>	2240*	with TA6_F
A7_R	<u>GGATCCAGCTTCTGGGTCCTTTGCAG</u>	4189*	with TA7_F

A8_R	<u>GGATCCGCTTGC</u> GGGTCTTCGTTG	39906*	with TA8_F
<b>PCR multiplex</b>			
<b>pPsv48C</b>			
RepL_F	TACGCTACGCGAGCTCAATC	33335	Detection of PSPSV_C0043
RepL_R	TCTAGAGGCCTTCCTTATTCATGATGC	34353*	
7C_F	AAACAGCCCCCGACATTG	4142*	Detection of PSPSV_C0007
7C_R	GCCGAAATTTCCGTCAGG	3411	
RepJ_F	ATAGGCTCCTAGCGTTCGAG	30482	<i>repJ</i> detection
RepJ_R	AGAGCGATTGACCATGCAC	31027*	
RepA_F	CAATAGCAGCTTGTCGCTCA	882	<i>repA</i> detection
RepA_R	GTTACCGTTGGCCTCTCGTC	1148*	
ipt_F	GCGTCTCCAGGAAGAATTGG	18715	To detect gene <i>idi</i> and estimate
ipt_R	ACCTCATCCGGATTCAAGC	18870*	copy number.
<b>Plasmid copy number estimation by qPCR</b>			
<b>Chromosome (Acc. nº)</b>			
gyrA_F	GACGAGCTGAAGCAGTCCTACC	3774872*	Internal to <i>gyrA</i> .
gyrA_R	TTCCAGTCGTTACCCAGCTCG	3774736	
<b>pPsv48A</b>			
ptz_F	AAGACCCATACTGGTGCGATAG	26857*	Internal to <i>ptz</i> .
ptz_R	CCGCAACCAACTCGTCTAAC	26705	
<b>pPsv48B</b>			
AO1_F	AGGGAAACCGAAGACCAATG	10026	Internal to <i>hopAO1</i>
AO1_R	AACCAGCCAATTTTCAGATCG	10176*	

### Other purposes

IS801_R	ACGCATCAGCGTCTTCCTAC	Anneals in 3' of CRRI. Outward
IS50_F	ACACAGATTTAGCCCAGTCG	Anneals in Tn5GDYN1

<sup>a</sup> The name of the primer is indicated, as well as the molecule used as target DNA and the purpose of designing each pair.

<sup>b</sup> The BamHI site introduced in primers to facilitate cloning is underlined

<sup>c</sup> The coordinates of the annealing point of the first nucleotide of each primer is indicated. Asterisks indicate that the primer anneals in the reverse strand of the DNA molecule.





## CAPÍTULO 4

# El gen *idi*, codificado en el plásmido pPsv48C, es esencial para la producción de tumores de tamaño silvestre en plantas de olivo

---

### Resumen

Las citoquininas son fitohormonas esenciales en los procesos de crecimiento y diferenciación de los tejidos vegetales y además, participan con las demás fitohormonas, en la activación de los mecanismos de defensa de la planta. Muchos patógenos vegetales modulan la cantidad de citoquininas, y otras fitohormonas como las auxinas, durante la infección, como parte del proceso patogénico. La cepa modelo *P. syringae* pv. *savastanoi* se caracteriza por inducir tumores en la parte aérea de las especies vegetales que infecta y de sintetizar auxinas y citoquininas. La cepa modelo de estudio NCPPB 3335 contiene tres plásmidos nativos (pPsv48A, 80 kb; pPsv48B, 45 kb, y pPsv48C, 42 kb) que portan los genes, *ptz* (potencial isopentenil transferasa, en pPsv48A) e *idi* (posible isopentenil difosfato delta isomerasa, en pPsv48C) potencialmente implicados en la biosíntesis de citoquininas. La delección del gen *idi* y *ptz* del contexto génico de NCPPB 3335 demuestra que éstos están directamente implicados en el desarrollo de tumores en plantas de olivo.

---

Manuscrito en preparación. Este trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo del Dr. Cayo Ramos, Universidad de Málaga, que demostró el papel específico del gen *ptz* de la cepa NCPPB 3335 en la inducción de tumores de tamaño silvestre (A. Pintado 2014. Construcción de mutantes en genes de virulencia en la bacteria patógena de olivo *Pseudomonas savastanoi*. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Málaga)

## Introducción

Las citoquininas (CKs) son un tipo de hormonas vegetales que participan en el desarrollo y crecimiento de las plantas regulando el ciclo celular y su diferenciación (Mok and Mok, 2001). Juegan un papel importante en procesos complejos como el crecimiento y desarrollo de la planta, el balance del sistema radicular y el aéreo o la transducción de señales nutricionales (revisado por Sakakibara, 2006). Las CKs pueden ser sintetizadas en cualquier tejido vegetal y son movilizadas sistémicamente por toda la planta (Frébert *et al.*, 2011). Estas moléculas también están implicadas en la activación de respuestas de la planta frente a diversas situaciones de estrés, aunque lo hacen en conjunción con las demás hormonas vegetales, como las auxinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, o el etileno (O'Brien and Benková, 2013). Estructuralmente, las CKs son pequeñas moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral en posición N<sup>6</sup> que puede ser de naturaleza aromática o isoprenoide (Strnad, 1997; Mok and Mok, 2001). Entre las que provienen de la cadena isoprenoide se encuentran la cis- y trans- zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina, con sus respectivos productos glicosilados (Sakakibara, 2006).

Diversos patógenos vegetales, han desarrollado estrategias para modular la ruta metabólica de CKs de la célula vegetal, provocando una disminución de las respuestas de defensa la planta (Hann *et al.*, 2014). Un notable ejemplo es el efector HopQ1, secretado por el sistema de secreción tipo 3, está conservado en diversos géneros como *Pseudomonas*, *Xanthomonas* o *Ralstonia*. Esta proteína actúa catalizando formas activas de CKs a partir de diversos precursores y está directamente implicada en la supresión de las respuestas de defensa de la planta (Hann *et al.*, 2014). Las bacterias inductoras de tumores como *Rhodococcus fascians*, *Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium tumefaciens* y algunos patovares de *P. syringae* han desarrollado sus propias rutas de biosíntesis de CKs (Goethals *et al.*, 2001) alterando la homeostasis hormonal e induciendo la dediferenciación celular y el retraso de la senescencia. Esto convierte la zona infectada en un sumidero de nutrientes para las poblaciones bacterianas, que proliferan así en el interior de la planta (Ma and Ma, 2016). *Rhodococcus fascians* produce hasta seis tipos diferentes de CKs que actúan conjuntamente durante la infección (Depuydt *et al.*, 2009; Pertry *et al.*, 2009; 2010). *A. tumefaciens* contiene genes de biosíntesis de auxinas, opinas y CKs en la región de T-DNA del plásmido de virulencia Ti, los cuales se incorporan en el genoma de la célula infectada e inducen la tumoración del tejido (Sakakibara *et al.*, 2005).

*Ps. savastanoi*, agente causal de la tuberculosis del olivo, provoca tumores en la parte aérea del olivo. Entre los principales factores de virulencia identificados hasta la fecha, se incluye un sistema de secreción tipo tres completo, con hasta 33 efectores identificados (Bardaji *et al.*, 2011b; Castañeda-Ojeda *et al.*, 2016), genes que participan en el metabolismo de la molécula señal c-di-GMP (Aragón *et al.*, 2015) y genes cromosómicos implicados en el metabolismo y la biosíntesis de auxinas (Aragón *et al.*, 2014). La producción bacteriana de CKs se ha postulado como un factor de virulencia de importancia adicional en este patosistema. Estudios anteriores han identificado el gen *ptz*, cuyo producto génico actúa como una isopentenil transferasa, dentro de la ruta de biosíntesis de CKs (Macdonald *et al.*, 1986; Powell and Morris, 1986). Esta enzima cataliza la prenilación de la adenosina 5' fosfato (AMP, ADP o ATP) a partir de DMAPP o HMBDP, para obtener, zeatina, dihidrozeatina, ribosilzeatina, 1'metilzeatina, ribosildihidrozeatina y ribosil-1'metilzeatina, que sintetiza *P. savastanoi* (Surico *et al.*, 1985; Macdonald *et al.*, 1986; Evidente *et al.*, 1991; Iacobellis *et al.*, 1994). *ptz* conserva un 50% de identidad con dos genes implicados en la biosíntesis de CKs de *A. tumefaciens* (genes *tmr*, y *tzs*), lo que sugiere un origen común para la ruta de biosíntesis de CKs en ambos organismos (Powell and Morris, 1986).

Dentro de *P. syringae*, los patovares *savastanoi* (infecta olivo y fresno), *nerii* (infecta olivo, fresno y adelfa) y *retacarpa* (infecta retama) inducen tumores aéreos en el proceso de infección de sus respectivos huéspedes. Los aislados analizados producen CKs y contienen el gen *ptz* (Caponero *et al.*, 1995, Pérez-Martínez *et al.*, 2008, Ramos *et al.*, 2012). Por otro lado, la mayoría de los aislados del patovar *fraxini* (infecta fresno y olivo) producen IAA en cultivo, pero no CKs, y no producen tumores, sino que las infecciones dan lugar a chancros. Excepcionalmente, la cepa NCPPB 3474 además de auxinas produce CKs y contiene a *ptz*, e induce tumores en olivo y fresno (Iacobellis *et al.*, 1998).

Adicionalmente, el gen *idi* codifica para la enzima isopentenil difosfato delta isomerasa y podría constituir otro engranaje de la ruta de biosíntesis de CKs. Esta enzima cataliza la transformación de la molécula isopentenil pirofosfato en DMAPP, uno de los sustratos principales de la isopentenil transferasa (gen *ptz*) en el proceso de síntesis de CKs. Los homólogos del gen *idi* se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de bacterias, algunas de las cuales son no fitopatogénicas, sugiriendo una función adicional a la síntesis de CKs. Curiosamente, *idi* se halla en el genoma de las cepas tumorigénicas secuenciadas. Aunque estos indicios sugieren que *idi* podría estar implicado en el desarrollo tumoral del huésped, hasta la fecha no hay estudios que confirmen este hecho.

Los genes *ptz* e *idi* son parte del ADN cargo que porta el complemento de plásmidos nativos de la cepa modelo *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Bardaji *et al.*, 2011b). pPsv48A, de 80 kb, contiene al gen *ptz* y el gen *idi* se encuentra ubicado en pPsv48C, de 42 kb. Ensayos de patogenicidad realizados en plantas micropropagadas y lignificadas de olivo, donde se inocularon derivados de NCPPB 3335 curados del plásmido pPsv48A, demostraron que este plásmido era requerido para el desarrollo completo de la enfermedad (Bardaji *et al.*, 2011b). Las cepas curadas de pPsv48A indujeron tumores significativamente más pequeños que los que indujo la cepa silvestre. Este efecto se atribuyó a la pérdida de *ptz* y por tanto a una disminución de los niveles de CKs producidas por el patógeno. Entonces no se pudo obtener ningún derivado NCPPB 3335 curado del plásmido pPsv48C, debido a que éste se mostró excepcionalmente estable, no pudiendo así determinar la contribución de este plásmido en la virulencia del patógeno.

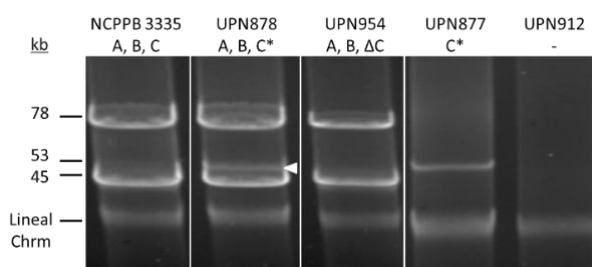
Este trabajo aborda la obtención de derivados de NCPPB 3335 curados de pPsv48C y el estudio pormenorizado de la contribución de cada plásmido nativo en el desarrollo de los tumores tras la infección. Para atribuir una función específica a los productos génicos de *ptz* e *idi* y asociarlos a la virulencia de *Ps* pv. *savastanoi*, se construyeron mutantes defectivos de cada gen, así como un mutante doble.

## Resultados

### UPN912, una cepa curada de su complemento de plásmidos

El plásmido nativo pPsv48C es extremadamente estable y todos los intentos de curación realizados resultaron fallidos (Bardaji *et al.*, 2011b). Esto es debido a que en la cepa empleada, el transposón estaba insertado en una región flanqueada por dos MITEPsy2 que recombinan con muy alta frecuencia y a que pPsv48C contiene tres sistemas de muerte post segregacional efectivos que aseguran la estabilidad del plásmido, además de un segundo replicón (ver capítulos 2 y 3). Por ello, se realizó una nueva mutagénesis con el transposón Tn5-GDYN1 y se seleccionó una inserción idónea (nucleótido 7433; cepa UPN877 en Tabla1). Para bloquear el efecto de los sistemas TA del plásmido, se transformó UPN877 con el vector pRK3C (ver capítulo 3 y Tabla1) y se sembraron placas suplementadas con sacarosa, a diluciones apropiadas, de cultivos saturados de la cepa UPN877::pRK3C. Ninguno de los 600 clones resistentes a sacarosa analizados estaba completamente curado de pPsv48C. Todos mostraban en el perfil una molécula circular de tamaño variable (4-15 kb) que se replicaba autónomamente (datos no mostrados). Se eligieron varios derivados que se propagaron hasta seis veces en medio LB sin selección. Finalmente, uno de los clones resultantes no poseía el vector pRK3C

ni el plásmido derivado de pPsv48C (Fig.1) por lo que se retuvo y se denominó UPN912 (Tabla 1). El genoma de UPN912 fue secuenciado y comparado con la cepa NCPPB 3335, confirmándose así que no hay cambios en el cromosoma de esta cepa y que carece de su complemento de plásmidos nativos. Para obtener un derivado curado de pPsv48C, se siguió este mismo procedimiento con una cepa silvestre que contenía el plásmido pPsv48C marcado con el transposón y que fue transformada con el vector pRK3C (UPN878::pRK3C). La cepa resultante, y resistente a sacarosa, UPN954 se transfirió sucesivamente en medio sin selección pero, aunque perdió el vector pRK3C, mantiene 4.8 kb del plásmido nativo (coordenadas 27019-31852 de FR820587).

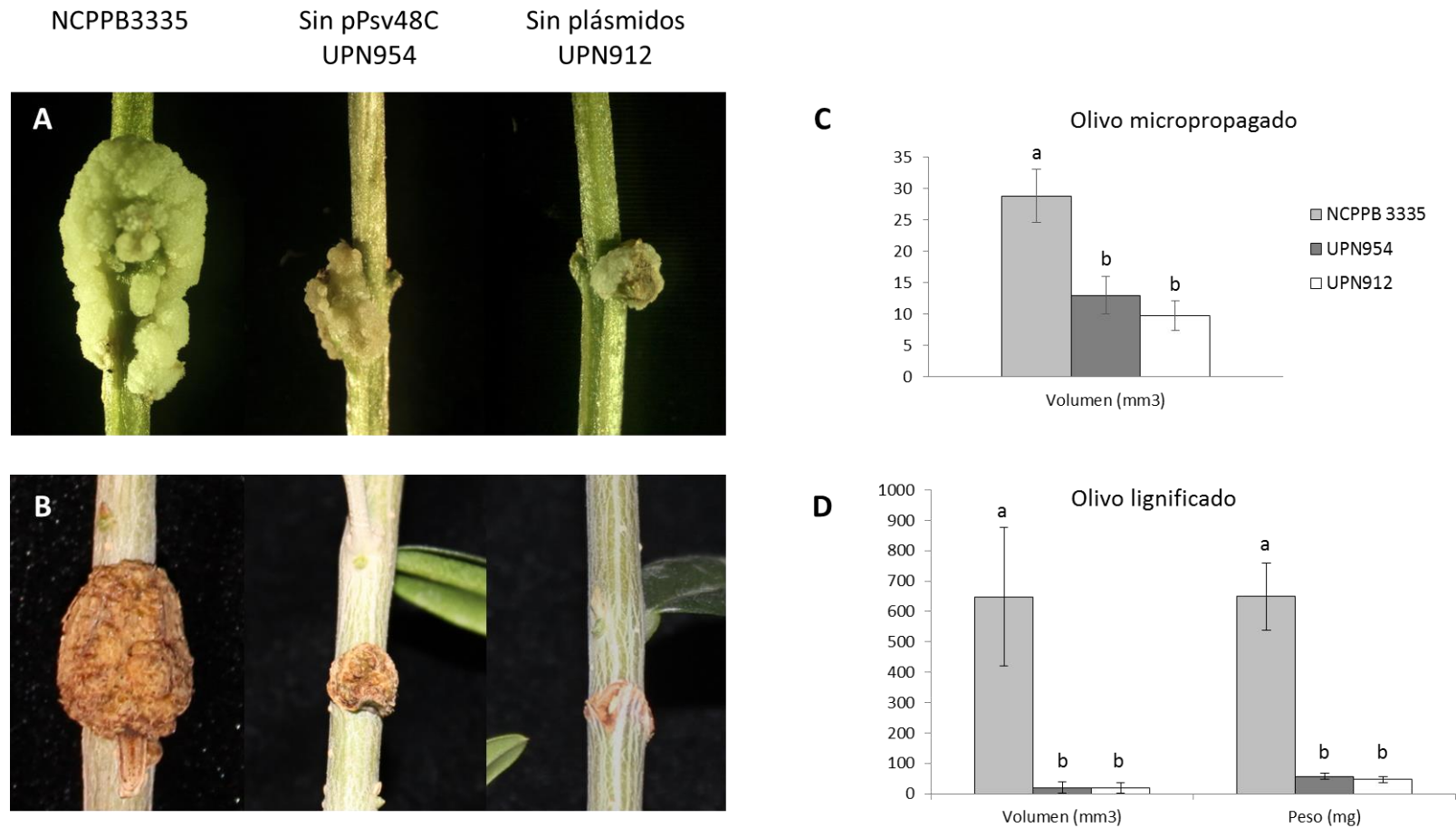


**Figura 1. Perfil plasmídico de la cepa UPN912.** Perfiles plasmídicos en gel de agarosa al 0,8% de las siguientes cepas (de izquierda a derecha); NCPPB3335 (cepa silvestre), UPN878 (cepa silvestre con el plásmido pPsv48C marcado con el transposón Tn5-GDYN1), UPN954 (cepa carente del plásmido pPsv48C), UPN877 (cepa carente de pPsv48A y pPsv48B con el pPsv48C marcado con el Tn5-GDYN1) y la cepa UPN912 (curada de todos los plásmidos de NCPPB 3335). En UPN878 aparece indicada con un triángulo blanco la banda correspondiente a pPsv48C marcado con el transposón Tn5-GDYN1.

