

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVO.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	7
Técnicas moleculares.....	8
Inoculación en vaina.....	11
RESULTADOS.....	12
Amplificación de efectores de <i>P. syringae</i> pv. savastanoi NCPPB 3335...	12
Clonación de los amplicones.....	13
Evaluación de síntomas de la actividad de AER-0000629 y AER-0001936 en judía.....	15
DISCUSIÓN.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* son dos patógenos de plantas, incluidos en los 60 patovares del grupo *P. syringae*. Las dos bacterias causan enfermedad en diferentes huéspedes y con síntomas muy distintos, la primera tumores en olivo y la segunda lesiones en judía, y son organismos modelos de estudio en la identificación de los determinantes que definen el espectro de huésped. La definición del espectro de huésped puede estar determinada por la acción conjunta de proteínas llamadas efectores, que son secretadas por un sistema de secreción tipo III a la célula vegetal, dando lugar a la inhibición de las respuestas de defensa de la planta. El objetivo del trabajo ha sido la identificación de genes de efectores de *P. syringae* pv. *savastanoi* que induzcan respuesta de incompatibilidad en judía, para lo que se abordó la clonación y ensayo de 11 efectores. De éstos, sólo se pudieron obtener clones de los efectores AER-0000629 y AER-0001936, que se clonaron mediante tecnología Gateway en dos vectores de expresión. Después fueron transferidos a *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, y finalmente se evaluó su actividad en vainas de judía, en la que se observó que ninguno de los efectores alteró de manera obvia la interacción de *P. syringae* pv. *phaseolicola* con judía.

ABSTRACT

Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* and *P. syringae* pv. *phaseolicola* are two plant pathogens included in the 60 pathovars of the *P. syringae* complex. The two bacteria are model organisms for the study of the determinants that define the host range and of those responsible for the characteristic symptoms caused by the pathogens, namely tumors in olive and foliar necrosis in bean. The definition of host range can be determined by the cumulative effect of diverse proteins called effectors, which are secreted by a type III secretion system to the plant cell, resulting in inhibition of the plant defenses. The aim of the study was the identification of effector genes from *P. syringae* pv. *savastanoi* inducing incompatibility responses in bean; for this we undertook the cloning and evaluation of 11 effectors. Of these, we could only get clones of effectors AER-0000629 and AER-0001936, which were cloned by Gateway technology in two expression vectors. Then, they were transferred to *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, and their activity was evaluate in bean pods, which did not obviously altered the interaction of *P. syringae* pv. *phaseolicola* with bean.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas syringae (Van Hall, 1902) es una bacteria patógena de plantas de gran importancia económica en la agricultura (Smith *et al.*, 1992). Además, se utiliza como organismo-modelo para el estudio de las bases moleculares de la patogenicidad debido a la fisiología y simplicidad genética que presenta (Mansfield, 2009). Es una bacteria en forma de bacilo gram-negativo, aerobio estricto y que pertenece a la clase de gamma-proteobacteria. Posee un flagelo polar y es capaz de producir pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta (Hirano y Upper, 2000).

P. syringae puede infectar un amplio rango de especies de plantas leñosas y herbáceas, causando diversos síntomas, como manchas foliares y en frutos, podredumbres blandas, marchiteces y chancros (Agrios, 2005). La especie se divide en alrededor de 60 patovares diferentes, con la base de su rango de hospedadores (Young, 2010). Se trata de un grupo de cepas bacterianas, con características similares y alta homología entre ellas, pero diferenciadas por su distinta patogenicidad en uno o más hospedadores.

La infección del huésped y el desarrollo de la enfermedad por *P. syringae* requiere la inhibición de los mecanismos de defensa de la planta. Para ello, el patógeno sintetiza un sofisticado sistema de secreción, llamado sistema de secreción tipo III (TTSS), que forma una estructura constituida por un cuerpo basal que atraviesa el periplasma y un filamento hueco que inyecta proteínas al interior de la célula huésped (Hueck, 1998). Las proteínas son conocidas como efectores y son fundamentales para la producción de la enfermedad. Estas proteínas son el producto de los genes de virulencia y avirulencia, llamados genes de efectores (Murillo y Sesma, 2001). Este sistema de secreción está codificado por los genes *hrp/hrc*, cuyo acrónimo deriva de “hypersensitive reaction and pathogenity” e “hypersensitive reaction and conserved” (Jackson *et al.*, 1999). Los efectores son los productos de los genes *hop* (*hrp* outer protein) o *avr* (avirulencia) y son, en conjunto, esenciales para la patogenicidad de la bacteria.

Dentro de los 50 patovares presentes en la especie, se destacarán en este trabajo *P. syringae* pv. *phaseolicola* y *P. syringae* pv. *savastanoi*. Los genomas de los dos han sido secuenciados y analizados (Joardar *et al.*, 2005; Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). A continuación se describen las características más importantes de cada uno de ellos.

INTRODUCCIÓN

P. syringae pv. *savastanoi* es el agente causante de la tuberculosis del olivo, que produce tumores en ramas y en tronco (Gardan *et al.*, 1992). Está considerada como la tercera enfermedad del olivo en España en cuanto a las pérdidas que produce. Además, a día de hoy, es el único patógeno bacteriano del olivar incluido en la Directiva de la UE 92/94 relativa a las enfermedades que afectan a la calidad del aceite de manera significativa (Ramos, 2009).

