



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

**COLINA Y FOSFORILCOLINA FOSFATASA, SU RELACIÓN CON
LA PATOGÉNESIS CAUSADA POR *PSEUDOMONAS SYRINGAE***

Mic. Primo, Emiliano David

DIRECTORA: Dra. Ángela T. Lisa

CO-DIRECTOR: Dr. Walter F. Giordano

Río Cuarto, 2017

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Dra. López Nancy Irene

Universidad Nacional de Buenos Aires

Firma..... Aclaración.....

Dra. Luna María Virginia

Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma..... Aclaración.....

Dr. Barra José Luis

Universidad Nacional de Córdoba

Firma..... Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha.....

Calificación.....

A mis padres y hermanos

A Segundo Antonio Primo...

Agradecimientos

Estos agradecimientos son para todas aquellas personas que han colaborado para la realización de este trabajo y en mi formación profesional, a través de sus aportes científicos, sus conocimientos, consejos y amistad. A todos ellos, les estoy muy agradecido.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y al Departamento de Biología Molecular por haber, brindando el espacio físico e instalaciones para el desarrollo de este trabajo y mi desarrollo profesional.

A la Dra. Teresita Lisa, por abrirme las puertas de su laboratorio, el entrañable "Lab. 15", y permitirme conocer el mundo de la ciencia. Por darme su gran apoyo y confianza durante mi doctorado, brindando sus consejos y aportes para realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Walter Giordano, por su apoyo y constante predisposición para colaborar en la realización de esta tesis.

A la Dra. Nancy I. Lopez, Dra. Virginia Luna, y al Dr. José L. Barra por ser Jurado de Tesis e integrantes de la comisión evaluadora, y por sus consejos y aportes, que siempre fueron constructivos para el desarrollo de mi trabajo.

A mis padres y hermanos, quienes siempre me han dado todo su apoyo. Gracias por ser un pilar importante en mi vida, los amo.

A mi abuelo Segundo Antonio Primo, quién fue una persona muy importante en mi vida. Siempre estaré agradecido por ser un ejemplo para mí, y por los valores que me ha enseñado.

A la Dra. Mónica Garrido, por su predisposición y ayuda con *P. syringae* en los comienzos de esta tesis.

Al Dr. Diego Sanchez, por su amistad y por compartir tantos años de laboratorio en donde me has enseñado muchas cosas sobre Biología Molecular.

A los integrantes de nuestro grupo de trabajo, Dra. Paola Beassoni, Mic. Martín Pissinis, Dr. Crithian Boetsch, Dr. Lucas Gallarato. Por brindar su ayuda cuando lo he necesitado, y por su amistad que durante estos años genero un excelente ambiente de trabajo.

A la Dra. Cecilia Challier, una gran persona que se incorporó en nuestro grupo de trabajo durante estos últimos años. Gracias Ceci por tu hermosa amistad.

A la Mic. Camila Doblas, mi primer tesista, muchas gracias Cami por confiar en mí y por tu buena predisposición para el trabajo.

A la Dra. Maricel Santoro, por su gran ayuda y colaboración para este trabajo. Gracias amiga.

Al Dr. Julio Vicario, por su amistad y por haberme brindado la oportunidad de compartir investigaciones muy que fueron muy enriquecedoras.

Al Dr. Lucio Valetti, por su amistad y ayuda para este trabajo.

A todas las personas del departamento de biología molecular que me han brindado su ayuda y amistad; Flor P., Juli L., Fiore, Pablo, Naty, Lore, Luli, Juli C., Aye, Loli, Lifu, Romi, Fernanda, Gastón, Agus, Fernando, Alexis, Lucas, Tamy, Meli...

A mis amigos de la carrera de Microbiología; Mauri, Kilmu, Sole, Romi M., Belén P., Mariana y German G.

A Alejandro Saffadi, ese hermano de la vida que adopte hace más de una década, gracias por estar siempre.

A mis amigos con los que he compartido grandes momentos en estos años; Pablo Q, German P., Maxi B., Claudio P., Maxi M., Valentín, Barbero, Martín N. y Matías.

RESUMEN

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentra la especie fitopatógena *P. syringae*, que afecta a una amplia variedad de plantas causando importantes pérdidas económicas cuando las condiciones ambientales para su proliferación son óptimas. Durante el proceso de infección existen diversos factores que son responsables de la patogénesis y la virulencia de los fitopatógenos: apéndices que favorecen la movilidad, compuestos tensioactivos, fitotoxinas, enzimas proteolíticas, exopolisacáridos y proteínas de superficie que median la adhesión. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en *P. aeruginosa* y *P. syringae* demostraron que colina, un compuesto de amonio cuaternario, es utilizada como fuente de energía y cumple con funciones de osmoprotección en las bacterias, además induce, entre otras, la actividad fosforilcolina fosfatasa (PChP), que cataliza la hidrólisis de fosforilcolina. A su vez, en la fase saprofítica de los fitopatógenos, la existencia de fosforilcolina en apoplastos y de colina en los exudados de raíz y en los tejidos de la planta, permitirían a las bacterias obtener los nutrientes necesarios para multiplicarse, colonizar y contribuir así a su patogénesis.

En Argentina el estudio de bacterias fitopatógenas del género *Pseudomonas* es poco frecuente, así como también, el uso de herramientas moleculares para su identificación. En esta Tesis Doctoral, se procedió a la clasificación de la cepa “S5”, aislada a partir de hojas de avena con una típica sintomatología de infección bacteriana. Para ello, se realizó una caracterización fenotípica mediante el esquema LOPAT, y genotípica, mediante el análisis de secuencias del gen 16S rRNA y BOX-PCR. Los resultados de estos estudios sugieren que la cepa S5 se puede agrupar dentro de la especie *P. syringae*, presentando una mayor identidad con el pv. *atropurpurea*. Además, se determinó que S5 es capaz de infectar otros cultivos de importancia agronómica para la región, como soja y maní. Esta capacidad de proliferar en diferentes hospederos, otorga una ventaja adaptativa permitiendo al fitopatógeno prevalecer en el ambiente donde se encuentra.

En la cepa S5 se determinó la producción de diferentes factores que favorecen la virulencia tales como: movilidad (*swarming* y *swimming*), producción de acil-homoserin lactonas de cadena larga, biosurfactantes, proteasas, biofilm y tabtoxina, una fitotoxina que

genera clorosis en el tejido vegetal. Colina como única fuente de nitrógeno o fructosa como única fuente de carbono, incrementan la actividad toxigénica de tabtoxina en *P. syringae* S5. También en esta cepa, la presencia de colina o sus derivados metabólicos incrementan la síntesis de glicolípidos con actividad antifúngica. Interesantemente, la presencia de colina generó un aumento de la movilidad tipo *swarming* en la cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, pero no en la cepa S5. En resumen, cuando colina es utilizada como fuente de nitrógeno, además de inducir la actividad PChP, incrementa la actividad toxigénica de tabtoxina, la producción de glicolípidos y la movilidad tipo *swarming* en diferentes cepas de *P. syringae*.

Con la concreción de este trabajo de Tesis Doctoral, se han realizado aportes sobre la clasificación fisiológica del fitopatógeno *P. syringae* aislado en nuestra región. También se contribuyó al conocimiento sobre su rango de hospedadores y a la producción de factores involucrados en la virulencia. Estos estudios permiten ahondar sobre el mecanismo de adaptación y colonización de las bacterias, conocimientos básicos que ayudarán a mejorar las técnicas de control de enfermedades en cultivos de importancia agronómica.

SUMMARY

Inside the genus *Pseudomonas* we can find the species *P. syringae* which can be housed in a wide variety of plants, causing significant economic losses when the environmental conditions for its proliferation are optimal. During the process of infection there are several factors responsible for the pathogenesis and virulence of phytopathogens such as mobility appendages, surfactant compounds, phytotoxins, proteolytic enzymes, exopolysaccharides and surface proteins that mediate adhesion.