### Los tres plásmidos nativos de NCPPB 3335 contribuyen a la formación de tumores en olivo.

La obtención de una cepa curada de los tres plásmidos y la colección de plásmidos marcados con los casetes de resistencia del transposón Tn5-GDYN1 nos permitieron generar variantes de NCPPB 3335 con diversas combinaciones de plásmidos (ver Tabla 1 y Tabla S1). Así, UPN958, que solo contiene pPsv48A, deriva de transformar UPN912 con pPsv48A::Tn5-GDYN1. De la transformación de Psv48 $\Delta$ AB con este mismo plásmido se obtuvo UPN956 que, al contener pPsv48A::Tn5-GDYN1 y pPsv48C, lo consideramos un derivado curado de pPsv48B.

Primeramente se ensayaron las cepas UPN954 (curada de pPsv48C) y UPN912, y se compararon con la cepa silvestre, en planta micropropagada y en olivo lignificado.

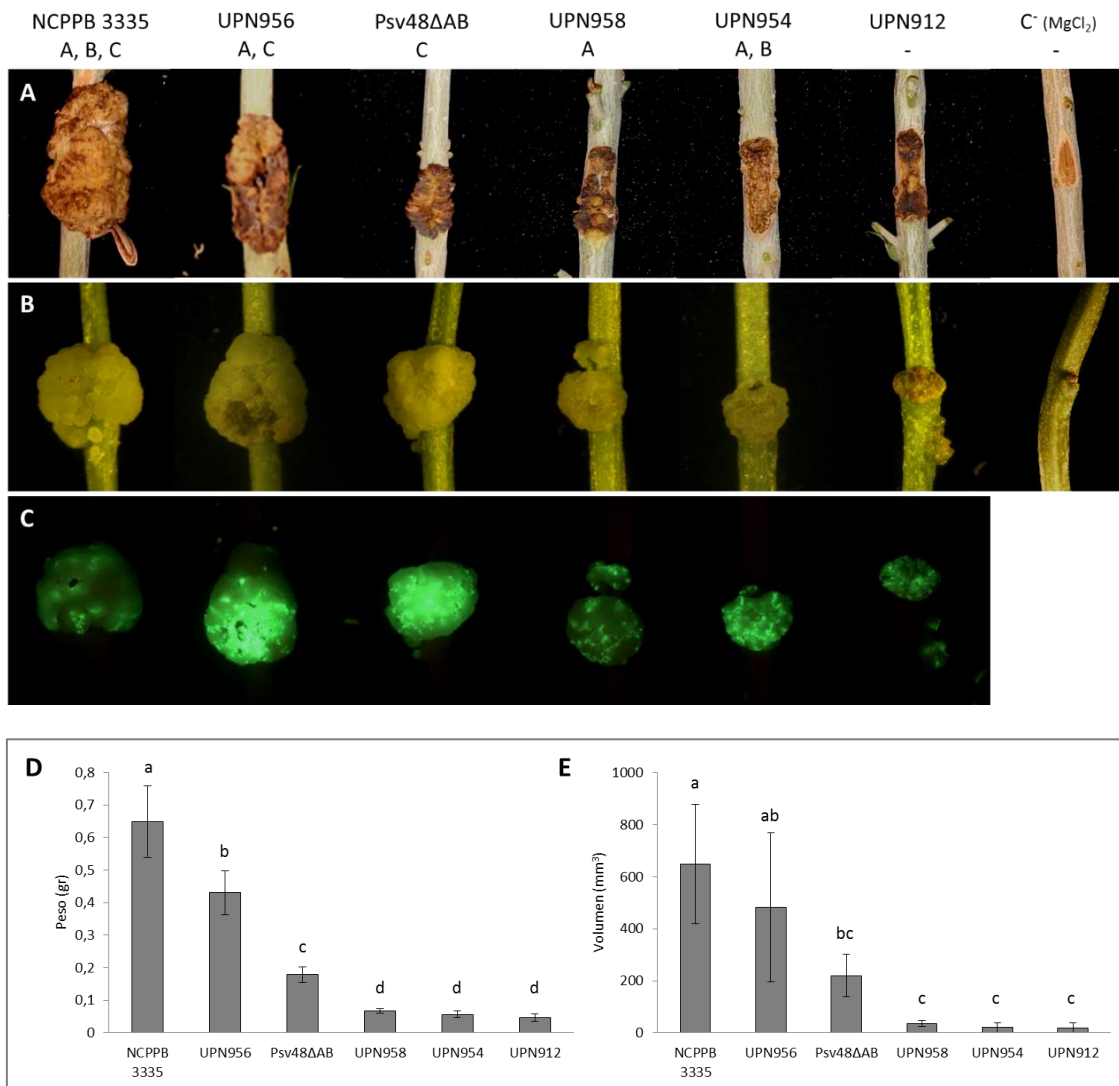


**Figura 2. Síntomas producidos por las cepas indicadas de *Ps pv. savastanoi* NCPB 3335 en olivo.** (A) Síntomas generados en olivos micropropagados 28 días post-inoculación y (B) síntomas generados en olivos lignificados 90 días post-inoculación. (C) Volumen (mm<sup>3</sup>) de los tumores producidos por la planta tras inocular las cepas indicadas en olivos *in vitro* tras 28 días. (D) Volumen (mm<sup>3</sup>) y peso (mg) de los tumores desarrollados tras la infección de las cepas indicadas en olivos lignificados 90 días post-inoculación. Las barras de error indican la desviación estándar. Las medias con las mismas letras no presentan diferencias significativas (P=0.05).

Los tumores inducidos por la cepa silvestre NCPPB 3335 en planta micropropagada alcanzaron valores de  $29 \pm 4 \text{ mm}^3$  a los 28 días post inoculación, mientras que el tamaño de los tumores en las plantas inoculadas con las cepas curadas del plásmido pPsv48C era muy reducido (Fig. 2A y C); en el caso de las inoculaciones en olivo micropropagado con UPN954 el volumen medio del tumor fue de  $13 \pm 3 \text{ mm}^3$  y en las inoculaciones con UPN912 fue de  $10 \pm 2 \text{ mm}^3$ , siendo estas diferencias estadísticamente no significativas (Fig. 2C). Esta misma tendencia se acentuó en las inoculaciones realizadas en olivo lignificado. UPN912 no fue capaz de inducir la formación de tumores en planta donde el valor de volumen medio del tumor fue de  $19 \pm 18 \text{ mm}^3$ , 34 veces inferior a los tumores hallados en plantas inoculadas con la estirpe salvaje (volumen medio de tumor  $649 \pm 228 \text{ mm}^3$ , Fig. 2B y D). Asimismo, los olivos inoculados con UPN954 tampoco desarrollaron tumores aparentes, con valores medios de volumen de  $20 \pm 18 \text{ mm}^3$ . Estos datos sugieren que NCPPB 3335 requiere de su complemento de plásmidos para inducir la formación de tumores en su huésped y que el plásmido pPsv48C es esencial en la virulencia de este patógeno.

En un segundo ensayo se incluyeron, además de las variantes anteriormente analizadas, las variantes con sólo pPsv48A y sólo pPsv48C, y la cepa curada de pPsv48B. Los síntomas producidos por la cepa que contiene pPsv48C (Psv48 $\Delta$ AB) fueron significativamente menos severos que los producidos por la cepa silvestre, como ya había sucedido en ensayos anteriores (Bardaji *et al.*, 2011b), aunque fue capaz de inducir tumores de  $11 \pm 3 \text{ mm}^3$  en planta micropropagada y de  $220 \pm 81 \text{ mm}^3$  en olivo lignificado (Fig. 3). La cepa curada de pPsv48B, UPN956, también indujo síntomas atenuados con tumores significativamente menores ( $482 \pm 285 \text{ mm}^3$  en olivo lignificado) a los inducidos por la cepa silvestre. Este resultado se halla en consonancia con lo observado en cepas mutantes en las que el efector HopAO1 (presente en pPsv48B) se había eliminado (Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Los tumores inducidos por UPN956 resultaron significativamente superiores en peso a los inducidos por Psv48 $\Delta$ AB ( $431 \pm 67 \text{ mg}$  frente a  $178 \pm 24 \text{ mg}$ ) aunque los volúmenes no mostraron diferencias significativas, probablemente debido a la alta variación hallada entre las distintas repeticiones (Fig. 3E). Castañeda-Ojeda *et al.* (2017b) también observaron la aparición de áreas necróticas en la superficie de los tumores al inocular los derivados delecionados del gen *hopAO1* que atribuyeron al papel de este efector en la supresión del sistema inmune de la planta. En nuestros ensayos, si bien pudimos observar áreas necróticas en algunos de los tumores inducidos por UPN956 (datos no mostrados), éstas eran más generalizadas en los tumores desarrollados por plantas inoculadas con la cepa UPN912 (sin plásmidos).





**Figura 3. Síntomas producidos por las cepas indicadas de *Ps pv. savastanoi* en olivo.** Aparecen indicados los nombres de las cepas y debajo los plásmidos que portan. (A) Síntomas generados en olivos lignificados tras 90 días post-inoculación. (B) Tumores inducidos en plantas de olivo micropropagado tras 28 días post-inoculación y (C) emisión de fluorescencia, mediante microscopía de epifluorescencia. (D) Peso (gr) y (E) volumen (mm<sup>3</sup>) de los tumores producidos por las cepas indicadas en olivos adultos tras 90 post-inoculación. Las medias que tienen la misma letra, no presentan diferencias significativas (P=0.05).

Aquellos derivados que no contenían el plásmido pPsv48C, UPN954 (pPsv48ΔC), UPN958 (pPsv48ΔBC) y UPN912 (pPsv48ΔABC) se mostraron muy atenuados en su virulencia. El volumen de los tumores producidos por plantas micropropagadas y olivos lignificados inoculados por estas cepas alcanzaron volúmenes máximos de  $15 \pm 2$  mm<sup>3</sup> y  $36 \pm 12$  mm<sup>3</sup> respectivamente, no hallándose diferencias significativas entre las inoculaciones con las distintas cepas (Fig. 3D y E). Los resultados de este segundo ensayo corroboran el papel destacado de pPsv48C en la inducción de tumores en olivo.



El plásmido pPsv48B también parece estar implicado en la virulencia de NCPPB 3335 aunque el efecto es menor. La aportación de pPsv48A a la formación de tumores, si bien es importante (Bardaji *et al.*, 2011b), parece estar supeditada a la presencia del plásmido pPsv48C, ya que la cepa que contiene solamente el plásmido pPsv48A no es capaz de inducir tumores de tamaño significativamente superior a los inducidos por la cepa carente de plásmidos (Fig. 3).

### **Los genes *idi* y *ptz* son clave para inducir tumores en olivo**

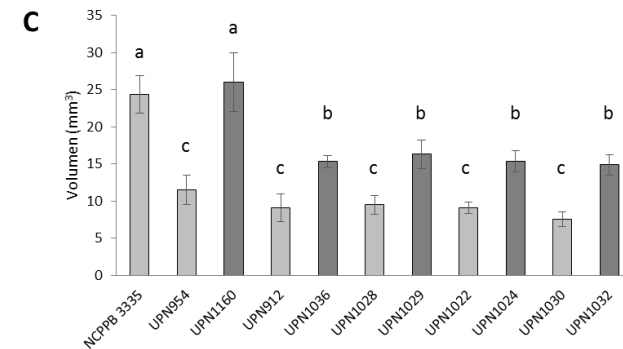
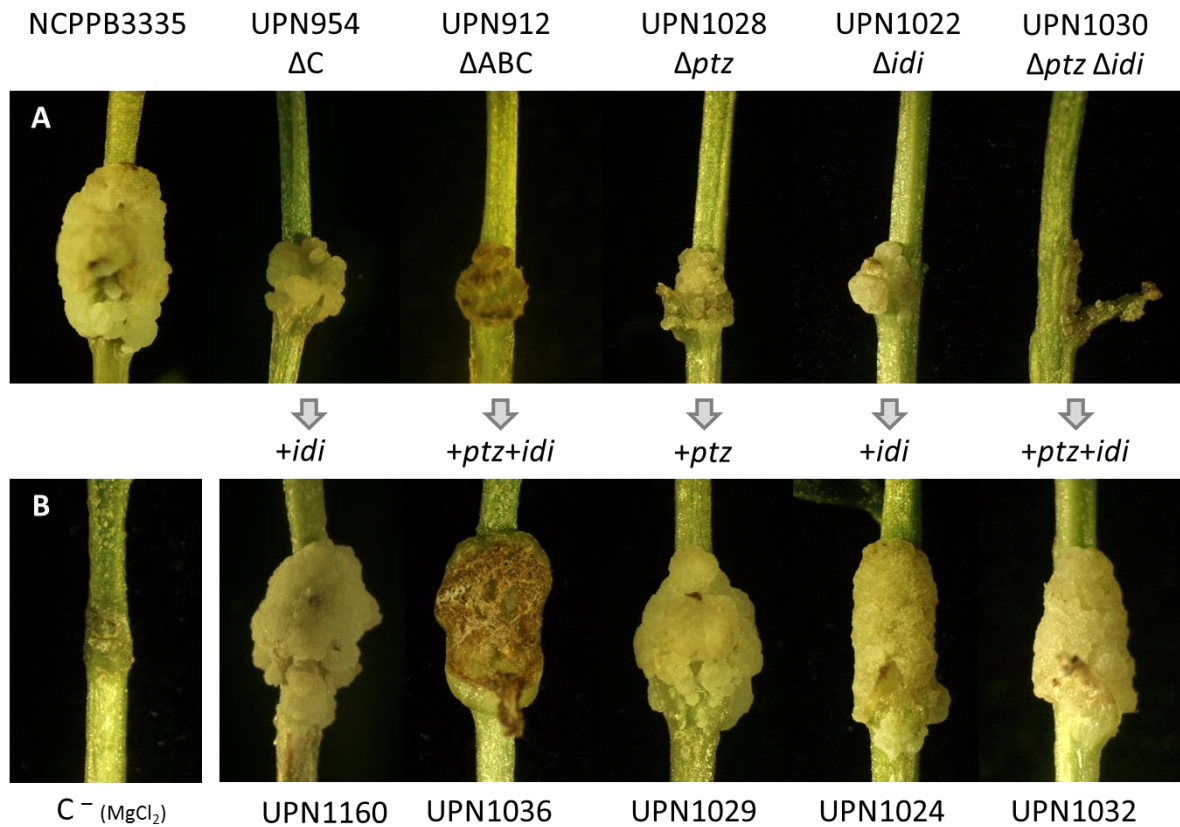
El gen *ptz* de pPsv48A e *idi*, presente en pPsv48C (Bardaji *et al.*, 2011b), codifican para proteínas cuyas funciones predichas están asociadas a la síntesis de CKs. Los fenotipos mostrados por los derivados de NCPPB 3335 que no contienen a pPsv48C, podrían deberse, por tanto, a la falta del producto deducido del gen *idi* en estos genotipos. Con el fin de corroborar esta hipótesis, generamos mutantes de NCPPB 3335 con el gen *idi* completamente deleciónado. Debido a la metodología empleada para la construcción del mutante, fue inevitable deleciónar también 50 aminoácidos del producto deducido del gen inmediatamente anterior a *idi* (PSPSV\_C0023). En el ensayo también se incluyó un derivado de NCPPB 3335, mutante en el gen *ptz*, (cepa UPN1028, ver Tabla 1) que se obtuvo en trabajos anteriores (Pintado, 2014) y un derivado doble mutante (cepa UPN1030, ver Tabla 1). Este último nos permitiría detectar un posible efecto aditivo de ambos productos génicos. Todas las cepas mutantes fueron complementadas con una copia del gen o los genes deleciónados.