P. syringae pv. *phaseolicola* es un patógeno que produce la enfermedad conocida como “grasa de la judía”. Se caracteriza por las manchas de aspecto aceitoso que se producen en las vainas de la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.); además, en las hojas aparecen pequeñas manchas necróticas que pueden estar rodeadas de un halo verde pálido. Esta es una de las enfermedades de la judía de mayor importancia económica en Europa y en numerosos países del mundo, especialmente en zonas de clima templado (Smith *et al.*, 1992). También es capaz de causar enfermedad en otros géneros de la familia de las leguminosas (Allen *et al.*, 1998). Este patovar se encuentra dividido en 9 razas dependiendo de los cultivares a los que afecte (Jenner *et al.*, 1991).

P. syringae pv. *savastanoi* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* se utilizan como modelo de estudio en la identificación de los determinantes que definen el espectro de huésped. Estas bacterias son muy próximas filogenéticamente (Gardan *et al.*, 1992), pero, en condiciones naturales, causan enfermedad en diferentes huéspedes con síntomas muy distintos. Esto puede ser debido a los genes de efectores, de los que se ha hablado anteriormente, o a otros factores de virulencia.

En estudios anteriores se ha observado el comportamiento de estos dos patovares en vainas y hojas de judía. *P. syringae* pv. *phaseolicola* produce enfermedad tanto en vaina como en hoja, mientras que se comprobó que no existe una interacción compatible entre *P. syringae* pv. *savastanoi* y judía (Klement y Lovrekovich, 1961).

En este laboratorio se están estudiando las bases moleculares de la especificidad del huésped. Para ello, se ha abordado la identificación y caracterización de los genes implicados en la definición del espectro de huésped de *P. syringae* pv. *savastanoi* en judía. Los estudios comenzaron con la identificación de los efectores bacterianos de *P. syringae* pv. *savastanoi* que indujeran respuestas de incompatibilidad en judía y que no tuvieran homología con los efectores presentes en *P. syringae* pv. *phaseolicola*. En los

INTRODUCCIÓN

resultados obtenidos, no se encontraron síntomas evidentes de incompatibilidad, y en este trabajo se continuará la investigación comprobando efectores de *P. syringae* pv. savastanoi con homología a los presentes en *P. syringae* pv. phaseolicola.

OBJETIVO

En este trabajo se ha abordado la clonación y ensayo de un conjunto de 11 efectores de la bacteria modelo *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335, para la identificación de genes que induzcan respuestas de incompatibilidad en judía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 1. *Escherichia coli* fue crecida en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) a 37°C. Para crecer *P. syringae* pv. *savastanoi* se utilizó MG (Keane *et al.*, 1970) a 28°C. Para *P. syringae* pv. *phaseolicola* se escogió medio B (King *et al.*, 1954) a 28°C. Cuando fue necesario los medios se suplementaron con kanamicina, gentamicina y espectinomicina a 50, 10 y 50 µg/ml respectivamente.

Tabla 1: Cepas y plásmidos utilizados

Cepa/vector de clonación	Características	Fuente o Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
NEB10beta	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK (Φ80 Δ(lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	NEB ^a
Match1-T1 ^R Cells	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	Invitrogen
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>		
NCPPB3335	<i>Olea europaea</i> , D.E. Stead, Francia	NCPPB ^b
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>		
1448A	Race 6, <i>Phaseolus vulgaris</i> , 1985, Etiopía	Teverson, 1991
Plásmidos		
pENTR TM TOPO [®]	Vector comercial para clonación de productos de PCR, Km ^R	Invitrogen
pCPP5040	Vector Gateway de expresión, amplio espectro huésped, Gm ^R	López-Solanilla <i>et al.</i> , 2004
pCPP3234	Vector Gateway de expresión, amplio espectro de huésped, Sp ^R	Schechter <i>et al.</i> , 2004

^aNEB, New England Biolabs (Ipswich, MA). ^bNational collection of Plant Pathogenic bacteria, York, United Kingdom.

Técnicas moleculares

Los cebadores utilizados para la amplificación de efectores se diseñaron utilizando la secuencia del genoma de *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (NZ_ADMI00000000) y usando el programa Primer 3 Plus; se muestran en la Tabla 2.

Para la posterior clonación del gen completo en orientación correcta en el vector TOPO, se añadió una cola CACC al extremo 5' del oligo forward. Tras la cola, el cebador continuó con el ATG de inicio del gen y las posteriores bases. El oligo reverse comienza en el codón de parada del gen.

Tabla 2: Cebadores diseñados para la amplificación de los efectores.