Studies previously performed in our laboratory on *P. aeruginosa* and *P. syringae* showed that choline, a quaternary ammonium compound, is used as energy source and has functions of osmoprotection in bacteria, besides inducing, among others, the phosphorylcholine phosphatase (PchP) activity, which catalyzes the hydrolysis of phosphorylcholine. In the saprophytic phase of phytopathogens, the presence of phosphorylcholine in apoplasts and choline in root exudates as well as their presence in plant tissues would allow bacteria to obtain the necessary nutrients to multiply, colonize tissues and contribute to their pathogenesis.

In Argentina the study of phytopathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas* is rare, as well as the use of molecular tools for their identification. In this Doctoral Thesis, we proceeded to the classification of the strain "S5", isolated from leaves of oats with typical symptomatology of bacterial infection. We performed a phenotypic characterization using the LOPAT scheme and a genotypic characterization, by sequence analysis of the 16S rRNA gene and BOX-PCR. The results of these studies suggest that strain S5 belongs to species *P. syringae*, presenting a greater identity with the pv. *atropurpurea*. It was determined that this phytopathogen is capable of infecting other crops of agronomic importance for the region, such as soybean and peanuts. This ability to proliferate in different hosts gives the phytopathogens adaptive advantage allowing it to prevail in the environment where it is found. Furthermore, we determined in S5 strain the production of different virulence-promoting factors, such as mobility (swarming and swimming), production of long chain acyl-homoserinlactones, biosurfactants, proteases, biofilm and tabtoxin, a phytotoxin that generates chlorosis in plant tissues. Choline as nitrogen source or fructose as carbon source increased, in

P. syringae S5, the toxigenic activity of tabtoxin. The synthesis of glycolipids, with antifungal activity, in S5 strain was also increased in the presence of choline. Interestingly, choline generated an increase in swarming mobility in *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, but no in S5 strain. In summary, when used as a source of nitrogen choline not only induces PChP activity but also increases the toxigenic activity of tabtoxin, glycolipid production and swarming mobility in different strain of *P. syringae*.

This work of Doctoral Thesis has contributed to the physiological classification of the phytopathogen *P. syringae* isolated in our region. It has also contributed to the knowledge about its range of hosts and the production of factors involved in virulence. These studies allow us to know about the mechanism of adaptation and colonization of bacteria, basic knowledge that will help to improve the techniques to control diseases in crops of agronomic importance.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
SUMMARY	III
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	XI
Abreviaturas	XII
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Características del género <i>Pseudomonas</i>	1
1.2 Características de <i>Pseudomonas syringae</i>	2
1.3 Interacción planta-patógeno.....	3
1.4 Factores de virulencia	5
1.5 Colina: un compuesto ubicuo en la naturaleza	9
1.6 <i>P. syringae</i> , microorganismo patógeno y su relación con los cultivares de importancia económica en nuestro país	11
1.7 Características de la cepa S5 aislada de hojas de avena	13
Capítulo 2: Hipótesis y objetivos	14
2.1 Hipótesis de trabajo:	14
2.2 Objetivo General:.....	14
2.3 Objetivos específicos:.....	14
Capítulo 3: Materiales y Métodos.....	15
3.1 Medios de cultivos bacterianos:.....	15
3.2 Medio para el crecimiento de plantas	16
3.3 Cepas bacterianas y plásmidos.....	17
3.4 Pruebas LOPAT para la identificación de <i>P. syringae</i>	18
3.5 Secuenciación del gen <i>ARNr 16S</i> de la cepa S5	19
3.5.1 Análisis de la secuencias del gen <i>ARNr 16S</i>	19
3.6 Medición de la formación de biofilms en microplacas.....	20

3.7 Caracterización de resistencia al cobre y antibióticos	21
3.8 Ensayos de movilidad bacteriana.....	21
3.9 Detección de toxinas	22
3.9.1 Detección de siringomicina.....	22
3.9.2 Detección de tabtoxina	22
3.10 Actividad Proteasa	23
3.11 Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína soluble.....	23
3.12 Ensayos de <i>quorum-sensing</i>	24
3.12.1 Detección de AHLs de cadena corta	24
3.12.2 Detección de AHLs de cadena larga	24
3.13 Técnicas de manipulación de ADN	25
3.13.1 Extracción de ADN genómico	25
3.13.2 Preparación de ADN plasmídico.....	25
3.13.3 Conjugación bacteriana	25
3.14 Cultivo de plantas	25
3.15 Ensayos de infección en plantas	26
3.15.1 Solución bacteriana utilizada para realizar la infección en plantas.....	26
3.15.2 Ensayo de infección mediante la técnica de hoja desprendida.....	26
3.15.3 Ensayo de infección en plantas mediante la técnica de aspersión.....	27
3.15.4 Aislamiento de <i>P. syringae</i> desde hojas infectadas in-vitro	27
3.16 Amplificación de secuencias repetidas a lo largo del genoma.	28
3.16.1 BOX-PCR fingerprint.	28
3.16.2 Análisis de los datos genotípicos.	29
3.17 Detección del gen <i>hrcV</i>	29
3.18 Detección de los genes <i>syrD</i> y <i>syrB</i> involucrados en la producción de siringomicina..	30
3.19 Determinación de la tensión superficial.....	31
3.20 Extracción y obtención del biosurfactante glicolipídicos.	32
3.21 Ensayos colorimétricos para la detección y cuantificación de glicolípidos.....	32
3.21.1 Detección de glicolípidos en placas de agar CTAB/MB	32
3.21.2 Cuantificación de glicolípidos; reacción del órcinol.....	32
3.21.3 Detección de glicolípidos en TLC.....	33
3.21.4 Espectroscopía Infrarroja (IR).....	33
3.21.5 Espectrometría de masas (MS).....	33

3.22 Determinación de la inhibición del crecimiento de <i>G. candidum</i> por agentes surfactantes	33
3.23 Análisis estadístico	34
<i>Capítulo 4: Resultados y Discusión</i>	35
Caracterización fenotípica y filogenética.....	35
4.1 Producción de pigmentos fluorescentes.....	35
4.2 Caracterización fenotípica en base al esquema LOPAT.....	36
4.2.1 Producción de Lévano:.....	36
4.2.2 Presencia de citocromo C oxidasa:	36
4.2.3 Pectinólisis en papa:.....	37
4.2.4 Producción de arginina dihidrolasa:.....	37
4.2.5 Respuesta de hipersensibilidad (RH) de plantas de tabaco:.....	37
4.3 Caracterización filogenética mediante herramientas moleculares.....	38
4.3.1 Detección del gen <i>hrcV</i> , localizado en la isla de patogenicidad de genoma.....	38
4.3.2 Amplificación y secuenciación del gen <i>ARNr 16S</i>	40
4.3.3 BOX-PCR fingerprint: diversidad entre cepas de <i>P. syringae</i>	43
4.4 Caracterización de factores de virulencia en <i>P. syringae</i> S5.....	47
4.4.1 Resistencia al cobre y antibióticos.	47
4.4.2 Movilidad bacteriana.....	49
4.4.3 Detección cualitativa de actividad proteasa	50
4.4.4 Análisis de <i>quorum-sensing</i>	51
4.4.4.1 Determinación de AHL de cadena corta.....	51
4.4.4.2 Determinación de AHLs de cadena larga	52
4.4.5 Formación de biofilm.....	53
4.4.6 Detección de la fitotoxina siringomicina	54
4.4.7 Caracterización del compuesto inhibidor del crecimiento de <i>G. candidum</i> producido por <i>P. syringae</i> S5.....	55
4.4.7.1 Detección de biosurfactantes (BS) producidos por <i>P. syringae</i> S5.....	56
4.4.7.2 Determinación de la tensión superficial.	58
4.4.7.3 Detección de ramnolípidos.....	59
4.4.7.4 Extracción, purificación y cuantificación de biosurfactantes (BS).	60
4.4.7.5 Inhibición del crecimiento de <i>G. candidum</i>	61
4.4.7.6 Identificación del biosurfactante por espectroscopia Infrarroja (IR)	62
4.4.7.7 Identificación del BS mediante cromatografía en capa fina (TLC).	64
4.4.7.8 Identificación de glicolípidos mediante espectroscopía de masa (MS)	65
4.4.7.9 Análisis bioinformático de los genes codificantes de la síntesis de ramnolípidos.....	69