Las plantas micropropagadas inoculadas con la cepa silvestre NCPPB 3335 desarrollaron tumores de un volumen medio similar al de ensayos anteriores ( $24 \pm 2$  mm<sup>3</sup>). Los mutantes defectivos en *idi*, en *ptz* y el doble mutante indujeron tumores que mostraban una aparente reducción del tamaño (Fig. 4), con volúmenes que oscilaron entre los 7 y los 11 mm<sup>3</sup>. Estos tumores fueron estadísticamente comparables a los inducidos por UPN912 y por la cepa curada de pPsv48C (Fig 4C). Todas las cepas complementadas revertieron el fenotipo induciendo en las plantas tumores cuyo volumen era significativamente mayor, aunque esta reversión fue parcial, ya que ningún tumor alcanzó el tamaño de los desarrollados por las plantas inoculadas con la cepa silvestre (Fig. 4B y C). UPN912 fue complementada con el vector que contiene a ambos genes (*ptz* e *idi*) y los tumores generados en esta ocasión aumentaron de tamaño sin alcanzar los niveles de la cepa silvestre. Cabe destacar, que en un ensayo independiente se complementó la cepa UPN954 (curada de pPsv48C) con el plásmido pPsv48C::Tn5-GDYN1-2 además de con dos construcciones adicionales; una que contenía al gen *idi* con su propio promotor en un vector de expresión de *Pseudomonas*

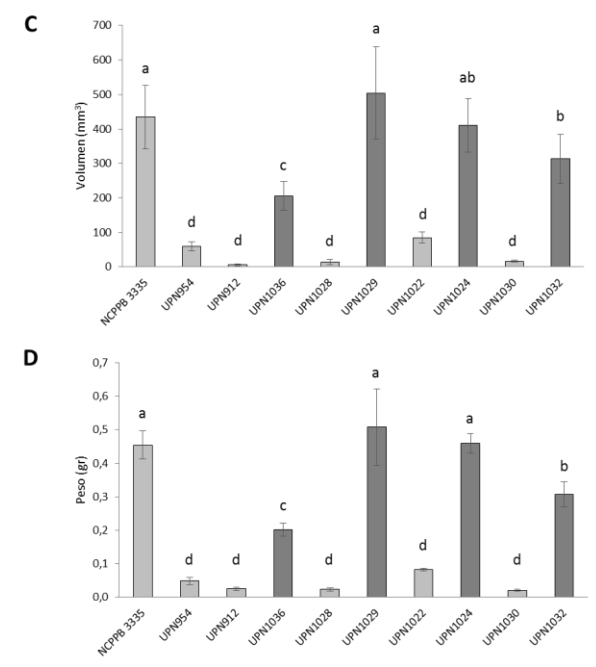
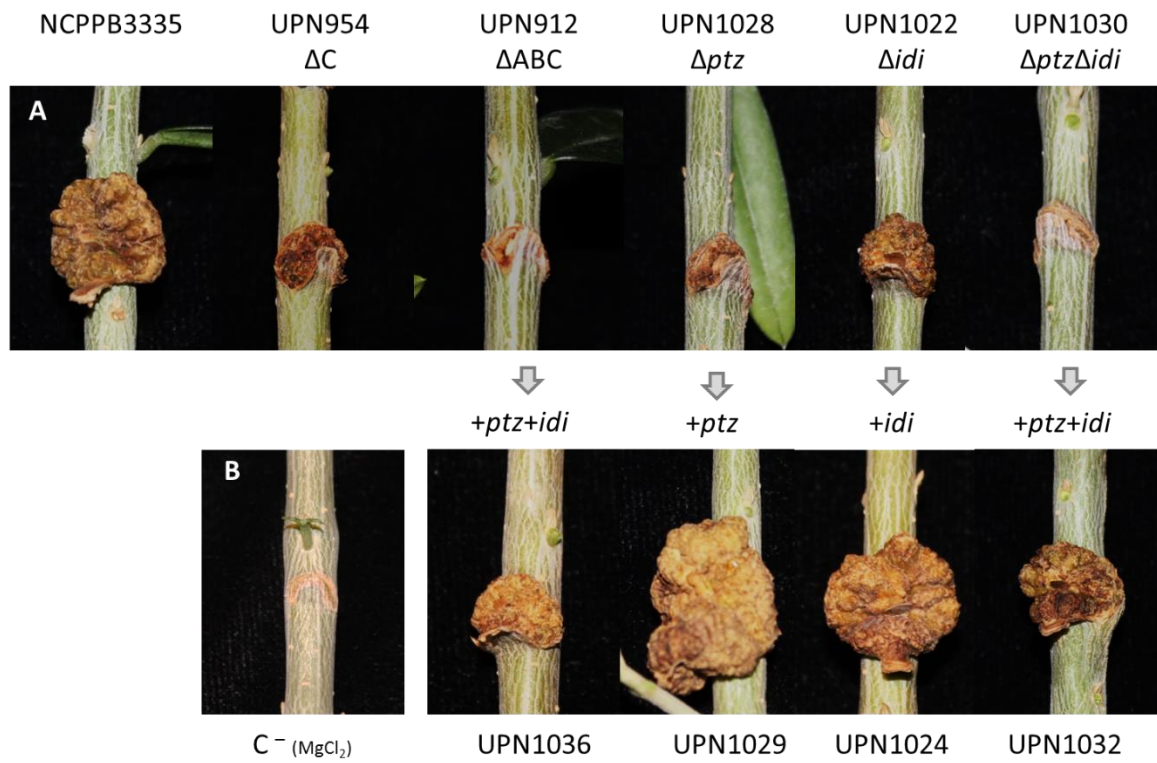
y la otra, que contenía además la CDS completa de PPSV\_C0023 (delecionada en el proceso de mutagénesis de *idi*) y su posible promotor (ver Tabla 1). La introducción de cada uno de estos elementos condujo a la reversión completa del fenotipo (Fig. 4, y no mostrado), sugiriendo que el producto génico de *idi* es el único responsable del fenotipo observado.

En olivos adultos las plantas inoculadas con la cepa silvestre desarrollaron tumores ligeramente más pequeños de lo habitual ( $434 \pm 91 \text{ mm}^3$ ). No obstante, los resultados de este ensayo mostraron una tendencia similar al anterior (Fig. 5). Los tumores inducidos por todas las cepas mutantes fueron comparables, y similares a los tumores inducidos tanto por UPN912, como por UNP954 en cuanto a volumen y peso del tumor se refiere (Fig. 5C y D). Desafortunadamente, la complementación de los mutantes tampoco resultó en la reversión completa del fenotipo en todos los casos. Si bien las complementaciones de los mutantes simples  $\Delta ptz$  y  $\Delta idi$  resultaron en tumores comparables a los inducidos por NCPPB 3335, el doble mutante y UPN912 complementados con ambos genes mostraron una reversión parcial. Para el caso de UPN912, los tumores de menor tamaño se podrían explicar por la falta de pPsv48B en su genotipo (ver sección anterior). Sin embargo, no tenemos una explicación razonable para los resultados obtenidos sobre el doble mutante.

Los resultados de estos ensayos ponen en manifiesto el papel crucial que juegan tanto *ptz* como *idi* en la inducción del desarrollo tumoral en el huésped. Eliminar del genoma de NCPPB 3335 *ptz* o *idi* resultó en idéntico fenotipo, comparable además al fenotipo observado por el doble mutante. Por lo tanto, descartamos que ambos genes sean aditivos o sinérgicos sino que más bien parece que ambos genes inciden sobre la misma ruta metabólica que deriva en el fenotipo observado, el tumor. Este hecho concuerda con la función predicha para cada uno de estos genes, que los incluye en la misma ruta de la vía de biosíntesis de CKs.



**Figura 4. (A y B) Síntomas producidos por las cepas indicadas de *Ps. savastanoi* en olivo micropropagado a los 28 días post-inoculación. (B) Control negativo de la inoculación ( $MgCl_2$ ) y síntomas generados en olivos micropropagados por las cepas complementadas correspondientes para cada mutante. (C) Volumen ( $mm^3$ ) de los tumores producidos por las cepas indicadas en olivos tras 28 días post-inoculación. En gris oscuro aparecen representados los valores para las cepas complementadas. Las barras de error indican la desviación estándar. Las medias con las mismas letras no presentan diferencias significativas ( $P=0.05$ ).**



**Figura 5. (A y B) Síntomas producidos por las cepas indicadas de *Ps. savastanoi* en olivo lignificado a los 90 días post-inoculación. (B) Control negativo de la inoculación (MgCl<sub>2</sub>) y síntomas generados en olivos adultos por las cepas complementadas correspondientes para cada mutante. (C) Volumen (mm<sup>3</sup>) y (D) peso (gr) de los tumores producidos por las cepas indicadas en olivos lignificados tras 90 días post-inoculación. En gris oscuro aparecen representados los valores para las cepas complementadas. Las barras de error indican la desviación estándar. Las medias con las mismas letras no presentan diferencias significativas (P=0.05).**

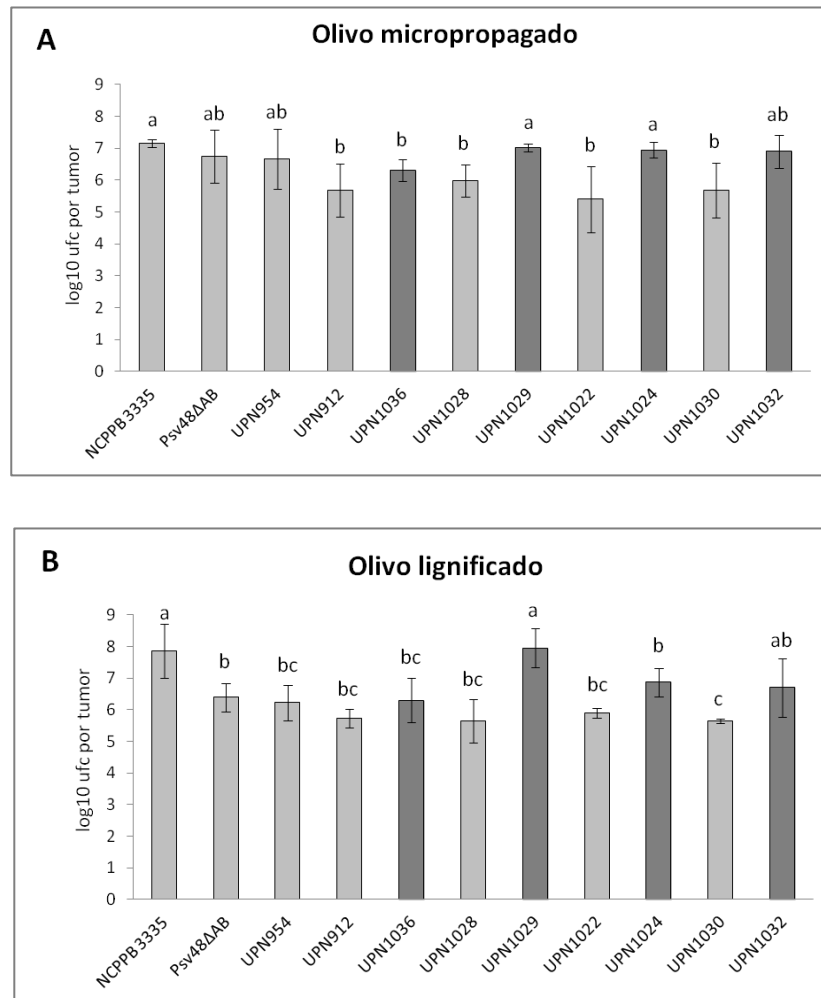
## Los plásmidos repercuten ligeramente en la supervivencia del patógeno en el tumor

Las cepas inoculadas en las plantas de olivo contenían un plásmido que permite la expresión de la proteína verde fluorescente, visible en tumores de plantas micropropagadas (Fig 3C). Se monitorizó por tanto el desarrollo de las poblaciones de las cepas ensayadas en el interior de los tumores, aplicando microscopia de epifluorescencia (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). Los tumores, en general, mostraron un patrón de emisión de fluorescencia que se extendía a lo largo de toda la superficie del tumor. En algunas ocasiones se podían observar diversas regiones con una emisión fluorescente más intensa que probablemente corresponda a colonias agregadas del patógeno. Sin una medida cuantitativa de la fluorescencia en diversas secciones del tumor, no es posible hallar diferencias aparentes entre las distintas cepas analizadas. Todos los derivados son capaces de colonizar los tumores de manera efectiva (Fig. 3C).

De igual manera, la cuantificación de poblaciones extraídas de la maceración de los tumores de plantas micropropagadas y lignificadas no mostró diferencias muy evidentes (Fig. 8). Las poblaciones de NCPPB 3335 extraídas de los tumores de plantas micropropagadas a los 28 días post inoculación alcanzaron un valor medio de  $1.4 \pm 0.2 \cdot 10^7$  ufc por tumor, suponiendo un incremento aproximado de cuatro órdenes de magnitud con respecto al inóculo inicial. Curiosamente, las poblaciones en olivo lignificado tan sólo se incrementaron 10 veces (un orden de magnitud), llegando a valores medios de  $9 \pm 0.6 \cdot 10^7$  ufc por tumor, bastante próximos a los alcanzados en olivo micropropagado. Estos resultados ponen de manifiesto la falta de correlación entre el tamaño de tumor y el tamaño poblacional que este llega a albergar.

Ninguno de los derivados de NCPPB 3335 curado de alguno de los plásmidos, o deletéreo en *idi* o *ptz*, mostró un descenso muy pronunciado de su población en el tumor. En olivo micropropagado, las poblaciones de UPN912, del mutante en *idi*, del mutante en *ptz* y del doble mutante fueron los únicos derivados cuyas poblaciones descendieron de manera estadísticamente significativa, disminuyendo dos órdenes de magnitud llegando a valores medios de  $2.6 \pm 0.8 \cdot 10^5$  ufc por tumor (Fig. 6A). Los derivados complementados (salvo para el caso de UPN912) recuperaron sus niveles de población hasta llegar a valores próximos a los de la cepa silvestre. Lo observado en olivos lignificados se halla en concordancia con los resultados anteriores (Fig. 6B). La eliminación de los genes *ptz* o *idi*, afecta a la supervivencia bacteriana, obteniendo poblaciones entre  $4.5 - 7.8 \cdot 10^5$  ufc por tumor, así como la pérdida de pPsv48C ( $1.7 \pm 0.6 \cdot 10^6$  ufc por tumor). Incluso la falta de los plásmidos pPsv48A y pPsv48B, parece

producir un efecto adverso en el patógeno, no llegando éste a alcanzar los niveles poblacionales de la cepa silvestre (población media de  $2.5 \pm 0.5 \cdot 10^6$  ufc por tumor). Las CKs podrían jugar un papel en la supervivencia del patógeno en el tumor, si bien éstas no parecen ser el factor principal.



**Figura 6. Densidad poblacional en el interior de los tumores.** Valores de la densidad poblacional (log<sub>10</sub> ufc / tumor) hallada en el interior de tumores desarrollados por plantas micropropagadas (A) y lignificadas (B) tras la inoculación de las distintas cepas ensayadas. Las barras de error representan la desviación estándar. Las medias con las mismas letras no presentan diferencias significativas (P=0.05).

## Discusión

La obtención de derivados de NCPPB 3335 curados del complemento de plásmidos nativos nos ha permitido determinar que tanto pPsv48A, pPsv48B como pPsv48C contribuyen a aumentar los síntomas de la enfermedad, y por lo tanto deben ser considerados plásmidos de virulencia del complejo de *P. syringae*. Esta especie bacteriana se caracteriza, de hecho, por contener a menudo varios plásmidos, tanto



PFs como no PFs, en una misma célula (Sesma *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1999; Sundin and Murillo, 2009) que de manera global codifican para multitud de funciones estrechamente relacionadas con la patogénesis y la adaptación a su huésped (Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007; Lipps, 2008; Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2011). Además, los plásmidos de *P. syringae* suelen contener genes que facilitan su estilo de vida epífita como el operón *ruAB* (Sundin *et al.*, 1996; Sundin and Murillo, 1999), y que le permiten sobrevivir a condiciones adversas que la rodean (como genes de resistencia a compuestos cúpricos o a antibióticos (Sundin and Bender, 1994, 1996b). En este trabajo demostramos que el complemento de plásmidos nativos de la cepa modelo de estudio de la patogénesis de *P. syringae* en huéspedes leñosos NCPPB 3335, es esencial para el desarrollo de los tumores en la planta infectada. Más específicamente, el estudio muestra que los genes *ptz* e *idi* son clave en el desarrollo tumoral, debido a que probablemente estén implicados en la biosíntesis de citoquinas por parte de la bacteria.