Efactor ^a	Nombre gen	Cebadores (5'→3') ^b	Amplicón (pb)
AER-0000629	<i>hopG1</i>	F: <u>CACCATG</u> CAAATAAAGAACAGTCATC R: TTAGCCGTTGTAAA ACTGCTTAG	1482
AER-0004681	<i>hopD1</i>	F: <u>CACCATG</u> AATCCTCTACAATCTATTC R: TCAGGGTGC GGGCTGCCGCG	2106
AER-0000168	<i>hopI1</i>	F: <u>CACCATG</u> ATCAACCTCACCAGCATTG R: TCAGACCTGG ACTTCGTCACCTTTC	1011
AER-0000741	<i>hopAE1</i>	F: <u>CACCATG</u> ATGCCCTCTCAGATCAC R: TTATGGCTCG CCAGCCGCTTG	2739
AER-0001776	<i>hopAH2</i>	F: <u>CACCATG</u> AACATCCATACCGCCAGG R: TCATAAGA ACTGATCTGACTTTGAAAA	1251
AER-0003015	<i>hopV1</i>	F: <u>CACCATG</u> TTGAACAAGCCGACGTTG R: TCAGCCTTTAT CGGGCACAACG	1272
AER-0004680	<i>hopQ1</i>	F: <u>CACCATG</u> CATCGTCCTATCACCGC R: TCAATCTGG GGCTACCGTCGACTG	1344
AER-0004685	<i>hopR1</i>	F: <u>CACCATG</u> TTGAACAAGCCGACGTTG R: TCACCTTCG AGGGCAACACGG	5823
AER-0004725	<i>hopAB1</i>	F: <u>CACCATG</u> CCGGGTATCAACGGAGC R: TCAGGGAACA ATTCTAAAAGCGTAC	774
AER-0000625	<i>hopAU1</i>	F: <u>CACCATG</u> AAGCCCGTTCAATCAGT R: TTATTCCTG CTGCGTGCGGGC	2196
AER-0001936	Proteína hipotética	F: <u>CACCATG</u> AAAAATTGCTCAAACAAC R: TTAGCGAC CCAGACAGGTAAAG	1881

^aNombre utilizado en ASAP Database <http://www.genome.wisc.edu/tools/asap.htm>. ^bSubrayada, la cola añadida al extremo 5'. En negrita, codones de inicio y de parada del gen.

MATERIAL Y MÉTODOS

La especificidad de los cebadores se evaluó inicialmente mediante PCR utilizando una polimerasa estándar (BIOTaq DNA Polymerase, Bioline) (Sambrook *et al.*, 1989). Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron una desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos de: 94°C durante un minuto, 52°C durante un minuto y 72°C durante un tiempo en minutos igual al tamaño en Kb del producto de amplificación esperado. El proceso terminó con un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos. Como molde de ADN para la reacción de amplificación se utilizó una suspensión celular de *P. syringae* pv. *savastanoi* lisada a 100°C y centrifugada.

Para obtener los amplicones que posteriormente se clonaron, se utilizó una polimerasa de alta fidelidad para obtener mejores amplificaciones y disminuir el error de lectura en comparación con una polimerasa convencional. Para los fragmentos de hasta 3Kb se utilizó una polimerasa especial para dicho tamaño (BIO-X-ACT DNA Short Polymerase, Bioline) y otra para los fragmentos más grandes (BIO-X-ACT DNA Long Polymerase, Bioline).

Se llevó a cabo una purificación de los productos de PCR mediante un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Antes de proceder a la clonación de los amplicones, se estimó analíticamente la concentración de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, por comparación de la intensidad de la fluorescencia de las bandas con la correspondiente a las bandas del marcador Hyperladder I (Bioline). La concentración adecuada de ADN de cada muestra se determinó con la fórmula que se muestra en la figura 1.

$$\frac{\text{ng vector}/\mu\text{l} \times \text{Tamaño inserto (kb)} \times 2}{\text{Tamaño vector (kb)}}$$

Figura 1: Fórmula para determinar la concentración del producto de PCR purificado requerida para la reacción de clonación en el vector TOPO.

En los casos en los que la cantidad de ADN fue insuficiente, se concentraron las muestras con el equipo speed vac para aumentar la concentración de ADN. Cuando la cantidad de ADN de las muestras fue excesiva, se realizaron las diluciones correspondientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

La clonación se realizó en el vector pENTRTMTOPO[®]. Para ello se utilizó el estuche comercial “pENTR/SD/D-TOPO cloning Kit” (Invitrogen) y se siguieron los pasos del protocolo adjunto, que se basa en una breve reacción a temperatura ambiente.

La transformación química de *E. coli* se realizó utilizando el kit comercial de células “One Shot Match1 –T1 Chemically Competent *E. coli*” (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transformantes se seleccionaron en medio de cultivo sólido LB suplementado con kanamicina, para que sólo crecieran las bacterias que incorporaron el plásmido.

Para la comprobación de los transformantes, se utilizó la técnica “Boiling-Prep” (Holmes *et al.*, 1981), para extraer el ADN plasmídico. Para linealizar el plásmido, se llevó a cabo la digestión de este producto mediante enzimas de corte único en el plásmido (Not I) y se comprobó su tamaño en un gel de agarosa al 0,8%, utilizando tampón 1xTAE (Sambrook *et al.*, 1989) y a un voltaje constante de 80V. Como marcador de peso molecular se utilizó Hyperladder I (Bioline). Se detectaron los transformantes por comparación del tamaño con el vector sin inserto.

La integridad del inserto en los plásmidos recombinantes se comprobó mediante secuenciación (Macrogen, Korea), y se retuvieron sólo los clones en los que el 100% de nucleótidos fueron idénticos a los del efector.