4.4.8 Determinación del rango de huésped de la cepa <i>P. syringae</i> S5	71
<i>Capítulo 5</i>	77
Colina y su relación con la producción de diferentes factores patogénicos.	77
5.1 Producción de tabtoxina en <i>P. syringae</i> S5	77
5.1.2 Expresión génica del operón de tabtoxina	79
5.3 Influencia de la fuente de nitrógeno y de carbono en la producción de tabtoxina, y su relación con la actividad proteasa.	79
5.3.1 Determinación de AT y actividad proteasa en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.	80
5.3.2 Determinación de AT y actividad proteasa en presencia de diferentes fuentes de carbono.	81
5.4 Movilidad bacteriana	83
5.5 Cuantificación de glicolípidos producidos en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.	86
5.6 Colina y fosforilcolina fosfatasa (PchP), su relación con la patogénesis en <i>P. syringae</i> .88	
<i>Capítulo 6</i>	91
Conclusiones	91
<i>Bibliografía</i>	92
Anexos	105
Anexo 1	105
Anexo 2	106
Anexo 3	107

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> Diagrama del ciclo de infección de <i>Pseudomonas syringae</i>	4
<u>Figura 2</u> Modelo basado en el perfil transcripcional de la cepa B728a en las superficies foliares.	6
<u>Figura 3</u> Activación de tabtoxina	8
<u>Figura 4</u> Presencia de colina en el tejido vegetal.....	10
<u>Figura 5</u> Placa de <i>Pseudomonas</i> S5.....	13
<u>Figura 6</u> Fluorescencia azul de la cepa S5.....	35
<u>Figura 7</u> Detección de la producción de levano	36
<u>Figura 8</u> Respuesta de hipersensibilidad (RH)	38
<u>Figura 9</u> Detección del gen <i>hrcV</i>	40
<u>Figura 10</u> Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del gen <i>ARNr 16S</i>	42
<u>Figura 11</u> BOX-fingerprint.....	44
<u>Figura 12</u> Dendrograma obtenido de los perfiles BOX- <i>fingerprint</i>	45
<u>Figura 13</u> Movilidad de <i>P. syringae</i> S5.....	49
<u>Figura 14</u> Actividad proteasa.....	50
<u>Figura 15</u> Producción de AHLs de cadena corta	52
<u>Figura 16</u> Producción de AHLs de cadena larga	53
<u>Figura 17</u> Ensayo de detección de siringomicina	55
<u>Figura 18</u> Detección de genes <i>syrB</i> y <i>syrD</i>	56
<u>Figura 19</u> Inhibición en el crecimiento de <i>G. candidum</i>	57
<u>Figura 20</u> Inhibición del crecimiento de <i>G. candidum</i> en presencia de Silwet L-77	58
<u>Figura 21</u> Detección de glicolípidos.....	60
<u>Figura 22</u> Imagen de los halos formados por los glicolípidos.....	61

<u>Figura 23</u> Inhibición del crecimiento de <i>G. candidum</i>	62
<u>Figura 24</u> Espectroscopia infrarroja	63
<u>Figura 25</u> Cromatografía en capa fina (TLC).....	64
<u>Figura 26</u> Espectro experimental del análisis MS ESI(+) Q-TOF de PAOI	66
<u>Figura 27</u> Espectro experimental del análisis MS ESI(+) Q-TOF de S5	68
<u>Figura 28</u> Espectro experimental del análisis MS ESI(+) Q-TOF B728a.....	68
<u>Figura 29</u> Espectro experimental del análisis MS ESI(+) Q-TOF P61	69
<u>Figura 30</u> Ruta de biosíntesis de los ramnolípidos	71
<u>Figura 31</u> Infección en hojas de <i>Glycine max</i>	72
<u>Figura 32</u> Infección en plantas de <i>Lycopersicon esculentum Mill cv Platense</i>	73
<u>Figura 33</u> Microscopia de fluorescencia de <i>P. syringae</i> S5::gfp.....	74
<u>Figura 34</u> Infección en hojas de <i>Avena sativa</i>	75
<u>Figura 35</u> Ensayo de infección en hojas de <i>Arachis hypogaea L. cv. Granoleico</i>	76
<u>Figura 36</u> Detección de actividad toxigénica (AT) de tabtoxina.....	78
<u>Figura 37</u> AT en cultivos con colina como fuente de nitrógeno	78
<u>Figura 38</u> Detección de AT de tabtoxina en cultivos con diferentes fuentes de carbono.....	82
<u>Figura 39</u> Medición de la movilidad tipo <i>swarming</i> y <i>swimming</i>	84
<u>Figura 40</u> Incorporación de colina durante la interacción planta-microorganismo, y su función en <i>P. syringae</i>	89

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1</u> Fitotoxinas producidas por diferentes especies y patovares de <i>Pseudomonas</i>	7
<u>Tabla 2</u> Cepas bacterianas y fúngicas, utilizadas	17
<u>Tabla 3</u> Plásmidos	18
<u>Tabla 4</u> Oligonucleótidos	18
<u>Tabla 5</u> Alineamiento del gen <i>ARNr 16S</i>	40
<u>Tabla 6</u> Descripción de datos de marcadores obtenidos por BOX-PCR.	45
<u>Tabla 7</u> Determinación de la tolerancia a cobre	48
<u>Tabla 8</u> Actividad toxigénica y cuantificación de actividad proteasa	80
<u>Tabla 9</u> Actividad toxigénica y actividad proteasa en diferentes fuentes de carbono.....	82
<u>Tabla 10</u> Síntesis de glicolípidos en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.....	87
<u>Tabla 11</u> Síntesis de glicolípidos en diferentes condiciones de disponibilidad de fosfato.....	87

Abreviaturas

AchE: Colinesterasa
ADE: Agua destilada esteril
ADN: Acido desoxirribonucleico
AN: agar nutritivo
ARN: Ácido ribonucleico
AR: adhesión relativa
AT: Actividad Toxigenica
Avr: proteínas de avirulencia
C: carbono
CTAB: cetiltrimetilamonio bromuro
CV: cristal violeta
DO: Densidad óptica
DMSO: Dimetilsulfóxido
DMG: dimetilglicina
DNTPs: deoxi nucleotidos trifosfato
gr: Gramo
GB: Glicina betaina
RH: Reacción de hipersensibilidad
HPi-BSM: Medio salino alto fosfato
IR: Infrarrojo
LB: Luria Bertani
l: Litro
M: Molar
MB: azul de metileno
mg: Miligramo
MET: Medio mineral mínimo
min: Minuto
mM: Milimolar
ml: Militro
N: Nitrógeno
NAGGA: N-acetil-glutaminilglutamina amida
pb: Pares de bases
PDA: Papa dextrosa agar
PLD: Fosforilipasa D
PLC: Fosforilipasa C

PlcH: Fosfolipasa C hemolitica
PchP: fosforilcolina fosfatasa
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)
Pi: Fosfato inorgánico
PlcH: Fosfolipasa C hemolítica
pv.: Patovar
pvs.: Patovares
P/v: Peso en volumen
rpm: Revoluciones por minuto
TAE: Tris-Acido acético-EDTA
TLC: cromatografía de capa fina
µg: Microgramo
µg/ml: Microgramo por mililitro
µl: Microlitro
µM: Micromolar
UFC: Unidades formadoras de colonias
V: Voltios
V/v: Volumen en volumen
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranosido

Capítulo 1: Introducción

1.1 Características del género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* descrito por Migula en 1894, perteneciente a la subclase gamma Proteobacterias, se caracteriza por agrupar bacilos curvos Gram negativos, móviles por múltiples flagelos o por un único flagelo polar. Son aerobios estrictos y su ADN presenta un porcentaje alto (58-71%) de G+C. Una característica sobresaliente, en la mayoría de estas bacterias, es la producción de pigmentos fluorescentes al crecer en medios deficientes de hierro. Además, este género presenta una gran versatilidad nutricional y su distribución en la naturaleza es amplia, encontrándose principalmente en hábitats terrestres y acuáticos, en asociación con animales y plantas.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son objeto de diversos estudios, varios de ellos han arrojado resultados que desencadenaron cambios en la nomenclatura del grupo taxonómico durante la última década. Por ejemplo, en sus comienzos se estableció al género en base a características morfológicas y metabólicas, y en la 8ª edición de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology se agruparon conjuntamente alrededor de 29 especies bien caracterizadas con otras 235 menos estudiadas. Posteriormente, este último número se redujo a sólo 112 especies reconocidas en el citado Manual. Así, muchos de los organismos originalmente descritos como especies del género *Pseudomonas* han sido clasificados dentro de otros grupos [Moore *et al.*, 1996]. Por otro lado, la aplicación de la metodología molecular ha permitido el reconocimiento de la heterogeneidad entre los organismos y ha sido la responsable de las sucesivas reorganizaciones taxonómicas.

Las *Pseudomonas* fitopatógenas comenzaron a ser estudiadas en 1966 y posteriormente, en 1967 se estableció el esquema LOPAT, el cual incluye técnicas microbiológicas muy utilizadas para la identificación práctica de estos microorganismos, al menos durante sus inicios y hasta fechas relativamente recientes [Palleroni, 1993]. Sin embargo, en la actualidad la aplicación de este esquema ha disminuido y se ha comenzado a emplear técnicas de biología molecular.

En la actualidad las secuencias del gen *rRNA 16S* han sido muy utilizadas para determinar relaciones procarióticas en todos los niveles taxonómicos [Naum *et al.*, 2008], siendo la molécula que más impacto ha causado en la identificación y clasificación de estas especies dentro del género *Pseudomonas* [Palleroni, 2003]. El rRNA ha sido ampliamente estudiado, y se estableció la distancia promedio de los genes estructurales del ribosoma entre especies bacterianas, el número de copias, el tamaño del operón ribosomal, la secuencia del mismo y las estructuras secundarias de sus genes. Los genes pertenecientes a dicho operón están ordenados de la siguiente manera: 16S rRNA- 23S rRNA- 5S rRNA, siendo el gen rRNA16S el más conservado de los tres, y por lo tanto es el más utilizado para la clasificación e identificación de especies bacterianas [Bouchet *et al.*, 2008]. La aplicación de estas técnicas de biología molecular ha dado lugar al reporte de nuevas especies fitopatógenas y a la reubicación de otras. Algunas de estas nuevas especies carecen de una caracterización LOPAT descrita [Castro-Masegosa, 2012].

1.2 Características de *Pseudomonas syringae*

Las bacterias de la especie *P. syringae* presentan colonias de una morfología circular con una elevación convexa, y por presentar actividad oxidasa y arginina dihidrolasa negativa se diferencian de otras *Pseudomonas* fluorescentes.

Esta especie está conformada por bacterias fitopatógenas que se hospedan en una amplia variedad de plantas incluyendo cultivos agrícolas, hortalizas, árboles frutales y plantas de jardín, causando enormes pérdidas económicas en la agricultura cuando las condiciones ambientales y nutricionales para su proliferación son óptimas. Dentro de esta especie, se encuentran variantes patogénicas o patovares (pv), clasificadas en base al hospedador del cual se aislaron. Éstas son muy similares en cuanto a la morfología de las colonias, su comportamiento fisiológico, bioquímico, serológico, y características moleculares [Stefanova, 2008].

Al menos, existen 50 pv aislados a partir de 180 variedades de plantas que presentaban una amplia gama de enfermedades con síntomas diversos, tales como lesiones en las hojas o

los frutos, canchros, clorosis, necrosis y agallas [Uchytel y Durbin, 1980; Bender *et al.*, 1999], causados en parte, por las toxinas que estos microorganismos producen [Arrebola *et al.*, 2011].

1.3 Interacción planta-patógeno

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos y en condiciones naturales interactúan, además, con un gran número de microorganismos potencialmente patógenos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a varios mecanismos de defensa.

La primera barrera que los patógenos deben enfrentar, es inespecífica y se trata de una barrera física (cutícula, pared celular, etc), cuando logran sobrepasarla, la planta activa un segundo sistema de defensa luego de reconocer al patógeno, y se desencadena una respuesta inespecífica. Las paredes de las células vegetales se engrosan, mediante la deposición de calosa y lignina, y se enciende rápidamente la expresión de ciertos genes de la planta. Por otro lado, algunos patógenos son capaces de sintetizar e introducir en el interior de las células moléculas efectoras, proteínas Avr (avirulentas), que tienen como objetivo final el de suprimir la respuesta inespecífica [Boller y Felix, 2009].

Cuando las moléculas Avr son reconocidas por receptores citoplasmáticos de las células vegetales (proteínas R) se desencadena una respuesta específica que induce una muerte celular programada en el lugar donde entró en contacto el patógeno, dejándolo confinado a ese sector de la planta [Jones y Dangl, 2006]. Este tipo de respuesta se conoce como reacción de hipersensibilidad (RH). Por otro lado, si la célula vegetal no posee la proteína R específica, capaz de reconocer el factor Avr, esta reacción no ocurre y la bacteria se propaga por el hospedero causando enfermedad [Katagiri y Tsuda, 2010].

P. syringae infecta principalmente partes aéreas tales como hojas y frutos permaneciendo la infección localizada, ya que las lesiones se encuentran a pocos milímetros del sitio inicial de entrada del microorganismo. En un ciclo de enfermedad exitoso, las cepas de *P. syringae* presentan dos estilos de vida interconectados espacial y temporalmente: en el primero, la bacteria es epifítica, ya que reside en la superficie de las hojas o en otras partes aéreas de la planta sana y luego, en la fase endofítica se establece en el espacio apoplástico al

penetrar a través de aberturas estomáticas o lesiones en la superficie de la hoja. Bajo condiciones ambientales favorables (como, alta humedad y temperatura moderada), *P. syringae* puede multiplicarse muy agresivamente en una planta huésped susceptible.

Por lo tanto, la patogénesis en la planta huésped es un proceso de múltiples etapas resumido como: (1) establecimiento en la superficie y posterior entrada en el tejido vegetal; (2) superación de los mecanismos de resistencia del huésped y (3) producción de síntomas, usando estrategias y moléculas invasivas específicas.