Trabajos anteriores ya habían atribuido el papel en virulencia del plásmido pPsv48A, y, de manera indirecta, también se había observado el efecto de la pérdida de pPsv48B en la formación de tumores. Debido a que pPsv48B no se pudo curar si pPsv48A estaba presente en la célula vegetal, solo se pudieron analizar los posibles efectos aditivos de la pérdida de ambos plásmidos. Dichos efectos no fueron detectados (Bardaji *et al.*, 2011b). En este trabajo, se construyó una cepa, que deriva de Psv48 $\Delta$ AB a la que se le insertó el plásmido pPsv48A::Tn5-GDYN1, obteniendo así un derivado que carece solamente de pPsv48B (UPN956). Esto, por lo tanto, permitió estimar de manera directa el efecto de la pérdida de pPsv48B en la inducción de tumores en la planta. Nuestros resultados indican que de hecho pPsv48B influye en el tamaño de los tumores, si bien lo hace de manera bastante discreta (ver figura 3). pPsv48B codifica para el efector HopAO1 (sin. AvrPphD2 o HopPtoD2), con actividad tirosina fosfatasa (Underwood *et al.*, 2007), que afecta en las respuestas tempranas de defensa de la planta (Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b). Un mutante de NCPPB 3335 que no expresaba HopAO1, indujo tumores atenuados en olivos lignificados (Castañeda-Ojeda *et al.*, 2017b), de manera similar al fenotipo de nuestra cepa ensayada. Además, los tumores en olivos micropropagados y lignificados mostraban áreas necróticas en superficie, parecidas a las observadas en nuestro estudio cuando se inocularon cepas carentes de pPsv48B. Por tanto, el fenotipo mostrado por UPN956 ( $\Delta$ pPsv48B) lo atribuimos a la falta del efector HopAO1.

Mediante inactivación de los sistemas de muerte post segregacional presentes en los plásmidos de esta bacteria (ver capítulo 3), se ha logrado obtener una cepa derivada

de *Ps* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 que carece de la totalidad de sus plásmidos nativos (UPN912). A partir de esta cepa, y mediante la transformación de pPsv48A::Tn5-GDYN1 se obtuvo un derivado que solamente contenía al plásmido pPsv48A (UPN958). Esta cepa produjo tumores significativamente superiores en volumen o peso a los tumores inducidos por UPN912. En ensayos anteriores se había postulado que pPsv48A, jugaba un papel fundamental en el desarrollo de los tumores (Bardaji *et al.*, 2011b), debido a la implicación de *ptz* en la biosíntesis de CKs (Macdonald *et al.*, 1986; Powell and Morris, 1986; Iacobellis *et al.*, 1994). Nuestro resultado parece por tanto confrontar los estudios anteriores. Sin embargo, el mutante en *ptz* ensayado en este trabajo, se mostraba también incapaz de inducir tumores en planta, recuperando la habilidad tras su complementación y apoyando la tesis de que *ptz* es clave en este proceso (Pintado, 2014). En conjunto nuestros resultados apuntan a que *ptz* presente en NCPPB 3335 es funcional y que su producto génico está implicado directamente en el aumento del tamaño tumoral en planta, pero que este proceso requiere más factores plasmídicos para poder llevarse a cabo.

En este trabajo también se obtuvo un derivado curado de pPsv48C, que se comportó en los ensayos de patogenicidad de igual manera que el derivado sin plásmidos (UPN912). Este fenotipo se revirtió en su totalidad tras la complementación del mutante con pPsv48C, indicando que pPsv48C también tiene un papel relevante en el desarrollo tumoral.

pPsv48C contiene al gen *idi* que codifica para una enzima isopentenil difosfato delta isomerasa y que podría alimentar al producto génico de *ptz*, mediante la síntesis de DMAPP (Sakakibara, 2006). Esta idea apoya algunas de las evidencias obtenidas en este trabajo. Las inoculaciones del mutante defectivo en *idi*, tanto en planta lignificada como en micropropagada resultaron en tumores observados muy reducidos y equiparables a los inducidos por el derivado  $\Delta$ pPsv48C. Además, este gen está conservado en las cepas tumorigénicas de los patovares *nerii*, *retacarpa*, *mandevilla* y *savastanoi* (no mostrado). *idi* aparece precedido por una CDS (PSPSV\_C0023) formando un tándem que a su vez se encuentra flanqueado por las secuencias terminales de IS1406, en el 5', e ISPa26 en el 3'. Esta ordenación (incluyendo las secuencias de IS) aparece conservada en todos las cepas tumorigénicas de *P. syringae*, cuyo genoma ha sido secuenciado y depositado en la base de datos, y no se mantiene en el resto de bacterias, sugiriendo que este fragmento de ADN tiene un origen común en todos los casos (no mostrado en resultados). Las secuencias de inserción son muy abundantes en los plásmidos nativos de *P. syringae* (Jackson *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001; Bardaji *et al.*, 2011b) son activas (Bardaji *et al.*, 2011a) y generan variantes de los



plásmidos, mediante su transposición o recombinación, facilitando la pérdida o adquisición de nuevo ADN (Capítulo 3, Jackson *et al.*, 2011; Siguier *et al.*, 2014). El hecho que este fragmento este flanqueado por trazas de secuencias de inserción permite especular sobre una posible adquisición de este tándem mediada por la actividad de las secuencias de inserción. Desafortunadamente, los genomas de la base de datos que contienen este fragmento de ADN no están ensamblados por lo que no se puede determinar la naturaleza plasmídica o cromosómica del segmento ni indagar sobre el origen evolutivo de este fragmento implicado en la virulencia de estos patógenos.

De todas maneras, la conservación de este tándem en estos patovares de *P. syringae*, sugiere que PSPSV\_C0023 podría estar también involucrado en la biosíntesis de CKs. Sin embargo éste no parece ser el caso. El derivado curado de pPsv48C fue complementado con una construcción que contenía al gen *idi* exclusivamente, y con una construcción que contenía al binomio *idi* y PSPSV\_C0023. Todas las complementaciones resultaron en idéntico fenotipo, con tumores estadísticamente similares en volumen y peso a los observados en plantas inoculadas con la cepa silvestre y con la cepa complementada con pPsv48C. Estos resultados sugieren que es tan solo el gen *idi* el responsable del fenotipo producido por el plásmido pPsv48C.

Como ocurre con pPsv48A, el derivado que solamente contiene al plásmido pPsv48C (Psv48 $\Delta$ AB) no indujo tumores aparentes, como ya se reportó anteriormente (Bardaji *et al.*, 2011b). Los productos deducidos de *idi* y *ptz* parecen incidir por tanto en distintos eslabones de la misma cadena de producción, o ruta de biosíntesis, de las CKs. Aunque existen sustratos alternativos a DMAPP que la enzima isopentenil transferasa puede utilizar para la producción de CKs (Sakakibara, 2006), en el caso de *Ps. pv. savastanoi* este compuesto podría ser el sustrato predilecto de la enzima, ya que la inducción de la formación de tumores en planta está supeditada a la acción conjunta de ambos productos génicos. Mutar *idi* o mutar *ptz* resulta en idéntico fenotipo, idéntico a su vez al fenotipo producido por la mutación de ambos genes de manera conjunta.

Los fenotipos mostrados por los derivados que no contienen a pPsv48A o a pPsv48C fueron comparables a los producidos por el derivado que no contiene plásmidos, y estos a su vez estadísticamente comparables a los fenotipos mostrados por los mutantes defectivos. En todos estos casos, las plantas lignificadas desarrollan un tumor generalmente de tamaño no superior a los 36 mm<sup>3</sup>, pero que siempre resultaba en un hiper desarrollo visible del tejido. Mutantes defectivos en genes implicados en otros factores de virulencia, mostraban fenotipos que se definieron como “ausencia del

tumor” donde se puede observar como en la zona de inoculación está el tejido vegetal nada hiper desarrollado (Aragón *et al.*, 2014). Por lo tanto, se puede deducir que, aunque muy mermada, NCPPB 3335 mantiene la capacidad de producir tumor aun cuando no contiene a *idi*, a *ptz*, ni a su complemento de plásmidos nativos.

Esto podría significar que estos derivados todavía producen CKs en cantidades detectables por la planta debido a que existe en esta cepa una ruta alternativa a los alelos plasmídicos de *idi* o *ptz* para la biosíntesis de CKs, codificada por genes cromosómicos. Una hipótesis alternativa implicaría que las cepas mutantes no producen CKs en cantidades suficientes, pero que el tumor residual desarrollado se debería al efecto del ácido-3-indolacético (IAA) que la bacteria sintetiza y que se ha demostrado es esencial tanto para la inducción de tumores como para la supervivencia y colonización bacteriana en el interior del tumor (Smidt and Kosuge, 1978; Comai and Kosuge, 1980; Surico *et al.*, 1985; Iacobellis *et al.*, 1994). Los mutantes en los genes *iaaMH* (esenciales en la síntesis de IAA) no indujeron tumor (Aragón *et al.*, 2014), por lo que las plantas no desarrollaron protuberancia alguna, aun cuando los genes *ptz* e *idi* estaban presentes en el genoma. Esto podría estar indicando una relación de interdependencia entre la producción bacteriana de auxinas y CKs, como sugieren autores que sostienen que la transcripción de *ptz* es dependiente de la concentración de auxinas (Scott and Horgan, 1984). En ensayos independientes se está realizando la cuantificación de las diversas CKs producidas por cada uno de los derivados de NCPPB 3335 incluidos en este capítulo, que permitirá esclarecer este punto.

La supervivencia de cada derivado de NCPPB 33335 fue analizada mediante la cuantificación de las poblaciones bacterianas dentro del tumor (Fig. 6). En estudios anteriores, la densidad poblacional que alcanzó la cepa silvestre en olivos micropropagados se situó en torno a  $10^7$  células por tumor (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009; Matas *et al.*, 2012) similar a los valores que se alcanzaron en este estudio, suponiendo un incremento poblacional muy notable, teniendo en cuenta el inóculo inicial ( $10^3$  ufc). Curiosamente este incremento no se observa en los ensayos de patogenicidad donde el inóculo inicial es de  $10^6$  ufc y las poblaciones a los 90 días post inoculación alcanzan valores máximos de  $10^7$  ufc por tumor. Otros estudios recuperan poblaciones muy similares en tumores de olivo lignificado (Matas *et al.*, 2012; Caballo-Ponce *et al.*, 2017), sugiriendo que éste debe ser el tamaño poblacional máximo que alcanza este patógeno en los tumores, independientemente del tamaño final del tumor. Por esta razón, los valores poblacionales en olivo adulto no permiten discernir con mucha precisión la dinámica poblacional, en el interior de los tumores, a no ser que el patógeno sufra un declive en su supervivencia. Ninguno de los derivados ensayados alcanza las

poblaciones de la cepa silvestre, básicamente se mantienen en los niveles poblacionales iniciales, sin experimentar grandes cambios (Fig. 8).

En otros ensayos realizados, los mutantes en diversos genes de virulencia, como en el caso de mutantes defectivos en los genes *hrpR* (regulador transcripcional del T3SS) e *ilvC* (codifica para cetoácido reductoisomerasa) sufrían un decrecimiento drástico de sus poblaciones (Matas *et al.*, 2012), que se relacionaba con la falta de la fluorescencia verde en el interior de los tumores, al analizarlos por microscopía de epifluorescencia. Podemos afirmar, que éste no es el caso de los derivados de NCPPB 3335 a los que les faltan factores determinantes en la producción de CKs, sugiriendo que estas moléculas no están directamente involucradas en incrementar la capacidad de supervivencia y colonización de la bacteria. El efecto de las CKs en el tejido vegetal, provoca el retraso de la senescencia y genera un efecto sumidero de la zona de infección, que dota a la bacteria de mayor cantidad de nutrientes (Ma and Ma, 2016) y por lo tanto, intuitivamente uno pensaría, que las CKs repercuten directamente en la proliferación de las poblaciones bacterianas. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo no señalan a las CKs como las encargadas de este efecto, sino que podrían ser las auxinas, presentes también en la zona de infección, las responsables de la supervivencia de la bacteria en el interior del tumor. Estas observaciones apoyan las conclusiones alcanzadas por otros autores (Iacobellis *et al.*, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008; Bardaji *et al.*, 2011b; Aragón *et al.*, 2014), que postularon que la biosíntesis de CKs no es esencial en la patogénesis de *Ps pv. savastanoi*, aunque son requeridas para el desarrollo total de la enfermedad.

## Material y métodos

### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Las cepas de *Pseudomonas* se propagaron de forma rutinaria a 26 °C en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) o en agar nutritivo (NA; Oxoid) que en ocasiones fue suplementado con 5% (p/v) de sacarosa (medio SNA). *Escherichia coli* NEB10 $\beta$  (New England BioLabs) se utilizó para los experimentos de clonación y fue cultivada de forma rutinaria en medio LB a 37 °C. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se complementaron con los siguientes antibióticos (concentraciones finales expresadas en  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para las cepas de *Pseudomonas/E. coli*) kanamicina (km) 7/50, tetraciclina (Tc) 12,5, gentamicina (Gm) 10, ampicilina (Amp) 300/100 y nitrofurantoína (Nf) 100.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa/plásmido	Características	Fuente o referencia
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
NEB10 $\beta$	$\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrB)$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU</i> <i>galk</i> $\lambda^-$ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i></b>		
NCPPB 3335	Sinónimo Psv48; aislada de un tumor de olivo ( <i>Olea europaea</i> ), Francia; contiene los plásmidos (pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C)	NCPPB <sup>a</sup>
Psv48 $\Delta$ AB	NCPPB 3335 curada de pPsv48A y pPsv48B	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
UPN508	NCPPB 3335 con pPsv48A ::Tn5-GDYN1-1	(Pérez-Martínez, 2007)
UPN516	NCPPB 3335 con pPsv48C::Tn5-GDYN1-1	(Pérez-Martínez, 2007)
UPN877	Cepa Psv48 $\Delta$ AB con pPsv48C::Tn5-GDYN1-2	Este trabajo
UPN878	NCPPB 3335 con pPsv48C::Tn5-GDYN1-2	Este trabajo
UPN912	NCPPB 3335 curada de pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C	Este trabajo
UPN954	NCPPB 3335 curada de pPsv48C, mantiene un fragmento de 4,8 kb del plásmido (pos. 27019-31852)	Este trabajo
UPN956	Psv48 $\Delta$ AB con pPsv48A ::Tn5-GDYN1-1	Este trabajo
UPN958	UPN912 con pPsv48A ::Tn5-GDYN1-1	Este trabajo
UPN1022	NCPPB 3335 $\Delta$ <i>idi</i>	Este trabajo

UPN1024	UPN1022 con p31idi	Este trabajo
UPN1028	NCPPB 3335 $\Delta$ ptz	(Pintado, 2014)
UPN1029	UPN1028 con pIMPptz	(Pintado, 2014)
UPN1030	NCPPB 3335 $\Delta$ ptz $\Delta$ idi ; doble mutante	Este trabajo
UPN1032	UPN1030 con p31idiptz	Este trabajo
UPN1036	UPN912 con p31idiptz	Este trabajo
UPN1040	Psv48 $\Delta$ AB $\Delta$ idi	Este trabajo
UPN1160	UPN954 con p41idi	Este trabajo

### Plásmidos

pDR1	Vector donador de Tn5-GDYN1, basado en pSUP2021; Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> ;	(Flores <i>et al.</i> , 1993)
pPsv48A	Plásmido nativo de NCPPB 3335, 80 kb; <a href="#">FR820585</a>	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48A::Tn5-GDYN1-1	pPsv48A con una inserción de Tn5-GDYN1 en posición 1469	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48B	Plásmido nativo de NCPPB 3335, 45 kb; <a href="#">FR820586</a>	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48C	Plásmido nativo de NCPPB 3335, 42 kb; <a href="#">FR820587</a>	(Bardaji <i>et al.</i> , 2011b)
pPsv48C::Tn5-GDYN1-1	pPsv48C con una inserción de Tn5-GDYN1 en posición 37036	Este trabajo
pPsv48C::Tn5-GDYN1-2	pPsv48C con una inserción de Tn5-GDYN1 en posición 7433	Este trabajo
pPsv48C $\Delta$ idi	pPsv48C con gen <i>idi</i> delecionado; Sp <sup>R</sup>	Este trabajo
pPsv48A $\Delta$ ptz	pPsv48A con gen <i>ptz</i> , delecionado; Km <sup>R</sup>	C. Ramos

pRK415	Vector de clonación replicativo en <i>Pseudomonas</i> ; 10.5 kb, Tc <sup>R</sup>	(Keen <i>et al.</i> , 1988)
pRK3C	pRK415 con los genes PSPSV_C0003, PSPSV_C0008 y PSPSV_C0050	Este trabajo
pME6041	Vector de clonación, 5.6 kb; Km <sup>R</sup>	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)
p41idi	pME6041 con gen <i>idi</i> clonado; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pME6031	Vector de clonación, 8.3 kb; Tc <sup>R</sup>	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)
p31idi	pME6031 con gen <i>idi</i> clonado; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
p31idiptz	pME6031 con genes <i>idi</i> y <i>ptz</i> ; Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pLRM1-GFP	pBBR-MCS5::GFP; pBBR1-MCS5::P <sub>A1/04/03</sub> -RBSII-GFPmut3*-T0-T1; Gm <sup>R</sup>	(Rodríguez-Moreno <i>et al.</i> , 2009)
pIPMptz	pBBR1MCS-5 con gen <i>ptz</i> ; Gm <sup>R</sup>	C. Ramos
pBlueScript II SK	Vector de clonación, 2.96 kb; Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pGEM-T Easy	Vector de clonación de amplicones de PCR; 3 kb; Amp <sup>R</sup>	Promega
pJET1.2	Vector de clonación; para amplicones con extremos romos, generados con polimerasas de alta fidelidad; 2.9 kb; Amp <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific
pHP45Ω	Fuente del casete Sp <sup>R</sup> , 2 kb	(Prentki and Krisch 1984)

<sup>a</sup> National collection of Plant Pathogenic bacteria, York , United Kingdom.