Para la clonación en un vector de expresión, se llevó a cabo la reacción LR para la ligación entre el plásmido de expresión (pCPP5040 o pCPP3234) y cada efector. Se utilizó la enzima comercial LR Clonase (Invitrogen) y se siguió el protocolo del fabricante, que se basa en una incubación de 1 hora a 25°C, y se concluye añadiendo proteinasa K e incubando 10 minutos a 37°C.

Las transformaciones por electroporación de *E. coli* (NEB10β) y de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A se realizaron mediante un pulso eléctrico de 1,25KV en una cubeta de 0,1 cm, y la recuperación de las células en medio de cultivo LB durante 1 hora a 37°C y KMB durante 2 horas a 25°C, respectivamente. Los transformantes se seleccionaron en medio de cultivo sólido LB y KMB respectivamente, suplementado con gentamicina o espectinomicina, para que sólo crecieran las bacterias que incorporaron el plásmido.

MATERIAL Y MÉTODOS

La presencia del plásmido recombinante en *E. coli* NEB10 β se comprobó mediante amplificación por PCR del ADN de las colonias transformantes obtenidas. Para ello, se utilizaron los cebadores diseñados y las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente. El ADN molde para la reacción, se obtuvo cogiendo una pequeña muestra de cada colonia con un palillo y diluyéndolo en 5 μ l de agua mili Q.

La comprobación de la adquisición del plásmido recombinante por *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, se realizó por comparación de los perfiles plasmídicos de los transformantes obtenidos y la cepa 1448A, en un gel de agarosa al 0,8%, utilizando tampón 1xTAE (Sambrook *et al.*, 1989) y a un voltaje constante de 80V, siguiendo una metodología estándar de extracción de plásmidos a pequeña escala (Zhou C *et al.*, 1990).

Inoculación en vaina

Los ensayos en vaina de judía se realizaron con la variedad comercial Helda. La inoculación se realizó pinchando la vaina con un palillo impregnado en los diferentes cultivos bacterianos frescos (Harper *et al.*, 1987; Hitchin *et al.*, 1989). Se hicieron tres repeticiones en vainas distintas.

RESULTADOS

Amplificación de efectores de *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335

Para comenzar el estudio se llevó a cabo el ensayo de amplificación de los 11 efectores de interés de *P. syringae* pv. *savastanoi* (AER-0000168, AER-0000625, AER-0000629, AER-0000741, AER-0001776, AER-0001936, AER-0003015, AER-0004680, AER-0004681, AER-0004685 y AER-0004725). Tras diversas pruebas realizadas con una polimerasa convencional, se determinaron unas condiciones que permitieron la amplificación de la mayoría de efectores, detalladas en el apartado de material y métodos.

Los dos efectores de mayor tamaño, AER-0000741 (2739 pb) y AER-0004685 (5823 pb), no se consiguieron amplificar con la polimerasa convencional y se decidió utilizar una polimerasa de alta fidelidad especial para productos de gran tamaño. Se siguieron las condiciones de amplificación del protocolo adjunto (BIO-X-ACT DNA Short/Long Polymerase, Bioline) y AER-0000741 se amplificó, aunque no con mucha intensidad, mientras que AER-0004685 no se logró amplificar. El resto de efectores se amplificaron con la polimerasa de alta fidelidad para productos de pequeño tamaño. En las amplificaciones de los productos de AER-0004681 y AER-0004680 aparecieron bandas espurias y se recortó la banda del gel de agarosa para poder llevar a cabo la purificación del producto de interés; se muestran en la Figura 3. En los casos en que esto no ocurrió, se purificó el producto de PCR directamente.

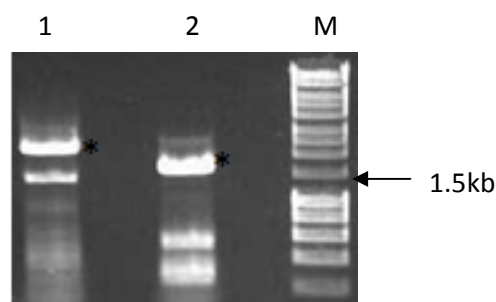


Figura 2. Amplificación de los genes de efectores de *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, AER-0004681 (1) y AER-0004680 (2), marcador molecular (Hyperladder I, Bioline) (M). Los efectores fueron amplificados por PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad (BIO-X-ACT DNA Short Polymerase, Bioline). Los productos de PCR se concentraron y se muestran en un gel de agarosa al 0.8%. Las bandas correspondientes al amplicón esperado se denotan con asterisco, y fueron recortadas del gel para su purificación y clonación.

RESULTADOS

Las condiciones del programa de PCR se mantuvieron constantes para todas las amplificaciones con polimerasas de alta fidelidad, siguiendo el protocolo adjunto (BIO-X-ACT DNA Short/Long Polymerase, Bioline), únicamente se introdujeron variaciones en el tiempo que determina el tamaño de los amplicones esperados (1 minuto por Kb amplificada). Los efectores amplificados y purificados se muestran en la Figura 2.