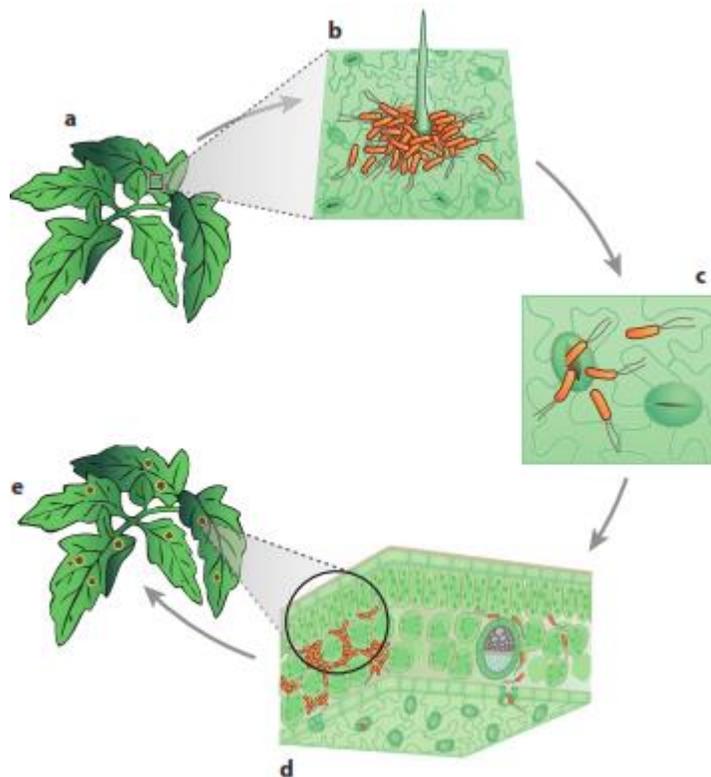


Figura 1: Diagrama del ciclo de infección de *Pseudomonas syringae*. A) Bacterias en la superficie de la hoja; B) agregación de bacterias cerca de un tricoma. C) Las bacterias penetran a través estomas abiertos. D) Sección transversal de una hoja que muestra bacterias que colonizan y se multiplican en el apoplasto de la planta. E) Aparición de necrosis y clorosis asociadas a la enfermedad. *Esquema extraído de Xin y He, [2013].*

1.4 Factores de virulencia

Las cepas pertenecientes a la especie *P. syringae* están adaptadas para el crecimiento y la supervivencia en la superficie e interior de las hojas. En el proceso de infección, existen factores que son responsables de la patogénesis y la virulencia de los fitopatógenos; estos incluyen apéndices que favorecen la movilidad, síntesis de compuestos tensoactivos, secreción de metabolitos secundarios tales como fitotoxinas, hormonas, enzimas proteolíticas, exopolisacáridos, actividad de nucleación de hielo, proteínas de superficie que median la adhesión, y el sistema de secreción tipo III (T3SS) el cual está codificado por los genes *hrp* que son necesarios para que las cepas de *P. syringae* generen una respuesta hipersensible (RH) en los no huéspedes o sean patógenas en sus huéspedes. Además, las condiciones en las que se encuentra la bacteria durante el proceso de infección influye considerablemente en la expresión génica relacionada a los factores de patogenicidad [Schenk *et al.*, 2006; Danhorn y Fuqua, 2007].

Mediante estudios de transcriptoma se ha estudiado la expresión génica en la cepa *P. syringae* pv. *syringae* B728a en las superficies foliares y en apoplasto, dos hábitats distintos que puede ofrecer el huésped [Yu *et al.*, 2013]. Los perfiles de transcripción allí observados permitieron proponer un modelo donde se indica la expresión de diferentes genes necesarios para dicha adaptación (Figura 2). Estos hallazgos proporcionan una buena comprensión de los hábitats foliares encontrados por las bacterias. Cabe destacar que la limitación de nitrógeno afectó la expresión de la mayoría de genes en la cepa B728a y por lo tanto, impulsó un gran cambio metabólico, dado por la ausencia de crecimiento durante esta condición nutricional [Yu *et al.*, 2013].

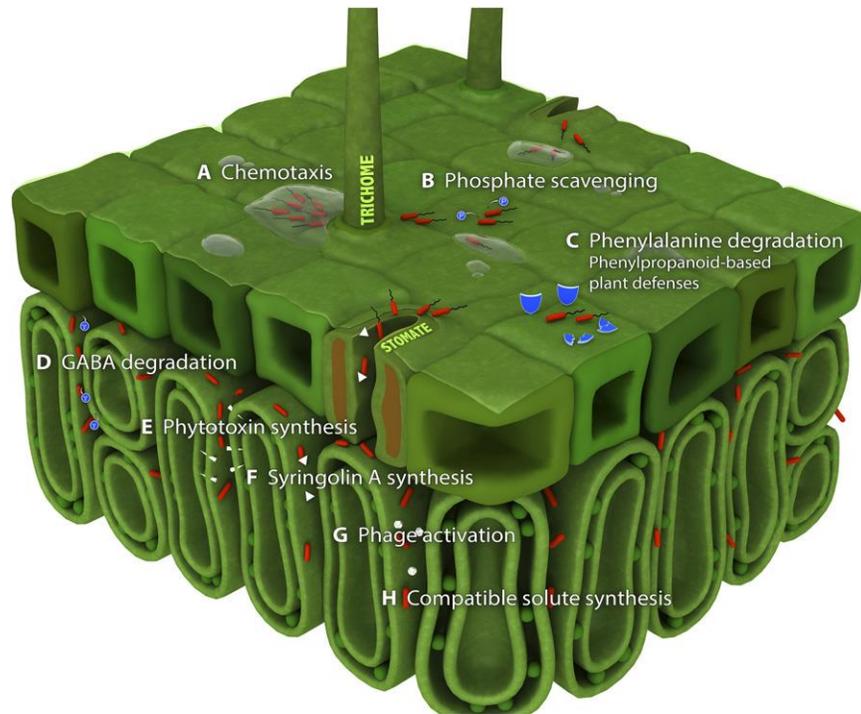


Figura 2: Modelo de sección transversal de la hoja que representa las actividades de *P. syringae* pv. *syringae* B728a en la superficie e interior de una hoja. Modelo basado en el perfil transcripcional de la cepa B728a en las superficies foliares. (A) quimiotaxis para localizar y moverse hacia los nutrientes, y particularmente activas en: (B) la eliminación de fosfatos; (C) degradación de fenilalanina; (D) degradación del ácido γ -aminobutírico (GABA); (E) síntesis de fitotoxinas y otros metabolitos secundarios; (F) producción de siringolina A; (G) activación de los genes del fago críptico; (H) síntesis de soluto compatibles. *Referencias:* Los objetos azules: productos vegetales; blancos: sustancias producidas por las bacterias; barras rojas: representan a las bacterias. *Esquema extraído de Yu et al., [2013].*

Durante los procesos de colonización bacteriana, los microorganismos utilizan diversos tipos de movilidad. Esta capacidad de migración es un proceso que puede afectar las interacciones patógenos-huésped en animales y vegetales.

Los tipos de movilidad mediada por flagelos (*swarming* y *swimming*) son comúnmente estudiados en bacterias fitopatógenas, ya que cumple una función importante durante la colonización e infección de las plantas.

El *swarming*, movimiento multicelular de bacterias sobre una superficie sólida, ha sido detectado principalmente en la superficie de las láminas foliares. Mientras que, el *swimming*,

movimiento individual de las bacterias en medio líquido, en los espacios intercelulares del tejido vegetal [Yu *et al.*, 2013].

La mayoría de los miembros fitopatógenos del grupo de *P. syringae* producen un tipo característico de fitotoxinas de naturaleza y estructura muy variables, como así también los síntomas de la enfermedad que generan. Hasta el momento se han descrito diferentes tipos de toxinas químicamente conocidas: coronatina, siringomicina, siringopeptina, mangotoxina, tabtoxina y faseolotoxina, entre otras (Tabla 1) [Kahlon, 2016]. Estas toxinas son intensamente estudiadas en *P. syringae* y contribuyen de manera significativa a la bacteriosis en las plantas [Beattie y Lindow, 1999; Arrebola *et al.*, 2011].

Tabla 1: Fitotoxinas producidas por diferentes especies y patovares de *Pseudomonas*. *Extraído de* Kahlon RS, [2016].