## Técnicas moleculares y bioinformática

La extracción de ADN plasmídico de las cepas nativas de *Pseudomonas* se realizó mediante lisis alcalina (Zhou *et al.*, 1990). Los plásmidos de *E. coli*, se extrajeron siguiendo la técnica de lisis por hervido (boiling lysis method; Holmes and Quigley, 1981a) o usando un kit comercial (Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare). Los plásmidos sin digerir se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al

0,8% (Sesma *et al.*, 1998). Los plásmidos se transfirieron a *P. syringae* mediante electroporación (Choi *et al.*, 2006). La amplificación de diversos fragmentos de ADN se realizó de manera rutinaria utilizando una polimerasa estándar (BIOTaq, Bioline, UK) o de alta fidelidad (PrimeStar HS, Takara Bio Inc., Japan). Los amplicones purificados con el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) fueron clonados en el vector pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit; Thermo Scientific) o en pGEM-T Easy (Promega). La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó siguiendo el método Sanger en la empresa MacroGen Inc. (Amsterdam). El ADN genómico se extrajo empleando el kit comercial Jet Flex Extraction (Genomed; Löhne, Germany) y se secuenció en la empresa MacroGen Inc. (Amsterdam).

La secuencias se visualizaron y manipularon empleando los programas Artemis y ACT (Carver *et al.*, 2008). Las comparaciones de secuencias y la búsqueda de proteínas homologas se realizó empleando los algoritmos de BLAST (Hubbard *et al.*, 2008). 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/>). Los cebadores fueron diseñados con el software Primer3plus (Untergasser *et al.*, 2012).

**Tabla 2.** Lista de cebadores empleados.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición 5' <sup>a</sup>	Comentarios
<b>Construcción de mutante <i>idi</i> y complementación</b>			
ptz_F	AAGACCCATACTGGTGCGATAG	26857*	PCR de comprobación
ptz_R	CCGCAACCAACTCGTCTAAC	26714	PCR de comprobación
ptz_F1	GAATTCAATATGCTGAGCCTGGCAGA	27747*	Amplificación gen <i>ptz</i>
ptz_R1	GAATTCCTATGCCGATTGAAAGCAT	26376	Amplificación gen <i>ptz</i>
ipt_F1	TGATCAGCGTGGACATTAGC	18314	PCR de comprobación
iptC_F	AGCGCTTGAGCTTTTACTG	17895	Amplificación gen <i>idi</i>
iptC_R	CAGAAATCTGCCCGAGAAAC	19011*	Amplificación gen <i>idi</i>
iptSAM_F	TTTTGCCAAATCAGGAAGTC	16701	Amplificación gen PSPSV_C0023
mutipt_F	AGATTCATCGTTCGAGGCC	16836	Construcción de mutante <i>idi</i>
mutipt_R	CCTTCCTGAGTACGAGTCGC	20229*	Construcción de mutante <i>idi</i>
<b>Otros cebadores</b>			
IS50_F	ACACAGATTTAGCCAGTCG		Identificación de las inserciones de Tn5-GDYN1

<sup>b</sup> Zona de unión en la secuencia del plásmido pPsv48C (nº acceso: FR820587). Los asteriscos indican que el cebador anilla en la cadena reversa de ADN.

### Curación del plásmido pPsv48C

Psv48 $\Delta$ AB fue mutagenizada al azar empleando el transposón Tn5-GDYN1. Éste fue introducido por conjugación, empleando como donadora la cepa *E. coli* S17.1 que contiene el vector pDR1 (Flores *et al.*, 1993). Los transconjugantes se seleccionaron en medio LB suplementado con kanamicina y nitrofurantoina. Se identificaron aquellas cepas que contenían el transposón en el plásmido pPsv48C porque éste mostraba un retraso en su migración en geles de agarosa. La posición de las inserciones de Tn5-GDYN1 se identificó mediante secuenciación de fragmentos EcoRI que conferían resistencia a gentamicina (casete de Tn5-GDYN1). La lectura de la secuencia se realizó con el cebador IS50\_F que anilla en el transposón y que está dirigido hacia el ADN que lo flanquea (Tabla 1). Una de las cepas marcadas con el transposón (UPN877, ver Tabla 1) fue transformada con el vector pRK3C, que anula los sistemas TA funcionales del plásmido (ver capítulo 3). Seis cepas resultantes de transformaciones independientes fueron cultivadas en medio líquido con selección de tetraciclina (del vector pRK3C) y posteriormente sembradas en SNA. Se analizó el perfil plasmídico de las colonias resultantes, susceptibles de haber perdido pPsv48C.

### Delección de genes de biosíntesis de citoquininas

El gen *idi* se eliminó de pPsv48C mediante la técnica del intercambio alélico. Empleando los cebadores mutipt\_F/R (tabla 2) se clonó un fragmento de 3394 nucleótidos, que contenía el gen *idi*, en el vector suicida pJET 2.1 (Amp<sup>R</sup>). Esto se digirió posteriormente con las enzimas de restricción SpeI y SmaI, liberándose así el gen de interés, y en su lugar se ligó un casete de resistencia a espectinomicina. La construcción resultante se transfirió mediante electroporación a la cepa silvestre y a la cepa Psv48 $\Delta$ AB. Aquellos transformantes que habían incorporado el casete de resistencia fueron cultivados en medio líquido sin selección. Tras varias transferencias, se sembraron las cepas y se seleccionaron aquellas que mantenían el casete (Sp<sup>R</sup>) pero que habían perdido el vector y eran, por lo tanto, Amp<sup>S</sup>. Los mutantes se comprobaron mediante PCR empleando los cebadores iptC\_F/mutipt\_R (Tabla 2). Los mutantes fueron complementados con una copia del gen *idi* con su promotor, o con una copia de *idi* más el gen adyacente PSPSV\_C0023, clonados en el vector pME6041 (Tabla 1), detrás de un terminador de la transcripción. Los cebadores empleados para ello se indican en la Tabla 2. Con el fin de obtener un mutante doble para los genes *idi* y *ptz*, se transformó la cepa UPN1028 (NCPPB 3335 $\Delta$ ptz (Km<sup>R</sup>); Pintado, 2014) con el plásmido pPsv48C $\Delta$ *idi*, y los transformantes se seleccionaron en medio suplementado con Sp y Km. Se comprobó la pérdida de ambos genes mediante PCR (ptz\_F/R, ptz\_F1/R1; iptC\_F/mutipt\_R, ipt\_F1/iptC\_R, Tabla 2). La cepa obtenida fue, UPN1030 (NCPPB 3335 $\Delta$ ptz $\Delta$ *idi*). El



plásmido p31idiptz, que contiene los genes *ptz* e *idi* en el vector pME6031 (Tabla 1), se transformó en esta cepa, con el fin de complementar y restablecer el fenotipo.

### Ensayos de patogenicidad en plantas de olivo

Las plantas empleadas en los ensayos *in vitro* pertenecen al cultivar Arbequina. Estas fueron micropropagadas y enraizadas en el medio DKW (Driver and Kuniyuki, 1984). Posteriormente, las plantas ya enraizadas fueron transferidas a medio DKW sin hormonas y mantenidas a 25 °C con un fotoperiodo de 16h y una intensidad lumínica de 35  $\mu\text{moles} \times \text{m}^2/\text{s}$  durante por lo menos dos semanas. Las plantas fueron inoculadas, en condiciones de esterilidad, una vez hubieron alcanzado de 60 a 80 mm de longitud y contenían de tres a cinco fragmentos internodales. Se emplearon cultivos bacterianos provenientes de placas de LB de 48h que se resuspendieron en 10mM de  $\text{MgCl}_2$ , hasta alcanzar un valor de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.5. Las cepas empleadas fueron previamente transformadas con el vector pLRM1-GFP ( $\text{Gm}^R$ ) que expresa la proteína verde fluorescente y que permite monitorizar al patógeno durante la infección, mediante microscopía de epifluorescencia, técnica previamente descrita por Rodríguez-Moreno *et al.* (2009). Aproximadamente  $10^3$  ufc fueron aplicadas sobre una incisión realizada en el tallo de cada planta a testar. Las plantas inoculadas se incubaron en una cámara de crecimiento en las condiciones anteriormente descritas. Los síntomas se valoraron a los 28 días post-inoculación. La morfología de las plantas de olivo infectadas se visualizó utilizando un microscopio estereoscópico (Leica MZ FLIII; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Los análisis de la patogenicidad de *Ps pv. savastanoi* en olivo adulto se realizaron en plantas lignificadas de al menos un año de edad. Con ayuda de un bisturí se realizaron heridas en la zona del Cambium de la planta que posteriormente se inocularon con una suspensión bacteriana que contenía  $10^6$  ufc, como previamente se había descrito (Penyalver *et al.*, 2006; Pérez-Martínez *et al.*, 2007; Matas *et al.*, 2012). Las plantas se mantuvieron en un invernadero a temperatura media de 27 °C y 58 % de humedad relativa bajo luz natural. Los síntomas característicos de la enfermedad se desarrollaron tras 90 dpi. Los cambios morfológicos fueron capturados con una cámara digital de alta resolución (Canon D600; Canon Inc., Tokyo, Japan).

La virulencia de NCPPB 3335 en plantas de olivo se cuantificó a partir de valores de peso y el volumen del tumor. En el caso de olivos adultos el volumen se obtuvo mediante el cálculo de la longitud, la anchura y la profundidad del tumor utilizando un calibre electrónico (Moretti *et al.*, 2008; Hosni *et al.*, 2011). En olivos *in vitro* el volumen de los tumores se obtuvo mediante medición en escáner 3D y utilizando los software 3D

Editor y Netfabb 6.4.0. No se analizó el peso de los tumores desarrollados en plantas micropropagadas. Para estimar las poblaciones bacterianas, los tumores de plantas micropropagadas y lignificadas se homogenizaron en una suspensión 10mM de  $MgCl_2$  y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de LB suplementadas con el antibiótico oportuno. Se estimaron las poblaciones bacterianas de 3 réplicas independientes. Los análisis estadísticos, ANOVA y Test Duncan ( $P=0.05$ ) se realizaron con el software R Project 3.3.3 (R Core Team (2017); Vienna, Austria).

## Material suplementario

**Tabla S1.** Contenido génico de las cepas utilizadas en los ensayos de inoculación.

Cepa	Plásmidos			Genotipo	
	A	B	C	<i>ptz</i>	<i>idi</i>
<b><i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i></b>					
NCP PB 3335	+	+	+	+	+
Psv48ΔAB	-	-	+	-	+
UPN912	-	-	-	-	-
UPN954	+	+	*	+	-
UPN956	+	-	+	+	+
UPN958	+	-	-	+	-
UPN1022	+	+	+	+	-
UPN1024	+	+	+	+	+
UPN1028	+	+	+	-	+
UPN1029	+	+	+	+	+
UPN1030	+	+	+	-	-
UPN1032	+	+	+	+	+
UPN1036	-	-	-	+	+
UPN1040	-	-	+	-	-
UPN1160	+	+	*	+	+

\* NCP PB 3335 curada de pPsv48C, aunque mantiene un fragmento de 4.8 kb del plásmido (pos. 27019-31852)



## Discusión general

Los plásmidos son los principales responsables del intercambio de genes o secuencias entre organismos confiriendo ventajas adaptativas y como consecuencia favoreciendo su evolución (Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007; Jackson *et al.*, 2011). Además, portan gran cantidad de elementos genéticos móviles, destacando el papel de las secuencias de inserción que debido a su abundancia, son una fuente de potenciales intercambios.

En el capítulo 2 de esta Tesis hemos demostrado que los replicones de *Pseudomonas* están compuestos por módulos independientes fácilmente intercambiables entre sistemas no relacionados, definidos como: REx-C y REx-R (replicon exchangeable) implicados en Control y Replicación respectivamente (Bardaji *et al.*, 2017a). El módulo REx-C contiene tres estructuras SaL (Stem and Loop), un péptido líder, un ARN antisentido y las señales necesarias para la transcripción y traducción del gen *rep*. Es muy probable que este módulo se encargue de regular el número de copia del plásmido mediante el ARN antisentido (del Solar *et al.*, 1998a; Brantl, 2014b). Hemos demostrado la falta de especificidad del módulo REx-C por el módulo REx-R, habiéndose intercambiado entre cuatro familias no homólogas de replicones pertenecientes a *Pseudomonas* (familias RepA-PFP y RepJ), siendo totalmente funcionales. Este intercambio presenta importantes ventajas evolutivas, como por ejemplo hacer funcional un gen *rep* que se encontraba inactivo en el cromosoma de la cepa NCPPB 3335 (PSA3335\_1080). Hemos visto como una delección que afecta al péptido líder (*repI*) en el replicón RepJ del plásmido pPsv48C, no presenta ningún efecto en la replicación; sin embargo, mediante mutagénesis dirigida de *repJ*, PSA3335\_1080 y *repA*-PFP (Gibbon *et al.*, 1999) se ha demostrado que esos genes son esenciales en replicación. El análisis de los replicones quiméricos indica que la incompatibilidad entre plásmidos muy similares en su estructura dentro de una misma célula, es debida al módulo REx-C. Por lo tanto, el intercambio de estos módulos REx-C puede ser una manera rápida y sencilla de reducir o eliminar posibles incompatibilidades entre plásmidos PFP (muy relacionados) que portan genes que confieren importantes ventajas adaptativas (Vivian *et al.*, 2001; Sundin, 2007).

El plásmido pPsv48C posee dos replicones, RepA-PFP y RepJ, identificado y caracterizado en este trabajo (Bardaji *et al.*, 2017a). Los datos obtenidos muestran que ambos son funcionales, sin embargo, RepJ confiere mayor estabilidad que RepA. Mediante ensayos de estabilidad con los replicones quiméricos, hemos demostrado que la estabilidad depende en gran medida de la actividad de la proteína Rep, pero puede ser modulada por el módulo de control REx-C. Además del replicón, los plásmidos

disponen de mecanismos que facilitan su mantenimiento en la población. Estos determinantes de mantenimiento se agrupan en tres clases: sistemas de partición, resolución de multímeros y sistemas toxina-antitoxina. En el capítulo 3, hemos identificado y testado 15 determinantes de mantenimiento presentes en los plásmidos nativos de NCPPB 3335, de los cuales 3 de pPsv48A y 3 de pPsv48C retienen el vector pKMAG-C (Bardaji *et al.*, 2017a) en más de un 50% de las células. Todos ellos son sistemas TA y actúan manteniendo la estructura e integridad de los plásmidos. Prueba de ello es que un sistema TA (TA8) en pPsv48C evita que se produzca una delección de un fragmento de 8.3 kb mediada por recombinación entre dos copias idénticas de MITE<sub>Psy2</sub>. Por otro lado, hemos demostrado que CRR1 (isoforma de IS801) genera transposiciones terminales (Richter *et al.*, 1998; Bardaji *et al.*, 2011a), que se inician en su extremo derecho y terminan a una distancia variable del extremo 5', produciendo plásmidos que se replican autónomamente debido a RepJ y que contienen delecciones de tamaño variable. En concordancia con otros estudios realizados en nuestro grupo de investigación (Bardaji *et al.*, 2011a), hemos observado como CRR1 al transponerse es capaz de movilizar ADN adyacente a él, terminando la transposición (en este estudio) en los tetranucleótidos: CAAG o GAAC. La inactivación funcional de los tres sistemas TA de pPsv48C da lugar a un aumento promedio de tres veces en la frecuencia de las delecciones, de las cuales el 80 % ha perdido el gen *idi*. En conjunto, nuestros resultados indican que CRR1 genera variantes plasmídicas de delección con alta frecuencia, y que la posesión de tres sistemas TA favorece la preservación de la estructura del plásmido y la retención de un gen de virulencia esencial para la producción de enfermedad. Además, los sistemas TA presentes en pPsv48A previenen la ocurrencia de delecciones plasmídicas originadas por CRR1 ya sea por recombinación entre copias del elemento o por transposición terminal del derivado de IS801. Por el contrario, en pPsv48B no hemos encontrado nada que esté confiriéndole alta estabilidad, lo cual es bastante difícil de explicar ya que en los plásmidos de bajo número de copia es frecuente encontrar determinantes de mantenimiento (Nordström and Austin, 1989). Podría ocurrir que en plásmido pPsv48B se encuentre presente alguna toxina o antitoxina "solitaria" y que su pareja se encuentre en otro plásmido de NCPPB 3335 o en el cromosoma. En estudios anteriores se describió asimetría en la distribución de ISs en los plásmidos de la cepa 1448A *P. syringae* pv. phaseolicola y en nuestra cepa de estudio, NCPPB 3335 (Bardaji *et al.*, 2011b). Puede ser, que tanto 1448A-B como pPsv48B (donde el 3% de 52 kb y el 4% de 45 kb pertenecen a ISs respectivamente) tengan un papel más destacado en supervivencia que en virulencia y de ahí su bajo contenido en ISs (Bardaji *et al.*, 2011b). De hecho ambos plásmidos contienen un sistema de secreción tipo IV.