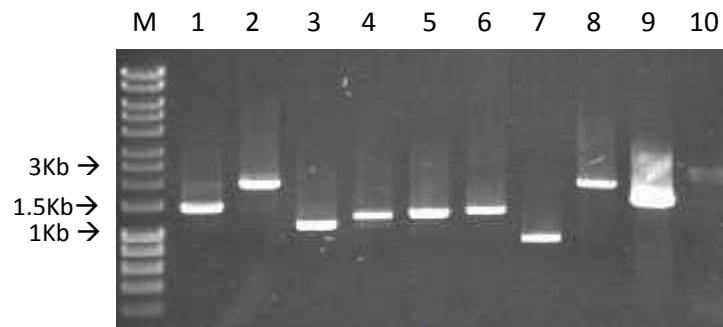


Figura 3: Amplificación de genes de efectores de *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, AER-0000629 (1), AER-0004681 (2), AER-0000168 (3), AER-0001776 (4), AER-0003015 (5), AER-0004680 (6), AER-0004725 (7), AER-0000625 (8), AER-0001936 (9), AER-0000741 (10), marcador molecular (Hyperladder I, Bioline) (M). Los efectores fueron amplificados por PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad (BIO-X-ACT DNA Short Polymerase; BIO-X-ACT DNA Long Polymerase, Bioline) y se separaron en un gel de agarosa; las bandas correspondientes a cada efector se purificaron del producto de PCR o del gel de agarosa, en cada caso, usando un estuche comercial (QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), y se eluyeron en 30 μ l. Una alícuota de 5 μ l de estas soluciones se muestran separadas en un gel de agarosa al 0.8%, utilizando tampón 1xTAE y a un voltaje de 80V.

Clonación de los amplicones

En el proceso de clonación, se utilizaron tres plásmidos distintos, el vector pENTRTMTOPO[®], para clonar el efector y obtener un alto número de copias del plásmido recombinante, y dos vectores de expresión diferentes, pCPP5040 y pCPP3234, para regular la expresión del gen clonado.

La frecuencia de clonación de los efectores en el vector pENTRTMTOPO[®] fue muy baja (4%), aunque se obtuvieron los transformantes de AER-0000629, AER-0001776, AER-0001936, AER-0003015, AER-0004680, AER-0004681 Y AER-0004725. Para comprobar que los fragmentos insertados tenían un 100% de identidad con los efectores, se analizaron los resultados de la secuenciación mediante blast. No ocurrió así en la

RESULTADOS

mayoría los casos. En pequeños fragmentos de las secuencias de AER-0004681, AER-0001776 y AER-0004680 analizadas, se encontraron diversas homologías con una amplia variedad de especies, genéticamente muy alejadas entre sí y muy distintas a los genes de los efectores. Al observar que se había insertado otro fragmento, no se continuó el estudio con ellos.

Los efectores AER-0003015 y AER-0004725 también se clonaron, pero al analizar su secuencia se observaron variaciones de un nucleótido, como se observa en la figura 4. No se continuó trabajando con ellos por posibles cambios en la expresión de la proteína.

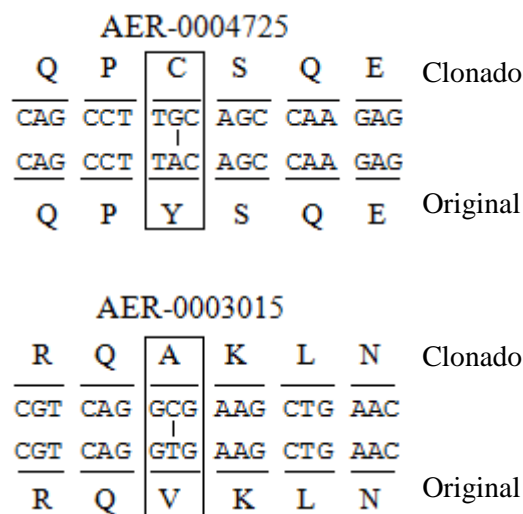


Figura 4. Zona de variación de un nucleótido en la secuencia de efectores AER-0004725 y AER-0003015, clonados en pENTRTMTOPO[®], tras analizar los resultados de secuenciación.

De los efectores clonados en el vector pENTRTMTOPO[®], sólo dos tuvieron un 100% de identidad con la secuencia de los genes de efectores correspondientes, AER-0000629 y AER-0001936. Con éstos, se continuó el estudio.

Inicialmente, se abordó la transferencia de los efectores clonados en pENTR al vector de expresión pCPP5040. Este vector mostró una frecuencia de clonación muy baja (2%), pero se obtuvieron los transformantes de los efectores AER-0000629 y AER-0001936. Se procedió a su transformación a *P. syringae* pv. phaseolicola y al analizar los transformantes, se observó que se había clonado un fragmento de mayor tamaño al esperado.

Se decidió utilizar el vector de expresión pCPP3234, cuyas características son similares a las de pCPP5040. La frecuencia de clonación del efector AER-0001936 en el nuevo

RESULTADOS

vector, tras analizar los transformantes mediante PCR, fue muy alta (90%). No ocurrió lo mismo con el efector AER-0000629 y para aumentar la eficiencia de la reacción LR de clonación, se decidió aumentar el tiempo de la reacción de 1 a 2 horas. De esta manera de obtuvieron los productos clonados.