Fitotoxina	Estructura Química	Bacteria productora
Coronatina	Policétidos	<i>P. s. pvs. atropurpurea, glycinea, maculicola, morsprunorum, tomato</i>
Corpeptina	Lipodepsipeptido	<i>P. corrugata</i>
Fuscopeptina	Lipodepsipeptido	<i>P. fuscovaginae</i>
Siringopeptinas	Lipodepsipeptido	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Tolasina	Lipodepsipeptido	<i>P. tolaasii</i>
Viscosina	Lipodepsipeptido	<i>P. marginalis</i>
Siringomicina	Lipodepsinonapeptido	<i>P. s. pvs. syringae, aptata, atrofaciens</i> <i>P. fuscovaginae</i>
Tabtoxina	β -lactámico	<i>P. s. pvs. tabaci, coronafaciens, garcae</i>
Rizobitoxina	Vinilglicina	<i>P. andropogonis</i>
Persicomicina	Ácido graso	<i>P. s. pv. persicae</i>
Faseolotoxina	Peptido-sulfodiaminofosfinil	<i>P. s. pv. actinidiae, phaseolicola</i>

Dentro de las toxinas mencionadas, siringomicina (Tabla 1) es un lipopéptido, más precisamente son lipodepsinonapéptidos, ya que forman parte de un conjunto de compuestos que varían en el residuo acil graso que puede ser de longitud variable entre C5-C16 y cadenas de 7-25 aminoácidos, de los cuales 4-14 forman un anillo de lactona [Grgurine *et al.*, 2002]. Esta fitotoxina afecta el transporte de los iones a través de la membrana de las células eucariotas, alterando la liberación de metabolitos. Siringomicina también actúa como un poderoso surfactante, facilitando la movilidad de la bacteria sobre la cutícula de la hoja [Hutchison y Gross, 1997]. Otro ejemplo es tabtoxina, cuya síntesis comienza a partir de un precursor inactivo, el cual es un dipéptido formado por un derivado β -lactámico de metionina unido mediante enlace peptídico a un residuo de treonina [Kinscherf *et al.*, 2005]. La activación está dada por peptidasas presentes en el periplásmo bacteriano cuya función es catalizar la hidrólisis del enlace peptídico y así liberar la toxina activa (Figura 3). El mecanismo de acción de tabtoxina consiste en la inhibición irreversible de la enzima glutamina sintasa, requerida para la síntesis de aminoácidos e indispensable para la detoxificación del amonio en la célula vegetal, siendo este el único medio por el cual sucede la eliminación eficiente del amonio [Thomas *et al.*, 1983]. La acumulación de este compuesto en los tejidos vegetales provoca la disrupción de las membranas tilacoides de los cloroplastos y el desacople de la fotofosforilación, provocando el síntoma de clorosis en las hojas.

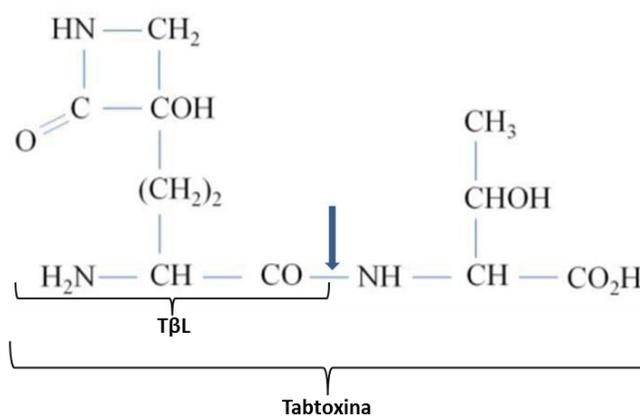


Figura 3: Activación de tabtoxina. La flecha indica el sitio de hidrólisis, donde actúa una peptidasa y se activa la tabtoxina. *Extraído de Kinscherf et al.*, [2005].

1.5 Colina: un compuesto ubicuo en la naturaleza

Colina es un compuesto de amonio cuaternario ubicuo en la naturaleza, se encuentra en el suelo rizosférico, como tal o como fosforilcolina [Smith *et al.*, 1988] y, en los tejidos de organismos eucariotas superiores como tal o formando parte de compuestos más complejos como los fosfolípidos. La primera evidencia de que *P. aeruginosa* es capaz de metabolizar colina y emplearla como nutriente fue publicada por Stainer *et al.*, [1966]. Luego, en nuestro laboratorio se demostró que *P. aeruginosa* es capaz de utilizar colina o sus productos de degradación, tales como, glicina-betaína (GB), dimetilglicina (DMG), sarcosina [Lisa *et al.*, 1983; 1984] o carnitina, [Lucchesi *et al.*, 1995] como única fuente de carbono (C), nitrógeno (N) y energía. Colina, además, puede ser utilizada como un potente osmoprotector, debido a su conversión al soluto compatible GB [Sage *et al.*, 1997; Diab *et al.*, 2006].

Por otro lado, se ha descrito que *P. aeruginosa*, en condiciones iso- e hiperosmolares de cultivo, puede utilizar colina como nutriente, y en respuesta inducir diferentes proteínas, entre ellas fosforilcolina fosfatasa (PchP), fosfolipasa C (PlcH) y acetilcolinesterasa (AchE) [Lisa *et al.*, 1983; Lucchesi *et al.*, 1989; Garrido *et al.*, 1990; Lisa *et al.*, 1994; 2007; Sánchez *et al.*, 2012]. Todas estas proteínas contribuyen para que el microorganismo colonice y persista en el hospedador [Lisa *et al.*, 2007; Domenech *et al.*, 2011].

Análisis bioinformáticos y bioquímicos predicen que la gran mayoría de las bacterias, secuenciadas en la actualidad, presentes en el suelo y en agua, poseen una o más vías metabólicas para convertir colina en glicina-betaína (GB) [Wargo *et al.*, 2013].

Este compuesto de amonio cuaternario presente en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales proviene de la hidrólisis del fosfolípido fosfatidilcolina catalizada por fosfolipasas (PLD) de las plantas (Figura 4) [Chen *et al.*, 2013]. Si bien, colina libre se encuentra distribuida en los tejidos vegetales, su disponibilidad para los microorganismos asociados a plantas es desconocida. Sin embargo, para bacterias tales como *P. syringae* disponer de este compuesto podría proporcionar beneficios para el crecimiento y protección contra el estrés, y por lo tanto proporciona una ventaja selectiva para esta especie que está adaptada para crecer en presencia de colina (Figura 4) [Chen *et al.*, 2013].