Es frecuente la asociación de ISs con genes de virulencia, ya que ayudan a su intercambio entre organismos favoreciendo su adaptabilidad y evolución. Por ello, si nos fijamos en el contenido en ISs de pPsv48C donde un tercio de su tamaño corresponde a estos elementos, podríamos deducir su papel en virulencia; en el capítulo 4 de esta Tesis hemos confirmado dicha hipótesis, demostrando su implicación en patogénesis. El plásmido pPsv48C es altamente estable debido a que presenta dos orígenes de replicación funcionales (RepA-PFP y RepJ) y a que porta tres sistemas toxina-antitoxina que le ayudan a mantener su estructura e integridad. Este puede ser el motivo por el cual no había sido posible la obtención de un derivado curado de dicho plásmido. Mediante inactivación funcional de estos sistemas de mantenimiento de pPsv48C, hemos obtenido la cepa UPN912, curada de los tres plásmidos nativos y que no desarrolla tumores en plantas de olivo, quedando patente la contribución de los plásmidos en virulencia. Además hemos demostrado que los tres plásmidos nativos de NCPPB 3335, en mayor o menor grado, son virulentos. Hasta la fecha sólo conocíamos la implicación del plásmido pPsv48A en virulencia, ya que inoculaciones artificiales en olivo con una cepa curada de dicho plásmido, producían síntomas significativamente menos severos que la cepa silvestre (Bardaji *et al.*, 2011b).

Aunque la producción de CKs está muy extendida entre las bacterias fitopatógenas productoras de tumores, la ruta no ha sido caracterizada con detalle; siendo *ptz* el único gen descrito de esta ruta (Surico *et al.*, 1985; Morris, 1986). La obtención de cepas con los genes *ptz* e *idi* mutados de manera independiente, nos ha permitido demostrar su implicación en el desarrollo de tumores en olivo. Además, con la generación de un doble mutante ( $\Delta ptz\text{-}\Delta idi$ ) se hace evidente que ambos genes son esenciales para la producción de tumores *in planta*, ya que esta cepa no produce tumores. Aunque la cepa NCPPB 3335 con los genes *ptz* e *idi* mutagenizados produce tumores significativamente más pequeños que la cepa silvestre, se produce un tumor residual que podría ser el resultado de los genes productores de auxinas presentes en el cromosoma. También cabe la hipótesis de que existan vías alternativas de síntesis de CKs en las que participen genes con función homóloga a *ptz* e *idi* y sean de localización cromosómica. La población bacteriana no ha sufrido grandes fluctuaciones en las cepas con los genes de biosíntesis de CKs mutados; de hecho, en olivo lignificado las poblaciones se han mantenido similares a la cepa silvestre. Esto se relaciona con la distribución bacteriana uniforme a lo largo de todo el tumor, ya que los tumores generados por las distintas cepas inoculadas producen el mismo patrón de emisión de fluorescencia. Por lo tanto, nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos anteriormente que demostraron que para la formación de tumores y la multiplicación de la bacteria en los

tejidos vegetales es suficiente con la expresión de los genes *iaa* (Iacobellis *et al.*, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009; Bardaji *et al.*, 2011b; Aragón *et al.*, 2014). Además, estamos a la espera de conocer el tipo y cantidad de CKs producidas por las cepas incluidas en nuestros ensayos, lo cual puede ser una información valiosa para conocer el funcionamiento de la ruta de biosíntesis bacteriana de CKs en *Ps. pv. savastanoi*.



## Conclusiones

1. El plásmido nativo pPsv48C de *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335 contiene un segundo origen de replicación, que hemos denominado RepJ.
2. Los replicones de *Pseudomonas syringae* están compuestos por módulos independientes, REx-C y REx-R (Replicon Exchangeable) implicados en Control y Replicación respectivamente. La incompatibilidad entre replicones similares reside en el módulo REx-C.
3. Hemos demostrado falta de especificidad del módulo REx-C por el módulo REx-R siendo fácilmente intercambiables y funcionales entre cuatro familias no homólogas de replicones de *Pseudomonas*.
4. La isoforma de IS801, CRR1 genera variantes plasmídicas de delección con alta frecuencia, ya sean fruto de la recombinación entre copias del elemento o por transposición. Además, CRR1 es capaz de movilizar hasta 42 kb de ADN adyacente.
5. La presencia de múltiples sistemas toxina-antitoxina en plásmidos nativos de la cepa NCPPB 3335 cumple diversas funciones: reduce entre 3 y 50 veces la generación de delecciones o reorganizaciones mediadas por elementos repetitivos móviles, aumenta en dos órdenes de magnitud la estabilidad del plásmido pPsv48A, y contribuye la retención de genes de virulencia plasmídicos.
6. Hemos obtenido una cepa curada de plásmidos, UPN912, que no produce tumores en plantas de olivo, poniendo de manifiesto el papel en virulencia del ADN cargo presente en los plásmidos.
7. Los tres plásmidos nativos de la cepa NCPPB 3335 son plásmidos de virulencia aunque muestran una contribución diferencial a la virulencia.
8. El gen *idi*, codificado en el plásmido pPsv48C, es esencial para la producción de tumores de tamaño silvestre *in planta*, posiblemente contribuyendo a la biosíntesis de citoquininas.



## Referencias

- Abeleira, A., López, M., Peñalver, J., Aguin, O., Mansilla, J., Picoaga, A., and García, M. (2017) First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Phytopathology* **107**: 184-191.
- Agapakis, C.M., and Silver, P.A. (2009) Synthetic biology: exploring and exploiting genetic modularity through the design of novel biological networks. *Mol Biosyst* **5**: 704-713.
- Agrios, G.N. (2005) *Plant pathology*. San Diego, USA: Elsevier Academic Press.
- Alarcón-Chaidez, F.J., Peñaloza-Vázquez, A., Ullrich, M., and Bender, C.L. (1999) Characterization of plasmids encoding the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae*. *Plasmid* **42**: 210-220.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414.
- Aragon, I.M., Pérez-Mendoza, D., Moscoso, J.A., Faure, E., Guery, B., Gallegos, M.T., Filloux, A., and Ramos, C. (2015) Diguanylate cyclase DgcP is involved in plant and human *Pseudomonas* spp. infections. *Environ Microbiol* **17**: 4332-4351.
- Aragón, I.M., Pérez-Martínez, I., Moreno-Pérez, A., Cerezo, M., and Ramos, C. (2014) New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *FEMS Microbiol Lett* **356**: 184-192.
- Aragón, I.M., Pérez-Mendoza, D., Gallegos, M.T., and Ramos, C. (2015) The c-di-GMP phosphodiesterase BifA is involved in the virulence of bacteria from the *Pseudomonas syringae* complex. *Mol Plant Pathol* **16**: 604-615.
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Fillingham, A.J., Goss, S.C., Taylor, J.D., Mansfield, J.W., and Vivian, A. (2001) Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *psis*. *Microbiology* **147**: 1171-1182.
- Austin, S., Ziese, M., and Sternberg, N. (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**: 729-736.
- Aviv, G., Rahav, G., and Gal-Mor, O. (2016) Horizontal transfer of the *Salmonella enterica* serovar Infantis resistance and virulence plasmid pESI to the gut microbiota of warm-blooded hosts. *mBio* **7**: e01395-01316.
- Backert, S., and Meyer, T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207-217.
- Barciszewski, J., Rattan, S.I., Siboska, G., and Clark, B.F. (1999) Kinetin—45 years on. *Plant Science* **148**: 37-45.
- Bardaji, L., Añorga, M., Jackson, R.W., Martínez-Bilbao, A., Yanguas, N., and Murillo, J. (2011a) Miniature transposable sequences are frequently mobilized in the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS ONE* **6(10)**: e25773.
- Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Rodríguez-Palenzuela, P., Sundin, G.W., Ramos, C., and Murillo, J. (2011b) 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**: e25705.
- Bardaji, L., Añorga, M., Ruiz-Masó, J.A., Del Solar, G., and Murillo, J. (2017a) Plasmid replicons from *Pseudomonas* are natural chimeras of functional, exchangeable modules. *Front Microbiol* **8**.
- Bardaji, L., Echeverría, M., Rodríguez-Palenzuela, P., Martínez-García, P.M., and Murillo, J. (2017b) Four genes essential for recombination define GI<sub>nts</sub>, a new type of mobile genomic island widespread in bacteria. *Scientific Reports* **7**.
- Bartoli, C., Carrere, S., Lamichhane, J.R., Varvaro, L., and Morris, C.E. (2015) Whole-genome sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* strains representing different host range spectra. *Genome announcements* **3**: e00379-00315.
- Baxter, J.C., and Funnell, B.E. (2014) Plasmid partition mechanisms. *Microbiol Spectr* **2**.
- Bennett, P.M. (2004) Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. In *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews*. Woodford, N. and Johnson, A.P. (eds). Totowa, NY: Humana Press, pp. 71-113.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., and 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**: e105547.

- Blomberg, P., Nordström, K., and Wagner, E.G. (1992) Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J* **11**: 2675-2683.
- Blower, T.R., Short, F.L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X.Y., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P. (2012) Identification and classification of bacterial Type III toxin–antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res* **40**: 6158-6173.
- Bouet, J.Y., Nordström, K., and Lane, D. (2007) Plasmid partition and incompatibility—the focus shifts. *Mol Microbiol* **65**: 1405-1414.
- Bradbury, J.F. (1986) *Guide to plant pathogenic bacteria*: CAB international.
- Brantl, S. (2014a) Plasmid replication control by antisense RNAs. *Microbiol Spectr* **2**: PLAS-0001-2013.
- Brantl, S. (2014b) Plasmid replication control by antisense RNAs. *Microbiol Spectr* **2**.
- Bruand, C., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., and Janniere, L. (1993a) A fourth class of theta-replicating plasmids: the pAM beta 1 family from gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 11668-11672.
- Bruand, C., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., and Jannière, L. (1993b) A fourth class of theta-replicating plasmids: the pAM $\beta$ 1 family from gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 11668-11672.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., et al. (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10181-10186.
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.-H., Wyns, L., and Loris, R. (2005) Toxin–antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci* **30**: 672-679.
- Caballo-Ponce, E., Cerezo, M., and Ramos, C. (2016) Caracterización fenotípica del agente causal de la necrosis bacteria de la dipladenia.
- Caballo-Ponce, E., van Dillewijn, P., Wittich, R.M., and Ramos, C. (2017) WHOP, a Genomic Region Associated With Woody Hosts in the *Pseudomonas syringae* Complex Contributes to the Virulence and Fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **30**: 113-126.
- Cairns, J., Jalasvuori, M., Ojala, V., Brockhurst, M., and Hiltunen, T. (2016) Conjugation is necessary for a bacterial plasmid to survive under protozoan predation. *Biol Lett* **12**: 20150953.
- Caponero, A., Contesini, A., and Iacobellis, N. (1995) Population diversity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander. *Plant Pathol* **44**: 848-855.
- Carattoli, A. (2013) Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* **303**: 298-304.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., and Lo Schiavo, F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**: 413-421.
- Carver, T., Berriman, M., Tivey, A., Patel, C., Bohme, U., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Rajandream, M.A. (2008) Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* **24**: 2672-2676.
- Castañeda-Ojeda, M.P., Moreno-Pérez, A., Ramos, C., and López-Solanilla, E. (2017a) Suppression of plant immune responses by the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 type III effector tyrosine phosphatases HopAO1 and HopAO2. *Front Plant Sci* **8**: 680.
- Castañeda-Ojeda, M.P., Moreno-Pérez, A., Ramos, C., and López-Solanilla, E. (2017b) Suppression of Plant Immune Responses by the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 Type III Effector Tyrosine Phosphatases HopAO1 and HopAO2. *Front Plant Sci* **8**.
- Castañeda-Ojeda, M.P., López-Solanilla, E., and Ramos, C. (2016) Differential modulation of plant immune responses by diverse members of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* HopAF type III effector family. *Mol Plant Pathol*.
- Cayuela, J.A., Rada, M., Rios, J.J., Albi, T., and Guinda, A. (2006) Changes in phenolic composition induced by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* infection in olive tree: presence of large amounts of verbascoside in nodules of tuberculosis disease. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**: 5363-5368.
- Cazorla, F.M., Torés, J.A., Olalla, L., Pérez-García, A., Farré, J.M., and de Vicente, A. (1998) Bacterial apical necrosis of mango in southern Spain: a disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology* **88**: 614-620.
- Cerboneschi, M., Decorosi, F., Biancalani, C., Orteni, M.V., Macconi, S., Giovannetti, L., Viti, C., Campanella, B., Onor, M., and Bramanti, E. (2016) Indole-3-acetic acid in plant–pathogen interactions: a key molecule for in planta bacterial virulence and fitness. *Res Microbiol* **167**: 774-787.

- Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., García-de-los-Santos, A., Dávila, G., and Brom, S. (2002) *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid* **48**: 104-116.
- Clewell, D.B. (2007) Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid* **58**: 205-227.
- Comai, L., and Kosuge, T. (1980) Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* **143**: 950-957.
- Cooper, T.F., and Heinemann, J.A. (2000a) Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12643-12648.
- Cooper, T.F., and Heinemann, J.A. (2000b) Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 12643-12648.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881-10890.
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., and Jin, Q. (2005) VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* **33**: D325-328.
- Choi, K.H., Kumar, A., and 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. *J Microbiol Meth* **64**: 391-397.
- Dahlberg, C., and Chao, L. (2003) Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **165**: 1641-1649.
- De Gelder, L., Ponciano, J.M., Joyce, P., and Top, E.M. (2007) Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology* **153**: 452-463.
- de la Cruz, F., Frost, L.S., Meyer, R.J., and Zechner, E.L. (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 18-40.
- del Solar, G., and Espinosa, M. (1992) The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA. *Mol Microbiol* **6**: 83-94.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., and Diaz-Orejas, R. (1998a) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 434-464.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R. (1998b) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 434-464.
- del Solar, G., and Espinosa, M. (2000) Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* **37**: 492-500.
- Delilhas, N. (2008) Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. *Mol Microbiol* **67**: 475-481.
- Depuydt, S., Trenkamp, S., Fernie, A.R., Elftieh, S., Renou, J.-P., Vuylsteke, M., Holsters, M., and Vereecke, D. (2009) An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians*. *Plant Physiol* **149**: 1366-1386.
- Ding, Z., Atmakuri, K., and Christie, P.J. (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol* **11**: 527-535.
- Driver, J.A., and Kuniyuki, A.H. (1984) In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* **19**: 507-509.
- Easter, C.L., Schwab, H., and Helinski, D.R. (1998) Role of the parCBA operon of the broad-host-range plasmid RK2 in stable plasmid maintenance. *J Bacteriol* **180**: 6023-6030.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2001) The double par locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 15078-15083.
- Ebersbach, G., Sherratt, D.J., and Gerdes, K. (2005) Partition-associated incompatibility caused by random assortment of pure plasmid clusters. *Mol Microbiol* **56**: 1430-1440.
- Eltlbany, N., Prokscha, Z.-Z., Castañeda-Ojeda, M.P., Krögerrecklenfort, E., Heuer, H., Wohanka, W., Ramos, C., and Smalla, K. (2012) A new bacterial disease on *Mandevilla sanderi*, caused by *Pseudomonas savastanoi*: Lessons learned for bacterial diversity studies. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8492-8497.
- Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology* **53**: 43-70.
- Evidente, A., Fujii, T., Iacobellis, N.S., Riva, S., Sisto, A., and Surico, G. (1991) Structure-activity relationships of zeatin cytokinins produced by plant



- pathogenic *Pseudomonades*. *Phytochemistry* **30**: 3505-3510.
- Fatmi, M., Collmer, A., Iacobellis, N.S., Mansfield, J.W., Murillo, J., Schaad, N.W., and Ullrich, M.S., (eds) (2008) *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens. Identification, epidemiology and genomics*. Dordrecht: Springer.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., and Goltsman, E. (2005a) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 11064-11069.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., *et al.* (2005b) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 11064-11069.
- Flores, M., Brom, S., Stepkowski, T., Girard, M.L., Dávila, G., Romero, D., and 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 Science USA* **90**: 4932-4936.
- Fosket, D., and Torrey, J. (1969) Hormonal control of cell proliferation and xylem differentiation in cultured tissues of *Glycine max* var. *Biloxi*. *Plant Physiol* **44**: 871-880.
- Fozo, E.M., Hemm, M.R., and Storz, G. (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 579-589.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., and Galuszka, P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**: 2431-2452.
- Friebs, K. (2004) Plasmid copy number and plasmid stability. In *New Trends and Developments in Biochemical Engineering*. Scheper, T. (ed). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 47-82.
- Garcillán-Barcia, M.P., Bernal, I., Mendiola, M.V., and de la Cruz, F. (2002) IS91 rolling-circle transposition. In *Mobile DNA II*. Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M. and Lambowitz, A.M. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 891-904.
- Garcillán-Barcia, M.P., and de la Cruz, F. (2002) Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 303-313.
- Garcillán-Barcia, M.P., and Cruz, F. (2002) sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 303-313.
- Garcillán-Barcia, M.P., and de la Cruz, F. (2002) Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 303-313.
- Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F., and Grimont, P.A.D. (1992) DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 606-612.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., and 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). *Int J Syst Bacteriol* **49**: 469-478.
- Gerdes, K., Larsen, J., and Molin, S. (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol* **161**: 292-298.
- Gerdes, K., Bech, F., Jørgensen, S., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., and Von Meyenburg, K. (1986) Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli* *relB* operon. *EMBO J* **5**: 2023.
- Gerdes, K., and Molin, S. (1986) Partitioning of plasmid R1: structural and functional analysis of the *parA* locus. *J Mol Biol* **190**: 269-279.
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J., and Jensen, R.B. (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* **37**: 455-466.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., and Løbner-Olesen, A. (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371-382.
- Gibbon, M.J., Sesma, A., Canal, A., Wood, J.R., Hidalgo, E., Brown, J., Vivian, A., and Murillo, J. (1999) Replication regions from plant-pathogenic *Pseudomonas syringae* plasmids are similar to ColE2-related replicons. *Microbiology* **145**: 325-334.
- Glass, N.L., and Kosuge, T. (1988) Role of indoleacetic acid lysine synthetase in regulation of indoleacetic-acid pool size and virulence of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *J Bacteriol* **170**: 2367-2373.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasm, M., Petit, A., and Dessaux, Y. (1998) Auxin production is a