Transformación de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A

Al transformar con el vector pCPP5040 y analizar el perfil plasmídico de los transformantes se observaron resultados no esperados, ya que el tamaño del plásmido recombinante introducido en 1448A era de un tamaño mayor de esperado, se observa en la Figura 5. Se pensó que en el vector pCPP5040, no sólo se inserto el fragmento del efector, sino que pudo haberse insertado el efector con el vector pENTR completo, y esto dio lugar a un plásmido de mayor tamaño. Además, en uno de los transformantes se observó una banda correspondiente a un plásmido que no era el esperado. Por esta razón, se decidió utilizar el plásmido pCPP3234 como nuevo vector de expresión. En la Figura 6 se observa que el tamaño del plásmido introducido en 1448A es correcto y coincide con el tamaño del plásmido recombinante aislado de *E. coli*, utilizado como control.

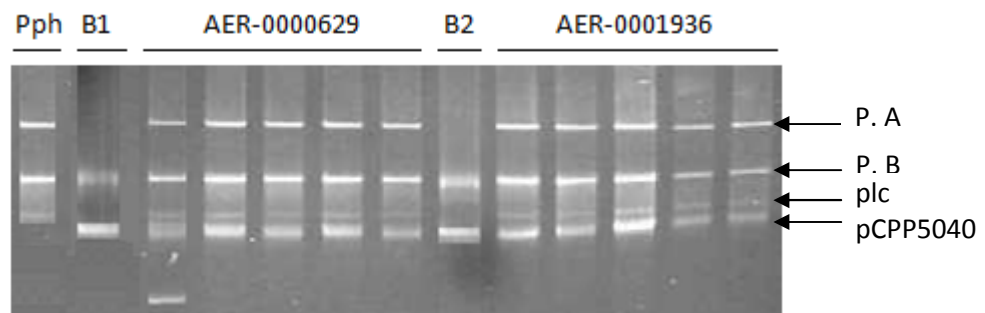


Figura 5. Perfil plasmídico de colonias transformantes de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A con el vector pCPP5040 conteniendo los efectores AER-0000629 (pCPP5040+629) y AER-0001936 (pCPP5040+1936). De izquierda a derecha: Pph 1448A sin transformar (Pph), perfil de pCPP5040+629 aislado de *E. coli* (B1), transformantes de pCPP5040+629 en Pph 1448A (AER-0000629), perfil de pCPP5040+1936 aislado de *E. coli* (B2), transformantes de pCPP5040+1936 en Pph 1448A (AER-0001936). P. A: Plásmido A; P. B: Plásmido B; plc: plásmidos linearizados y ADN cromosómico; pCPP3234: plásmido pCPP3234 con cada efector insertado.

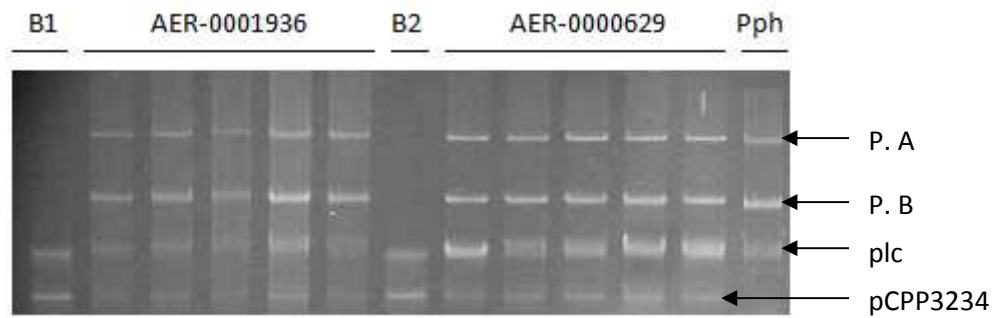


Figura 6. Perfil plasmídico de colonias transformantes de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A con el vector pCPP3234 conteniendo los efectores AER-0000629 (pCPP3234+629) y AER-0001936 (pCPP3234+1936). De izquierda a derecha: perfil de pCPP3234+1936 aislado de *E. coli* (B1), transformantes de pCPP3234+1936 en Pph 1448A (AER-0001936), perfil de pCPP3234+629 aislado de *E. coli* (B2), transformantes de pCPP3234+629 en Pph 1448A (AER-0000629), Pph 1448A sin transformar (Pph). P. A: Plásmido A; P. B: Plásmido B; plc: plásmidos linealizados y ADN cromosómico; pCPP3234: plásmido pCPP3234 con cada efector insertado.

Evaluación de síntomas de la actividad de AER-0000629 y AER-0001936 en judía

Con el fin de evaluar la actividad de AER-0000629 y AER-0001936 en vainas de judía, se inocularon vainas de la variedad Helda con los diferentes mutantes de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (pCPP3234+629, pCPP3234+1936, pCPP5040+629 y pCPP5040+1936).