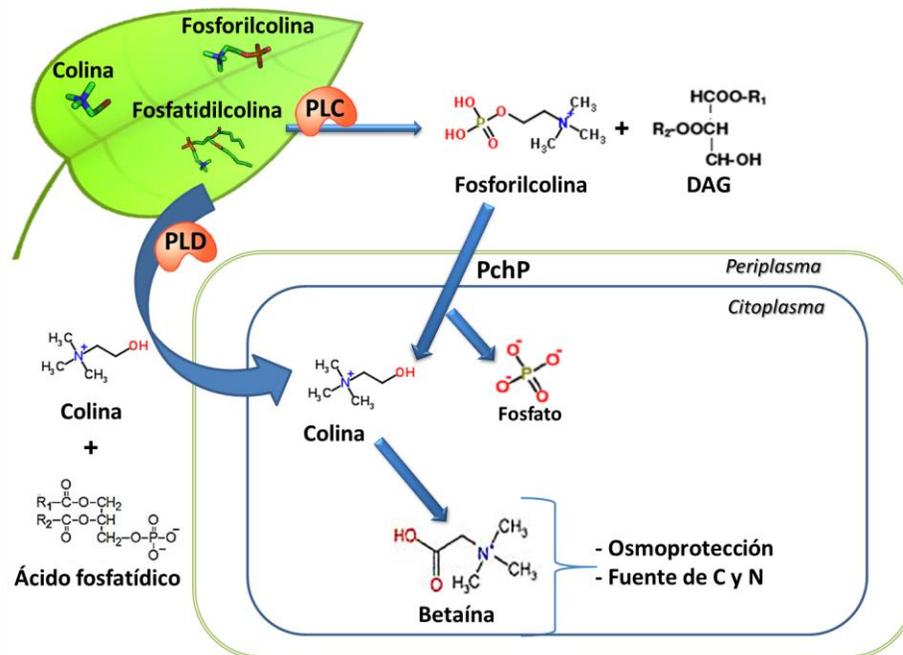


Figura 4: Presencia de colina en el tejido vegetal; incorporación y degradación por *P. syringae*. En los tejidos vegetales, como hojas, se determinó la presencia de colina libre en concentraciones desde 84 nmol/gr peso fresco, hasta 1500nmol/gr peso fresco, y formando parte de moléculas como fosfatidilcolina y acetilcolina (en concentraciones desde 0,14 nmol/gr peso fresco hasta 53 nmol/gr peso fresco) [Miura y Shih, 1984]. Valores variables dependiendo de la planta analizada. Fosfolipasas presentes en la planta (PLD y PLC) catalizan la hidrólisis de fosfatidilcolina, a su vez PchP presente en el periplasma bacteriano cataliza la hidrólisis de fosforilcolina liberando colina y fosfato.

Además, se ha demostrado que el catabolismo de GB es relevante para la biología de *P. syringae* durante la interacción con las plantas, contribuyendo al establecimiento poblacional en el hospedador [Li *et al.*, 2013]. Así por ejemplo, observaciones de análisis transcriptómicos han revelado que la cepa *P. syringae* pv. *syringae* B728a expresa genes relacionados al catabolismo de GB cuando interactúa con su planta hospedadora [Yu *et al.*, 2013]. Por otro lado, en Li *et al.*, [2013], plantearon como hipótesis que el catabolismo bacteriano de GB en hojas sustituye la síntesis de otros solutos compatibles tales como trehalosa y N-acetil-glutaminilglutamina amida (NAGGA), aunque no se excluye la posibilidad de que GB también proporcione un beneficio nutricional y energético para estas bacterias durante su establecimiento en el hospedador.

En *P. syringae* se demostró que el osmoprotector más eficiente es GB, obtenido a partir de colina, siendo los transportadores OpuC y BetT [Chen y Beattie, 2007; 2008] los responsables de la internalización de GB. Posteriormente, se describió un sistema de transporte, tipo ABC, menos específico que incorpora colina, GB y carnitina (Cbc). Estos transportadores son fundamentales para que una vez ingresados estos sustratos sean utilizados como fuentes de carbono y/o nitrógeno, en condiciones hiper-osmolares de crecimiento [Chen *et al.*, 2009]. Recientemente, se ha descrito en *Bacillus subtilis* que colina actúa como un inductor de la expresión génica controlada por el regulador transcripcional GbdR [Nau-Wagner *et al.*, 2012]. Además, se ha observado en *Trichoderma reesei* QM9414 que éste compuesto de amonio cuaternario activa considerablemente la síntesis de diferentes proteínas extracelulares y su presencia en el medio de cultivo induce un cambio en la composición fosfolipídica de la membrana bacteriana [Schreiber *et al.*, 1986].

1.6 *P. syringae*, microorganismo patógeno y su relación con los cultivos de importancia económica en nuestro país

P. syringae, es una especie patogénica que afecta a una gran variedad de plantas, y la mayoría de las cepas son específicas con el tipo de planta hospedadora. Sin embargo, algunas cepas pueden colonizar más de un tipo de planta. Por ejemplo, *P. syringae* pv. *coronafaciens* y *P. syringae* pv. *atrofaciens* colonizan solamente avena y trigo, respectivamente; por otro lado, ha sido descrito que *P. syringae* pv. *tabaci* produce patogénesis cruzada, es decir que es patógeno para diferentes tipos de cultivos, incluyendo plantas silvestres, por lo que aumenta la posibilidad de la perdurabilidad y propagación de estas bacterias en cultivos económicamente importantes [Álvarez *et al.*, 2006].

En nuestro país, se encuentran una gran variedad de pvs. que tienen como hospedadores a diferentes tipos de cultivos de gran importancia económica tales como avena, centeno, cebada, soja, maíz, trigo y sorgo, entre otros.

El cultivo de soja (*Glycine max* L Merr) en Argentina ocupa el primer lugar en superficie sembrada. El monocultivo de soja, junto a la siembra directa genera excelentes condiciones para la multiplicación y supervivencia de patógenos causantes de enfermedades de fin de ciclo (EFC). A nivel mundial, las pérdidas en el rendimiento causadas por las

enfermedades en el cultivo de soja oscilan entre un 10 y un 15%. En Argentina, dichas pérdidas son de aproximadamente del 8-10% de la producción total. Entre las principales EFC se encuentran el tizón bacteriano causado por *P. syringae* pv. *glycinea*, actualmente denominada *P. savastanoi* pv. *glycinea* [INTA, Informe Fitopatológico N° 11, 2013]. Esta enfermedad se caracteriza por atacar todos los órganos verdes de la planta pero principalmente las hojas. Los síntomas característicos que permiten diferenciar este tipo de bacteriosis son: i) zonas necróticas de forma angulosa rodeadas por un halo clorótico; ii) zonas brillantes por el exudado bacteriano (zooglea) en el envés de la hoja y sin generación de protuberancias en la superficie foliar. Las poblaciones bacterianas presentes sobre la superficie de las hojas o semillas de los hospedantes, constituyen el inóculo primario. El desarrollo de la enfermedad está determinado por las condiciones ambientales, especialmente una elevada humedad [SINAVIMO, 2010].

Dentro de la producción hortícola de nuestro país, el cultivo de tomate, después de la papa, es el cultivo de mayor importancia, con una superficie cultivada de 22.000 ha y una producción de 750.000 tn anuales. Argentina, después de Brasil, es el segundo país productor de tomate en América del Sur [Bima *et al.*, 2014]. Este cultivo es afectado por enfermedades producidas por diferentes tipos de microorganismos. La peca bacteriana, cuyo agente causal es *P. syringae* es una enfermedad muy importante en el cultivo de tomate, causando graves pérdidas en el rendimiento y en la calidad de los frutos. La sintomatología se manifiesta en las hojas a través de manchas acuosas, angulosas rodeadas de un halo amarillento. Las hojas atacadas se tornan amarillas y posteriormente caen.

Dentro de las bacteriosis más frecuentes de la provincia de Córdoba, se encuentra el tizón bacteriano (*P. syringae*) y la pústula bacteriana (*Xanthomonas campestris*). Estas bacteriosis generan un descenso en el rendimiento de las plantas por la disminución del área fotosintética, senescencia foliar anticipada, destrucción de tejidos y reducción de la turgencia y defoliación. Durante la campaña 2012-2013 en el sudeste de la Provincia de Córdoba, se registró la presencia de tizón bacteriano con incidencia del 100% y con una severidad de hasta un 20% desde los primeros estadios vegetativos y durante casi todo el ciclo del cultivo (<http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13>).

1.7 Características de la cepa S5 aislada de hojas de avena

En nuestro laboratorio se aisló una cepa bacteriana, denominada “S5”, a partir de hojas de avena con típica sintomatología de infección bacteriana. Las plantas de avena provenían de la zona agrícola cercana a la localidad de Suco (33°26'16"S y 64°49'54"W), provincia de Córdoba. Mediante diferentes pruebas metabólicas esta cepa fue caracterizada dentro del género *Pseudomonas* [Defacci, 2003]. En la Figura 5 se observa el crecimiento típico de esta cepa bacteriana luego de 48 hs de incubación a 30°C en medio King B/agar. Las colonias presentan una morfología circular, elevación convexa, mucosas, blancas a las 24 hs de crecimiento, siendo la difusión al medio de un pigmento marrón la característica más sobresaliente de esta cepa, luego de 48 hs de crecimiento.