- common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 156-162.
- Goethals, K., Vereecke, D., Jaziri, M., Van Montagu, M., and Holsters, M. (2001) Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 27-52.
- González, A.I., Ruiz, M.L., and Polanco, C. (1998) A race-specific insertion of transposable element IS801 in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 423-428.
- Gordon, G.S., Sitnikov, D., Webb, C.D., Teleman, A., Straight, A., Losick, R., Murray, A.W., and Wright, A. (1997) Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* **90**: 1113-1121.
- Grady, R., and Hayes, F. (2003) Axe–Txe, a broad-spectrum proteic toxin–antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol* **47**: 1419-1432.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 4645-4649.
- Green, S., Studholme, D.J., Laue, B.E., et al. (2010) Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLoS ONE* **5**: e10224.
- Gutiérrez-Barranquero, J.A., Cazorla, F.M., de Vicente, A., and Sundin, G.W. (2017) Complete sequence and comparative genomic analysis of eight native *Pseudomonas syringae* plasmids belonging to the pPT23A family. *BMC Genomics* **18**: 365.
- Guyenet, C., and de la Cruz, F. (2011) Plasmid segregation without partition. *Mob Genet Elements* **1**: 236-241.
- Halary, S., Leigh, J.W., Cheaib, B., Lopez, P., and Bapteste, E. (2010) Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 127-132.
- Hanekamp, T., Kobayashi, D., Hayes, S., and Stayton, M.M. (1997) Avirulence gene D of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* may have undergone horizontal gene transfer. *FEBS Lett* **415**: 40-44.
- Hann, D.R., Domínguez-Ferreras, A., Motyka, V., Dobrev, P.I., Schornack, S., Jehle, A., Felix, G., Chinchilla, D., Rathjen, J.P., and Boller, T. (2014) The *Pseudomonas* type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. *New Phytol* **201**: 585-598.
- Harrison, E., and Brockhurst, M.A. (2012) Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol* **20**: 262-267.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., and Haas, D. (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 232-237.
- Hiraga, S., Sugiyama, T., and Itoh, T. (1994) Comparative analysis of the replicon regions of eleven ColE2-related plasmids. *J Bacteriol* **176**: 7233-7243.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 624-653.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981a) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry* **114**: 193-197.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981b) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* **114**: 193-197.
- Horst, R.K. (1990) Plant Diseases and Their Pathogens. In *Westcott's Plant Disease Handbook*: Springer, pp. 86-515.
- Hosni, T., Moretti, C., Devescovi, G., Suarez-Moreno, Z.R., Fatmi, M.B., Guarnaccia, C., Pongor, S., Onofri, A., Buonauro, R., and Venturi, V. (2011) Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *ISME J* **5**: 1857-1870.
- Hubbard, T.J., Aken, B.L., Ayling, S., et al. (2008) Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res* **37**: D690 - D697.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S., and Pak, K. (2001) Enhancer-Binding Proteins HrpR and HrpS Interact To Regulate hrp-Encoded Type III Protein Secretion in *Pseudomonas syringae* Strains. *J Bacteriol* **183**: 5589-5598.
- Iacobellis, N., Caponero, A., and Evidente, A. (1998) Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathol* **47**: 73-83.
- Iacobellis, N. (2001) Olive knot. *Encyclopedia of Plant Pathology* **1**: 714-715.
- Iacobellis, N.S., Sisto, A., Surico, G., Evidente, A., and DiMaio, E. (1994) Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *J Phytopathol* **140**: 238-248.

- Ishikawa, K., Fukuda, E., and Kobayashi, I. (2010) Conflicts Targeting Epigenetic Systems and Their Resolution by Cell Death: Novel Concepts for Methyl-Specific and Other Restriction Systems. *DNA Res* **17**: 325-342.
- Ito, H., Yagura, M., Shirakihara, Y., and Itoh, T. (2015) Structural basis for replication origin unwinding by an initiator primase of plasmid ColE2-P9: DUPLEX DNA UNWINDING BY A SINGLE PROTEIN. *J Biol Chem* **290**: 3601-3611.
- Jackson, R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., Arnold, D.L., Gibbon, M.J., Murillo, J., Taylor, J.D., and 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10875-10880.
- Jackson, R.W., Vinatzer, B., Arnold, D.L., Dorus, S., and Murillo, J. (2011) The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob Genet Elements* **1**: 55-65.
- Jain, R., Rivera, M.C., Moore, J.E., and Lake, J.A. (2003) Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol* **20**: 1598-1602.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B., and Stebbins, C.E. (2006) A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* **311**: 222-226.
- Janse, J. (1982) *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the Bacterium Causing Excrescences on Oleaceae and Nerium oleander L. *Int J Syst Evol Microbiol* **32**: 166-169.
- Jensen, R.B., and Gerdes, K. (1995) Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol Microbiol* **17**: 205-210.
- Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D.R., and Konieczny, I. (2002) ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol Microbiol* **44**: 971-979.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., et al. (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol* **187**: 6488-6498.
- Jobling, M.G., and Holmes, R.K. (1990a) Construction of vectors with the p15a replicon, kanamycin resistance, inducible *lacZ $\alpha$*  and pUC18 or pUC19 multiple cloning sites. *Nucleic Acids Res* **18**: 5315-5316.
- Jobling, M.G., and Holmes, R.K. (1990b) Construction of vectors with the p15A replicon, kanamycin resistance, inducible *lacZ $\alpha$*  and pUC18 or pUC19 multiple cloning sites. *Nucleic Acids Res* **18**: 5315-5315.
- Johnson, T.A., Stedtfeld, R.D., Wang, Q., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Looft, T., Zhu, Y.-G., and Tiedje, J.M. (2016) Clusters of antibiotic resistance genes enriched together stay together in swine agriculture. *mBio* **7**: e02214-02215.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Juhas, M., Crook, D.W., and Hood, D.W. (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* **10**: 2377-2386.
- Juhas, M., Van Der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009) Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 376-393.
- Kamiunten, H. (1999) Isolation and characterization of virulence gene *psvA* on a plasmid of *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*. *Japanese Journal of Phytopathology* **65**: 501-509.
- Kamiunten, H., Inoue, S., Yakabe, Y., and Iida, S. (2002) Characterization of ISPsy2 and ISPsy3, newly identified insertion sequences in *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*. *J Gen Plant Pathol* **68**: 75-80.
- Kato, A., and Mizobuchi, K. (1994) Evolution of the replication regions of *Incl* alpha and *IncFII* plasmids by exchanging their replication control systems. *DNA Res* **1**: 201-212.
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trolling, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**: 845-858.
- Kelly, B.G., Vespermann, A., and Bolton, D.J. (2009) The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* **47**: 951-968.
- Kerstens, K., and Vancanneyt, M. (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Verlag.



- Kim, J.F., Charkowski, A.O., Alfano, J.R., Collmer, A., and Beer, S.V. (1998) Transposable elements and bacteriophage sequences flank *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 1247-1252.
- King, E.O., Ward, N.K., and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.
- Kosuge, T., Heskett, M., and Wilson, E. (1966) Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. *J Biol Chem* **241**: 3738-3744.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krause, M., and Guiney, D. (1991) Identification of a multimer resolution system involved in stabilization of the *Salmonella dublin* virulence plasmid pSDL2. *J Bacteriol* **173**: 5754-5762.
- Kreimer, A., Borenstein, E., Gophna, U., and Ruppin, E. (2008) The evolution of modularity in bacterial metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 6976-6981.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**: 1870-1874.
- Kwong, S.M., Yeo, C.C., Chuah, D., and Poh, C.L. (1998) Sequence analysis of plasmid pRA2 from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 (P25X) reveals a novel replication region. *FEMS Microbiol Lett* **158**: 159-165.
- Landgraf, A., Weingart, H., Tsiamis, G., and Boch, J. (2006) Different versions of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 exist due to the activity of an effector transposon. *Mol Plant Pathol* **7**: 355-364.
- Lane, D., De Feyter, R., Kennedy, M., Phua, S., and Semon, D. (1986) D protein of miniF plasmid acts as a repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res* **14**: 9713.
- Lehnerr, H., Maguin, E., Jafri, S., and Yarmolinsky, M.B. (1993) Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol* **233**: 414-428.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P., and Van Melderen, L. (2011) Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res*: gkr131.
- Li, Y., and Austin, S. (2002) The P1 plasmid is segregated to daughter cells by a 'capture and ejection' mechanism coordinated with *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol* **46**: 63-74.
- Librado, P., and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Lilly, J., and Camps, M. (2015a) Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol Spectr* **3**.
- Lilly, J., and Camps, M. (2015b) Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol Spectr* **3**: PLAS-0029-2014.
- Lindeberg, M., Myers, C.R., Collmer, A., and Schneider, D.J. (2008) Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 685-700.
- Lipps, G. (2008) *Plasmids: current research and future trends*: Horizon Scientific Press.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods* **25**: 402-408.
- López-Villarejo, J., Diago-Navarro, E., Hernández-Arriaga, A.M., and Díaz-Orejas, R. (2012) Kis antitoxin couples plasmid R1 replication and parD (kis, kid) maintenance modules. *Plasmid* **67**: 118-127.
- Lorenz, D.M., Jeng, A., and Deem, M.W. (2011) The emergence of modularity in biological systems. *Phys Life Rev* **8**: 129-160.
- Llosa, M., and O'callaghan, D. (2004) Euroconference on the Biology of Type IV Secretion Processes: bacterial gates into the outer world. *Mol Microbiol* **53**: 1-8.
- Llosa, M., and de la Cruz, F. (2005) Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol* **156**: 1-6.
- Ma, K.-W., and Ma, W. (2016) Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Mol Biol* **91**: 713-725.
- Ma, Z., Smith, J.J., Zhao, Y., Jackson, R.W., Arnold, D.L., Murillo, J., and Sundin, G.W. (2007) Phylogenetic analysis of the pPT23A plasmid family of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1287-1295.
- Macdonald, E.M.S., Powell, G.K., Regier, D.A., Glass, N.L., Roberto, F., Kosuge, T., and Morris, R.O. (1986) Secretion of zeatin,

- ribosylzeatin, and ribosyl-1"-methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*: plasmid-coded cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* **82**: 742-747.
- Magie, A.R., Wilson, E., and Kosuge, T. (1963) Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indoleacetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. *Science* **141**: 1281-1282.
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 725-774.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., et al. (2012a) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**: 614-629.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., et al. (2012b) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**: 614-629.
- Mansfield, J.W. (2009) From bacterial avirulence genes to effector functions via the *hrp* delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Mol Plant Pathol* **10**: 721-734.
- Mantengoli, E., and Rossolini, G.M. (2005) Tn5393d, a complex Tn5393 derivative carrying the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene and other resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3289-3296.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.P., and Inouye, M. (2012) YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84**: 979-989.
- Matas, I.M., Lambertsen, L., Rodríguez-Moreno, L., and Ramos, C. (2012) Identification of novel virulence genes and metabolic pathways required for full fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive (*Olea europaea*) knots. *New Phytol* **196**: 1182-1196.
- Matas, I.M., Pilar Castaneda-Ojeda, M., Aragon, I.M., Antunez-Lamas, M., Murillo, J., Rodríguez-Palenzuela, P., Lopez-Solanilla, E., and 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. *Mol Plant-Microbe Interact* **27**: 424-436.
- McEvoy, C.R., Falmer, A.A., Gey van Pittius, N.C., Victor, T.C., van Helden, P.D., and Warren, R.M. (2007) The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **87**: 393-404.
- Melo, D., Porto, A., Cheverud, J.M., and Marroig, G. (2016) Modularity: Genes, development, and evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **47**: 463-486.
- Mendiola, M.V., Jubete, Y., and de la Cruz, F. (1992) DNA sequence of IS91 and identification of the transposase gene. *J Bacteriol* **174**: 1345-1351.
- Mendiola, M.V., Bernales, I., and de la Cruz, F. (1994) Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 1922-1926.
- Mitchell, A., Chang, H.-Y., Daugherty, L., et al. (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* **43**: D213-D221.
- Mohr, T.J., Liu, H., Yan, S., Morris, C.E., Castillo, J.A., Jelenska, J., and Vinatzer, B.A. (2008) Naturally occurring nonpathogenic isolates of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* lack a type III secretion system and effector gene orthologues. *J Bacteriol* **190**: 2858-2870.
- Mok, D.W., and Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Biol* **52**: 89-118.
- Moretti, C., Ferrante, P., Hosni, T., Valentini, F., D'Onghia, A., Fatmi, M.B., and Buonauro, R. (2008) Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains collected from olive trees in different countries. In *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens—Identification, Epidemiology and Genomics*: Springer, pp. 321-329.
- Mori, H., Mori, Y., Ichinose, C., Niki, H., Ogura, T., Kato, A., and Hiraga, S. (1989) Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J Biol Chem* **264**: 15535-15541.
- Morris, R. (1986) Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 509-538.
- Mruk, I., and Kobayashi, I. (2013) To be or not to be: regulation of restriction–modification systems and other toxin–antitoxin systems. *Nucleic Acids Res*: gkt711.
- Murillo, J., and Keen, N.T. (1994) Two native plasmids of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain PT23 share a large amount of repeated DNA, including replication sequences. *Mol Microbiol* **12**: 941-950.
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A.K., Cooksey, D.A., and Keen, N.T. (1994) Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by

- Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. *Plasmid* **31**: 275-287.
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R.L., and Meinhart, A. (2011) A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS biology* **9**: e1001033.
- Napoli, C., and Staskawicz, B. (1987) Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**: 572-578.
- Nieto, C., Fernández-Tresguerres, E., Sánchez, N., Vicente, M., and Díaz, R. (1990) Cloning vectors, derived from a naturally occurring plasmid of *Pseudomonas savastanoi*, specifically tailored for genetic manipulations in *Pseudomonas*. *Gene* **87**: 145-149.
- Niki, H., and Hiraga, S. (1997) Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell* **90**: 951-957.
- Nordström, K., and Austin, S.J. (1989) Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu Rev Genet* **23**: 37-69.
- Nordström, K. (1993) Plasmid replication and maintenance. In *Plasmids: a practical approach*. Hardy, K.G. (ed). New York: Oxford University Press, pp. 1-38.
- Nordström, K., and Wagner, E.G.H. (1994) Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem Sci* **19**: 294-300.
- Norman, A., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil Trans R Soc B* **364**: 2275-2289.
- Novick, R.P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* **51**: 381-395.
- Nowell, R.W., Laue, B.E., Sharp, P.M., and Green, S. (2016) Comparative genomics reveals genes significantly associated with woody hosts in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Pathol* **17**: 1409-1424.
- O'Brien, H.E., Thakur, S., and Guttman, D.S. (2011) Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 269-289.
- O'Brien, J.A., and Benková, E. (2013) Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front Plant Sci* **4**: 451.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Oguiza, J.A., Rico, A., Rivas, L.A., Sutra, L., Vivian, A., and Murillo, J. (2004) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. *Microbiology* **150**: 473-482.
- Ogura, T., and Hiraga, S. (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci* **80**: 4784-4788.
- Palmer, B.R., and Marinus, M.G. (1994) The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*—a review. *Gene* **143**: 1-12.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. (2011) Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathol* **60**: 338-344.
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J., Salcedo, C., Piquer, J., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E., and Del Rio, C. (2006) Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology* **96**: 313-319.
- Pérez-Martínez, I. (2007) Análisis genómico global de plásmidos de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In *Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología Málaga*: Universidad de Málaga.
- Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Matas, I.M., and Ramos, C. (2007) Strain selection and improvement of gene transfer for genetic manipulation of *Pseudomonas savastanoi* isolated from olive knots. *Res Microbiol* **158**: 60-69.
- Pérez-Martínez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G.W., and Ramos, C. (2008) Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *J Bacteriol* **190**: 625-635.
- Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Lambertsen, L., Matas, I.M., Murillo, J., Tegli, S., Jiménez, A.J., and Ramos, C. (2010) Fate of a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* type III secretion system mutant in olive plants (*Olea europaea* L.). *Appl Environ Microbiol* **76**: 3611-3619.
- Pérez-Mendoza, D., Aragón, I.M., Prada-Ramírez, H.A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.-T., and Sanjuán, J. (2014) Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS ONE* **9**: e91645.

- Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W., Stes, E., Schmölling, T., Kakimoto, T., and Van Montagu, M.C. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 929-934.
- Pertry, I., Václavíková, K., Gemrotová, M., Spíchal, L., Galuszka, P., Depuydt, S., Temmerman, W., Stes, E., De Keyser, A., and Riefler, M. (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**: 1164-1174.
- Petersen, J. (2011) Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era. *Arch Microbiol* **193**: 313-321.
- Pintado, A. (2014) Construcción de mutantes en genes de virulencia en la bacteria patógena de olivo *Pseudomonas savastanoi*. In *Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología* Málaga: Universidad de Málaga.
- Porse, A., Schønning, K., Munck, C., and Sommer, M.O.A. (2016) Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts. *Mol Biol Evol* **33**: 2860-2873.
- Powell, G.K., and Morris, R.O. (1986) Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: homology with *Agrobacterium tumefaciens tmr* and *tzs* loci. *Nucleic Acids Res* **14**: 2555-2565.
- Prentki, P., and Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Providenti, M.A., O'Brien, J.M., Ewing, R.J., Paterson, E.S., and Smith, M.L. (2006) The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR. *J Microbiol Methods* **65**: 476-487.
- Quesada, J., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C., Carbonell, E., and López, M. (2010) Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathol* **59**: 262-269.
- Quesada, J.M., Pérez-Martínez, I., Ramos, C., López, M.M., and Penyalver, R. (2008) IS53: an insertion element for molecular typing of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Res Microbiol* **159**: 207-215.
- Ramos, C., Matas, I.M., Bardaji, L., Aragón, I.M., and Murillo, J. (2012) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Mol Plant Pathol* **13**: 998-1009.
- Ramos, J.L., (ed) (2004) *Pseudomonas: Volume 1 Genomics, life style and molecular architecture*. New York: Kluwer Academics-Plenum Publishers.
- Richter, G.Y., Björklöf, K., Romantschuk, M., and Mills, D. (1998) Insertion specificity and trans-activation of IS801. *Mol Gen Genet* **260**: 381-387.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., and Murray, J.A. (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544.
- Robertson, A.E., Wechter, W.P., Denny, T.P., Fortnum, B.A., and Kluepfel, D.A. (2004) Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 1376-1384.
- Rocker, A., and Meinhart, A. (2016) Type II toxin: antitoxin systems. More than small selfish entities? *Curr Genet* **62**: 287-290.
- Rodríguez-Moreno, L., Barceló-Muñoz, A., and Ramos, C. (2008) In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology* **98**: 815-822.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I., Murillo, J., et al. (2010) Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environ Microbiol* **12**: 1604-1620.
- Rodríguez-Moreno, L., Jiménez, A.J., and Ramos, C. (2009) Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microbial biotechnology* **2**: 476-488.
- Rohmer, L., Kjemtrup, S., Marchesini, P., and Dangl, J.L. (2003) Nucleotide sequence, functional characterization and evolution of pFKN, a virulence plasmid in *Pseudomonas syringae* pathovar *maculicola*. *Mol Microbiol* **47**: 1545-1562.
- Romanchuk, A., Jones, C.D., Karkare, K., Moore, A., Smith, B.A., Jones, C., Dougherty, K., and Baltrus, D.A. (2014) Bigger is not always better: Transmission and fitness burden of ~1 MB *Pseudomonas syringae* megaplasmid pMPPla107. *Plasmid* **73**: 16-25.
- Romantschuk, M., Richter, G.Y., Mukhopadhyay, P., and Mills, D. (1991) IS801, an insertion sequence element isolated from *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Mol Microbiol* **5**: 617-622.
- Rotenberg, D., Thompson, T.S., German, T.L., and Willis, D.K. (2006) Methods for effective



- real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *J Virol Methods* **138**: 49-59.
- Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., and Yamaya, T. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 9972-9977.
- Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 431-449.
- Salje, J., Gayathri, P., and Löwe, J. (2010) The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments. *Nat Rev Microbiol* **8**: 683-692.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarkar, S.F., and Guttman, D.S. (2004) Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1999-2012.
- Scott, I.M., and Horgan, R. (1984) Mass-spectrometric quantification of cytokinin nucleotides and glycosides in tobacco crown-gall tissue. *Planta* **161**: 345-354.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schmidt, O., Schuenemann, V.J., Hand, N.J., Silhavy, T.J., Martin, J., Lupas, A.N., and Djuranovic, S. (2007) prf and yhaV encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **372**: 894-905.
- Schroth, M., Osgood, J., and Miller, T. (1973) Quantitative assessment of the effect of the olive knot disease on olive yield and quality. *Phytopathology* **63**: 1064-1065.
- Schumacher, M.A., Glover, T.C., Brzoska, A.J., Jensen, S.O., Dunham, T.D., Skurray, R.A., and Firth, N. (2007) Segrosome structure revealed by a complex of ParR with centromere DNA. *Nature* **450**: 1268-1271.
- Schumacher, M.A., Tonthat, N.K., Kwong, S.M., Chinnam, N.b., Liu, M.A., Skurray, R.A., and Firth, N. (2014) Mechanism of staphylococcal multiresistance plasmid replication origin assembly by the RepA protein. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 9121-9126.
- Schuster, C.F., and Bertram, R. (2013) Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol Lett* **340**: 73-85.
- Sengupta, M., and Austin, S. (2011) Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect Immun* **79**: 2502-2509.
- Sesma, A., Sundin, G.W., and Murillo, J. (1998) Closely related replicons coexisting in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* show a mosaic organization of the replication region and altered incompatibility behavior. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3948-3953.
- Sesma, A., Sundin, G.W., and Murillo, J. (2000) Phylogeny of the replication regions of pPT23A-like plasmids from *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* **146**: 2375-2384.
- Sevin, E.W., and Barloy-Hubler, F. (2007) RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol* **8**: R155.
- Sharpe, M.E., Chatwin, H.M., Macpherson, C., Withers, H.L., and Summers, D.K. (1999) Analysis of the ColE1 stability determinant Rcd. *Microbiology* **145**: 2135-2144.
- Sherratt, D.J., Arciszewska, L.K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N., and McCulloch, R. (1995) Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **347**: 37-42.
- Siguier, P., Filee, J., and Chandler, M. (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* **9**: 526-531.
- Siguier, P., Goubeyre, E., and Chandler, M. (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 865-891.
- Sisto, A., Cipriani, M., and Morea, M. (2003) Sequence analysis of the *hrpC* operon and the *hrpE* gene of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. In *Pseudomonas syringae and related pathogens*: Springer, pp. 405-410.
- Smidt, M., and Kosuge, T. (1978) The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha-methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation in oleander. *Physiol Plant Pathol* **13**: 203-214.
- Soby, S., Kirkpatrick, B., and Kosuge, T. (1994) Characterization of high-frequency deletions in the *iaa*-containing plasmid pIAA2 of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Plasmid* **31**: 21-30.
- Stavrínides, J., and Guttman, D. (2004) Nucleotide sequence and evolution of the

- five-plasmid complement of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326. *J Bacteriol* **186**: 5101-5115.
- Stavrínides, J., Ma, W., and Guttman, D.S. (2006) Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens. *PLoS Pathog* **2**: e104.
- Stevens, C., Bennett, M.A., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Taylor, J.D., and 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. *Mol Microbiol* **29**: 165-177.
- Stockwell, V.O., Davis, E.W., Carey, A., Shaffer, B.T., Mavrodi, D.V., Hassan, K.A., Hockett, K., Thomashow, L.S., Paulsen, I.T., and Loper, J.E. (2013) pA506, a conjugative plasmid of the plant epiphyte *Pseudomonas fluorescens* A506. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5272-5282.
- Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**: 674-688.
- Summers, D., and Sherratt, D. (1988) Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J* **7**: 851.
- Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**: 1097-1103.
- Summers, D.K. (1996) *The biology of plasmids*. Osney, Oxford OX; Cambridge, Mass.: Blackwell Science.
- Sundin, G.W., and Bender, C.L. (1994) Relative fitness in vitro and in planta of *Pseudomonas syringae* strains containing copper and streptomycin resistance plasmids. *Can J Microbiol* **40**: 279-285.
- Sundin, G.W., Demezas, D.H., and Bender, C.L. (1994) Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4421-4431.
- Sundin, G.W., Monks, D.E., and Bender, C.L. (1995) Distribution of the streptomycin-resistance transposon Tn5393 among phylloplane and soil bacteria from managed agricultural habitats. *Can J Microbiol* **41**: 792-799.
- Sundin, G.W., and Bender, C.L. (1996a) Dissemination of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Mol Ecol* **5**: 133-143.
- Sundin, G.W., and Bender, C.L. (1996b) Molecular analysis of closely related copper- and streptomycin-resistance plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plasmid* **35**: 98-107.
- Sundin, G.W., Kidambi, S.P., Ullrich, M., and Bender, C.L. (1996) Resistance to ultraviolet light in *Pseudomonas syringae*: sequence and functional analysis of the plasmid-encoded *rulAB* genes. *Gene* **177**: 77-81.
- Sundin, G.W., and Murillo, J. (1999) Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *rulAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290-320 nm) radiation and distribution of *rulAB* among *P. syringae* pathovars. *Environ Microbiol* **1**: 75-88.
- Sundin, G.W., Mayfield, C.T., Zhao, Y., Gunasekera, T.S., Foster, G.L., and Ullrich, M.S. (2004) Complete nucleotide sequence and analysis of pPSR1 (72,601 bp), a pPT23A-family plasmid from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* A2. *Mol Genet Genomics* **270**: 462-476.
- Sundin, G.W. (2007) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 129-151.
- Sundin, G.W., and Murillo, J. (2009) Gene traders: characteristics of native plasmids from plant pathogenic bacteria. In *Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology*. Jackson, R.W. (ed). Cambs: Caister Academic Press, pp. 295-310.
- Surico, G., Iacobellis, N., and Sisto, A. (1985) Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiol Plant Pathol* **26**: 309-320.
- Szabo, L.J., and Mills, D. (1984) Integration and excision of pMC7105 in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: involvement of repetitive sequences. *J Bacteriol* **157**: 821-827.
- Tajima, Y., Horii, T., and Itoh, T. (1988) Replication of ColE2 and ColE3 plasmids: two ColE2 incompatibility functions. *Mol Gen Genet* **214**: 451-455.
- Tamaki, S., Dahlbeck, D., Staskawicz, B., and Keen, N.T. (1988) Characterization and expression of two avirulence genes cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **170**: 4846-4854.
- Tan, Q., Awano, N., and Inouye, M. (2011) YeeV is an *Escherichia coli* toxin that

- inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol Microbiol* **79**: 109-118.
- Tinsley, E., and Khan, S.A. (2006) A novel FtsZ-like protein is involved in replication of the anthrax toxin-encoding pXO1 plasmid in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **188**: 2829-2835.
- Tjamos, E., Graniti, A., Smith, I., and Lamberti, F. (1993) Conference on olive diseases. *EPPO Bulletin* **23**: 365-550.
- Touchon, M., and Rocha, E.P.C. (2007) Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes. *Mol Biol Evol* **24**: 969-981.
- Trapero, A., and Blanco, M.A. (2004) Enfermedades. En: El cultivo del olivo. Barranco, D.; Fernández-
- Escobar, R.; Rallo, L., eds. Junta de Andalucía y Mundi-Prensa, pp. 557-614.
- Underwood, W., Zhang, S., and He, S.Y. (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **52**: 658-672.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**: e115.
- Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013) Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mob Genet Elements* **3**: e26219.
- Van Melderen, L., and De Bast, M.S. (2009) Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* **5**: e1000437.
- Van Melderen, L., and Saavedra De Bast, M. (2009) Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities? *PLOS Genetics* **5**: e1000437.
- Vivian, A., and Gibbon, M.J. (1997) Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? *Microbiology* **143**: 693-704.
- Vivian, A., Murillo, J., and Jackson, R.W. (2001) The role of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? *Microbiology* **147**: 763-780.
- Von Bodman, S., and Shaw, P.D. (1987) Conservation of plasmids among plant-pathogenic *Pseudomonas syringae* isolates of diverse origins. *Plasmid* **17**: 240-247.
- von Bodman, S.B., Bauer, W.D., and Coplin, D.L. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455-482.
- Wagner, E.G., von Heijne, J., and Nordström, K. (1987) Control of replication of plasmid R1: translation of the 7k reading frame in the RepA mRNA leader region counteracts the interaction between CopA RNA and CopT RNA. *EMBO J* **6**: 515-522.
- Wagner, G.P., Pavlicev, M., and Cheverud, J.M. (2007) The road to modularity. *Nat Rev Genet* **8**: 921-931.
- Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., and Peti, W. (2012) A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature chemical biology* **8**: 855-861.
- Warth, L., and Altenbuchner, J. (2013) A new site-specific recombinase-mediated system for targeted multiple genomic deletions employing chimeric loxP and mrpS sites. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 6845-6856.
- Winther, K.S., and Gerdes, K. (2012) Regulation of enteric vapBC transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res* **40**: 4347-4357.
- Yagura, M., Nishio, S.-y., Kurozumi, H., Wang, C.-f., and Itoh, T. (2006) Anatomy of the replication origin of plasmid ColE2-P9. *J Bacteriol* **188**: 999-1010.
- Yamada, T., Lee, P.-D., and Kosuge, T. (1986) Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*: Nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 8263-8267.
- Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2009) mRNA Interferases, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin–Antitoxin Systems. *Progress in molecular biology and translational science* **85**: 467-500.
- Yan, S., Liu, H., Mohr, T.J., Jenrette, J., Chiodini, R., Zaccardelli, M., Setubal, J.C., and Vinatzer, B.A. (2008) Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, a very atypical tomato strain. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3171-3181.
- Yasueda, H., Takechi, S., Sugiyama, T., and Itoh, T. (1994) Control of ColE2 plasmid replication: negative regulation of the expression of the plasmid-specified initiator protein, Rep, at a posttranscriptional step. *Mol Gen Genet* **244**: 41-48.
- Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vauterin, L., Gvozdyak, R.I., and Stead, D.E. (1996) Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Rev Plant Pathol* **75**: 721-763.
- Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Saddler, G.S., Stead, D.E., and

- Takikawa, Y. (2004) Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864–2004; [http://www.isppweb.org/about\\_tppb.asp](http://www.isppweb.org/about_tppb.asp).
- Young, J.M. (2010) Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J Plant Pathol* **92**: S5-S14.
- Yucel, I., Slaymaker, D., Boyd, C., Murillo, J., Buzzell, R.I., and 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. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 677-679.
- Zhang, Y., and Inouye, M. (2011) RatA (YfjG), an Escherichia coli toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol Microbiol* **79**: 1418-1429.
- Zhao, Y. (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 49-64.
- Zhao, Y.F., Ma, Z.H., and Sundin, G.W. (2005) Comparative genomic analysis of the pPT23A plasmid family of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **187**: 2113-2126.
- Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A.Y. (1990) Miniprep in ten minutes. *Biotechniques* **8**: 172-173.
- Zhou, F., Tran, T., and Xu, Y. (2008) Nezha, a novel active miniature inverted-repeat transposable element in cyanobacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 790-794.
- Zielenkiewicz, U., and Ceglowski, P. (2001) Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochimica Polonica* **48**: 1003-1023.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.



## Publicaciones

- L. Bardaji, **M. Añorga**, R. W. Jackson, A. Martínez-Bilbao, N. Yanguas, J. Murillo. (2011). Miniature transposable sequences are frequently mobilized in the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. PLoS ONE 6(10):e25773, doi: 10.1371/journal.pone.0025773.
- L. Bardaji, **M. Añorga**, J. A. Ruiz-Masó, G. del Solar, J. Murillo. (2017). Plasmid replicons from *Pseudomonas* are natural chimeras of functional, exchangeable modules. *Frontiers in microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00190.



## Comunicaciones a congresos

- **M. Añorga**, L. Bardaji, C. Ramos, J. Murillo.  
Evaluación funcional de determinantes de mantenimiento de los plásmidos nativos de *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi Psv48. Tipo de participación: Oral.  
V Reunión del grupo especializado microbiología de plantas - MIP'13 (Girona, 10-12 de abril, 2013).
- **M. Añorga**, L. Bardaji, J. Murillo.  
Evaluación del papel de los sistemas toxina-antitoxina del plásmido pPsv48C de *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi en mantenimiento. Tipo de participación: Póster.  
XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología (LLeida, 07-10 de octubre, 2014).
- **M. Añorga**, L. Bardaji, C. Ramos, J. Murillo.  
Los sistemas toxina-antitoxina de plásmidos de *Pseudomonas syringae* contribuyen al mantenimiento, número de copia e integridad estructural. Tipo de participación: Oral.  
VI Reunión del grupo especializado microbiología de plantas - MIP'15 (Madrid, 11-13 de marzo, 2015).
- **M. Añorga**, L. Bardaji, C. Ramos, J. Murillo.  
Temporal and structural of stability of virulence plasmids of *Pseudomonas syringae* is enhanced by multiple toxin-antitoxin systems. Tipo de participación: Póster.  
9th International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens (Málaga, 02-06 de junio, 2015).
- **M. Añorga**, A. Pintado, L. Bardaji, C. Ramos, J. Murillo.  
El plásmido pPsv48C es esencial para la producción de tumores en olivo y mantiene su estructura gracias a tres sistemas toxina-antitoxina. Tipo de participación: Oral.  
XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología (Palencia, 20-23 de septiembre, 2016).



## **Financiación**

La investigación incluida en esta Tesis ha sido financiada con cargo a los proyectos AGL2011-30343-C02-02 y AGL2014-53242-C2-2-R del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por la Beca para la Formación de Personal Investigador (FPI, ref. BES-2012-054016) del Ministerio de Ciencia e Innovación/Ministerio de Economía y Competitividad.



## NOTAS