Todos los mutantes evaluados mostraron la misma capacidad que la cepa silvestre *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, tomada como cepa control, para producir la enfermedad en vainas de judía; se observan en la Figura 7. *P. syringae* pv. *savastanoi* se utilizó como cepa control de reacción de hipersensibilidad (HR), y como controles negativos, la cepa *E. coli* y una picadura sin cultivo bacteriano. Se observaron los síntomas a las 24, 48 y 72 horas de la inoculación. Todos los mutantes causaron síntomas evidentes de enfermedad a las 48 horas de la inoculación.

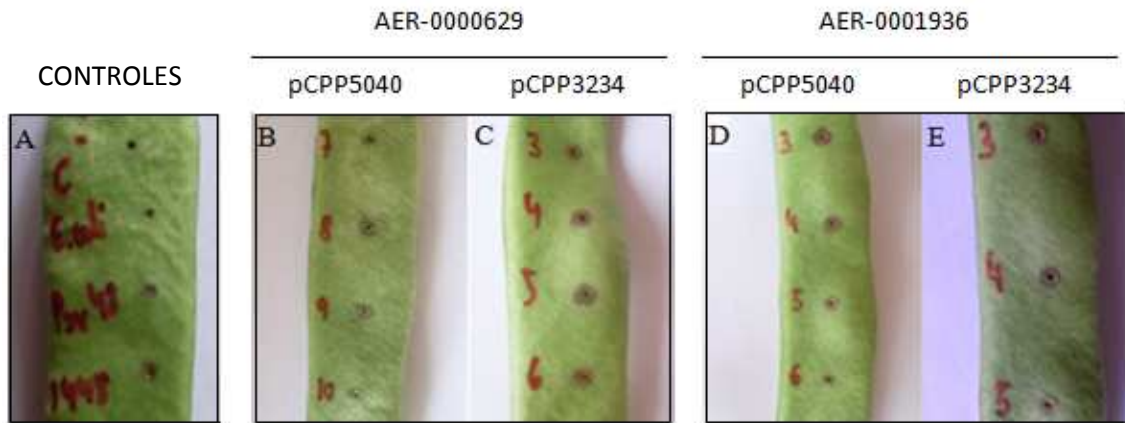


Figura 7. Los efectores AER-0000629 y AER-0001936 no modifican significativamente la interacción entre *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A y judía. Respuesta de vainas de judía, tras inoculaciones de la cepa *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, conteniendo los efectores AER-0000629 y AER-0001936, procedentes de *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335. A. Controles: picadura de palillo sin inóculo como control negativo (C⁻); picadura con cultivo de *E.coli* como control negativo (*E.coli*); picadura con cultivo de *P. syringae* pv. savastanoi como control de HR (Psv48), picadura con cultivo bacteriano de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A como control de enfermedad (1448). B-E. Picadura de diferentes transformantes de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A conteniendo los dos efectores, clonados en los dos vectores de expresión diferentes, como se indica en la parte superior.

DISCUSIÓN

En el trabajo realizado, se ha abordado el estudio de un conjunto de 11 efectores de la bacteria modelo *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, para la identificación de genes que induzcan respuestas de incompatibilidad en judía. Sin embargo, no se ha podido llevar a cabo el estudio de los 11 efectores con los que se comenzó. Esto ha ocurrido por diversos problemas que han conllevado al abandono de la mayoría de los efectores, excepto los efectores AER-0000629 y AER-0001936, con los que se ha realizado el estudio. En este apartado se analizarán las razones por las que han podido ocurrir estos problemas.

El gen AER-0004685 (5823 pb) no se consiguió amplificar. Esto pudo ser debido a su gran tamaño, pese a que se utilizó una polimerasa especial para productos de gran tamaño. Para un futuro, se aconseja probar una polimerasa para productos de gran tamaño de otra casa comercial.

El hecho de que los primers que se utilizaron en la amplificación tuvieran que estar situados en el inicio y final del gen exactamente, y que el oligo forward tuviera una cola para la posterior clonación en pENTR, pudo influir en los problemas de amplificación, ya que en la amplificación de los efectores AER-0004681 y AER-0004680 aparecieron bandas espurias, posiblemente debidas a la inespecificidad de los cebadores.

La clonación en el vector pENTR tuvo una eficiencia muy baja (4%), esto pudo ser debido a que la enzima topoisomerasa utilizada para la reacción de clonación es extremadamente termosensible y no se mantuvieron las condiciones de baja temperatura necesarias durante la reacción y el almacenaje de la enzima.

Tras analizar los resultados de la secuenciación, después de la clonación en pENTR, se observó que en el vector se clonaban fragmentos diferentes a los efectores AER-0004681, AER-0001776 y AER-0004680. Se desconoce la razón por la que esto ocurrió y se propone realizar las comprobaciones de la clonación de los efectores por PCR, en lugar de plásmidos obtenidos de minipreparaciones, utilizando los mismos oligos que en las amplificaciones, para evitar errores de este tipo.

En las secuencias de los amplicones de AER-0003015 y AER-0004725 clonados, se encontraron variaciones de un nucleótido, que daban lugar a un cambio de aminoácido,

y por posibles cambios en la conformación proteica y por lo tanto en la expresión de la misma, se abandonó el estudio con ellos. Tras estudiar los resultados de la secuenciación se llegó a la conclusión de que los cambios de nucleótidos fueron producidos por errores de lectura de la polimerasa de alta fidelidad y se propone utilizar una polimerasa con mayor grado de fidelidad, para disminuir aún más el error de lectura.

La clonación con el vector de expresión pCPP5040, dió lugar a un plásmido de tamaño mayor al esperado. Esto puede ser debido a que se introdujo el vector pENTR junto con el efector, en lugar del efector sólo. De hecho, estudios realizados con otros efectores, en otro laboratorio con el que se colabora, han demostrado que esto es así. De todas formas, las construcciones obtenidas en pCCP5040 se están analizando para ver lo que ocurre en nuestro caso. Además en un transformante también se observó la presencia de un plásmido desconocido. Al observar estos resultados se decidió utilizar un vector de expresión similar, pCPP3234, con el que se resolvieron los problemas de clonación y se consiguió la transferencia de los efectores AER-0000629 y AER-0001936.

Tras clonar los efectores (AER-0000629 y AER-0001936) en *P. syringae* pv. phaseolicola, los transformantes obtenidos inoculados en vaina, muestran síntomas claros de enfermedad, por lo que aparentemente no participan en la restricción del espectro de huésped de *P. syringae* pv. savastanoi en judía. Sería interesante llevar a cabo el mismo ensayo en hojas de judía, en vez de en vaina, para comprobar si se desarrolla la enfermedad. Además, se deberían realizar ensayos de la expresión de cada uno de los genes clonados, para comprobar que el efector que se está expresando es el de *P. syringae* pv. savastanoi y no su homólogo en *P. syringae* pv. phaseolicola.

Para investigaciones futuras, dentro del mismo proyecto, queda pendiente realizar los ensayos con los efectores que se abandonaron en este trabajo. El análisis detallado de un microorganismo fitopatógeno y sus determinantes de virulencia/avirulencia, requiere necesariamente el estudio de su interacción tanto con plantas modelos hospedadoras como no hospedadoras y es parte del trabajo que se plantea.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, J. and Lenné, J. M. (1998) The pathology of food and pasture legumes. CAB International, Wallingford, UK.
- Gardan, L., David, C., Morel, M., Glickmann, E., Abu-Ghorrah, M., Petit, A. and Dessaux, Y. (1992) Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1780-1783.
- Harper, S., Zewdie, N., Brown, IR. and Mansfield, JW. (1987) Histological, physiological and genetical studies of the responses of leaves and pods of *Phaseolus vulgaris* to three races of *Pseudomonas syringae* pv. coronofaciens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**: 153-172.
- Hirano, S. S. and Upper, C. D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 624-653.
- Hitchin, F.E., Jenner, C. E., Harper, S., Mansfield, JW., Barber, C. E. and Daniels, M. J. (1989) Determinant of cultivar specific avirulence cloned from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola race 3. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **34**: 309-322.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method from the preparation of bacterial plasmid. *Analytical Biochemistry* **114**: 193-197
- Hueck, C. J., (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 379-433.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 10875-10880.
- Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J., Walters, K., Betteridge, P., Teverson, D. and Taylor, J. (1991) Gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola and *Phaseolus*. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **4**: 553-562.

- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Deboy, R., Durkin, A. S., Giglio, M. G., Madupu, R., Nelson, W. C., Rosovitz, M. J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D. H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C. M., Chatterjee, A. K., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Mansfield, J., Collmer, A. and Buell, C. R. (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *Journal Bacteriology* **187**: 6488-6498.
- Keane, PJ., Kerr, A. and New, PB. (1970) Crow gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal of Biological Sciences* **23**: 585-595
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* **44**: 301-307.
- Klement, Z. and Lovrekovich, L. (1961) Defence reaction induced by phytopathogenic bacteria in pods. *Journal Phytopathology* **41**: 217-227.
- López-Solanilla, E., Bronstein, P. A., Schneider, A. R. and Collmer, A., (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Molecular Microbiology* **54**: 353-365.
- 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. *Molecular Plant Pathology* **10**: 721-734.
- Murillo, J. and Sesma, A. (2001) The biochemistry and molecular genetics of host range definition in *Pseudomonas syringae*. *Fitopatología Mediterranea* **40**: 3-26
- Ramos, C. (2009) Desatascando nudos: la tuberculosis del olivo. *Actualidad SEM* **47**: 34-39
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I. M., Murillo, J., López-Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Mosquera, M. E., Penyalver, R., López, M. M., Quesada, J. M., Biehl, B. S., Perna, N. T., Glasner, J. D., Cabot, E. L., Neeno-Eckwall, E. and Ramos, C. (2010) Annotation and overview of the

BIBLIOGRAFÍA

- Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology* **12**: 1604-1620.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY.
- Schechter, L.M., Roberts, K.A., Jamir, Y., Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004) *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *Journal Bacteriology* **186**: 543-555.
- Smith, I.M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Phillips, D. H. and Archer, S.A. (1992) Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa, Madrid.
- Teverson, D.M. (1991) Genetics of pathogenicity and resistance in the halo-blight disease of beans in Africa. PhD diss, University of Birmingham, Birmingham, UK.
- Young, J. M. (2010) Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* **82**: S1.5-S1-14.
- Zhou, C., Y. Yang & A. Y. Jong, (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**: 172-173.