Figura 5: Placa de *Pseudomonas S5*, cepa aislada de hojas de avena con sintomatología típica de bacteriosis.

Capítulo 2: Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo:

La capacidad de *P. syringae* para utilizar colina genera ventajas durante el proceso de colonización en las plantas hospedadoras, aumentando la producción de factores de virulencia.

2.2 Objetivo General:

El objetivo General de este Plan de Trabajo está orientado a conocer la relación que existe entre una bacteria fitopatógena (*Pseudomonas syringae*), la producción de factores patogénicos, y colina, un compuesto ubicuo en la naturaleza.

2.3 Objetivos específicos:

- Caracterizar fisiológica y fenotípicamente la cepa de *Pseudomonas* S5 aislada de avena.
- Realizar un análisis filogenético, para determinar la posición y distancia filogenética de la cepa S5, dentro del género *Pseudomonas*.
- Determinar si la cepa S5 aislada de avena, infecta otras plantas de importancia agrícola de la región.
- Determinar la relación de colina con la producción de diferentes factores involucrados en la virulencia.

Capítulo 3: Materiales y Métodos

3.1 Medios de cultivos bacterianos:

.- Medio LB [Sambrook y Russell, 1989]

Tripteína 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; cloruro de sodio 5 g/l. pH: 7,4

.- King B

Proteasa peptona 20gr/l; glicerol 10ml; K_2HPO_4 1,5gr/l; $MgSO_4$ 1,5gr/l. pH: 7,0

.- Agar Nutritivo

Pluripeptona 5g/l; extracto de carne 3g/l; cloruro de sodio 8g/l. pH: 7,4

.- Papa dextrosa agar (PDA)

Infusión de papa 4g/l; dextrosa 20 g/l; agar-agar 15 g/l. pH 5,7

.- Medio mínimo AB [Chilton, 1974]

K_2HPO_4 3g/l; NaH_2PO_4 1g/l; NH_4Cl 1 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l; KCl 0,15 g/l; $CaCl_2$ 0,01 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,5 mg/l; manitol 0,2 g/l. pH: 6,4

.- Medio NYGA [Tang *et al.*, 1987]

Proteasa peptona 5 g/L; extracto de levadura 3 g/L; glicerol 20ml/l; agar-agar 15gr/l. pH: 7,0

.- Medio mineral mínimo (MET) [Dehbi, 2001]

H_2NaPO_4 6,52mM; HK_2PO_4 4,6 mM; $FeSO_4$ 0,13mM; $CaCl_2$ 0,9mM; $MgSO_4$ 0,8mM; $ClNH_4$ 20mM; Sacarosa 20mM. pH 6,5

.-Medio mineral mínimo con alta concentración de Pi (HPi-BSM) (Lisa *et al.*, 1994)

$NaCl$ 8,5 mM; Na_2HPO_4 17 mM; KH_2O_4 22 mM; $MgSO_4$ 0,8 mM; $ClNH_4$ 20mM; Sacarosa 20mM. pH: 7,4

.- Medio para la producción de biosurfactantes

Se utilizó el MET suplementado con glicerol al 3% (V/V), pH 6,5 [Giraldo, 2012]:

.- Medio CTAB/MB agar

Se utilizó el medio de producción de biosurfactantes suplementado con 0.005 g/L de azul de metileno (MB) y 0.2 g/L de cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB).

- ✓ La esterilización se realizó en autoclave a 120°C por 20 minutos.
- ✓ Para solidificar los medios se agregó 15g/l de agar-agar.
- ✓ Las fuentes de carbono y de nitrógeno, fueron esterilizadas por separado y se agregaron a una concentración final de 20 mM o a la indicada en cada ensayo. Siendo sacarosa y CINH_4 , las fuentes de carbono y de nitrógeno preferenciales para la especie de *P. syringae*. En caso de utilizar otra fuente de nitrógeno o carbono, se especificará en cada experimento.

3.2 Medio para el crecimiento de plantas

.- Medio Hoagland

CaCl_2 10mM; KCl 10mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004 mM; MgSO_4 4mM; KH_2PO_4 2mM; FeCl_3 0,06mM. Solución de micronutrientes (1.24 g H_3BO_3 , 1.81 g MnCl_2 , 0.11 g ZnCl_2 ; 0.05 g CuSO_4 ; 0.025 g NaMoO_4 , en 1000 ml H_2O), se utiliza 2 ml/l de esta solución.

3.3 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en las tablas 1 y 2.

Tabla 2: Cepas bacterianas y fúngicas, utilizadas

Cepa bacteriana	Características relevantes	Origen o Referencia
S5	Silvestre, aislada de <i>Avena sativa</i> (Avena). Tabtoxina ⁺	Gallarato <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61	Silvestre, aislada de <i>Triticuma estivum</i> (Trigo) siringomicina ⁺	Huang <i>et al.</i> , 1988
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Silvestre, aislada de <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate) Coronatina ⁺	Cedida gentilmente por la Dra. ME Álvarez, UNC ^a
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Silvestre, agente causal de la mancha marrón del frijol. Siringomicina ⁺	Cedida gentilmente por la Dra. ME Álvarez, UNC ^a
<i>P. syringae</i> A5	Silvestre, aislada de <i>Glycine max</i> (Soja)	Cedida gentilmente por la Dra. MM Oliva, UNRC
<i>P. syringae</i> C13	Silvestre, aislada de <i>Glycine max</i> (Soja)	Cedida gentilmente por la Dra. MM Oliva, UNRC
<i>P. syringae</i> Q	Silvestre, aislada de <i>Glycine max</i> (Soja)	Cedida gentilmente por la Dra. MM Oliva, UNRC
<i>P. syringae</i> VT2	Silvestre, aislada de <i>Glycine max</i> (Soja)	Cedida gentilmente por la Dra. MM Oliva, UNRC
<i>P. syringae</i> LS3	Silvestre, aislada de <i>Glycine max</i> (Soja)	Cedida gentilmente por la Dra. MM Oliva, UNRC
<i>P. protegens</i> Pf-5	Silvestre	Dr. Schweizer, CSU ^c
<i>P. aeruginosa</i> PAOI	Silvestre	Jacobs, <i>et al.</i> 2003
<i>P. aeruginosa</i> PAOI Δ algR	Mutante delecional en el gen <i>algR</i>	Okkotsu <i>et al.</i> , 2013
<i>Geotrichum candidum</i>	Silvestre	Cedida gentilmente por la Dra. ML Ramírez, UNRC ^b
<i>Escherichia coli</i> E1	Aislado clínico	Cedida gentilmente por la Dra. L Barberis, UNRC ^b

a- Universidad Nacional de Córdoba, b- Universidad Nacional de Río Cuarto, c- Universidad del Estado de Colorado.

Tabla 3: Plásmidos

Plásmidos	Característica	Referencia
pUC18T-mini-Tn7T-Gm-gfpmut3a	Gm ^r en mini-Tn7T; movilizable para el marcado de bacterias con GFP	Choi y Schweizer, 2006

Tabla 4: Oligonucleótidos

Primer	Característica	Referencia
BOX1AR	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
SAF-F	5'-CCATCACGCAACAACCCCTC-3'	Vaseghi <i>et al.</i> , 2013
SAF-R	5'-GAAGATCAATGGGTCTGGCT-3'	Vaseghi <i>et al.</i> , 2013
<i>syrB1</i>	5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'	Sorensen <i>et al.</i> , 1997
<i>syrB2</i>	5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3'	Sorensen <i>et al.</i> , 1997
<i>syrD1</i>	5'-AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG-3'	Sorensen <i>et al.</i> , 1997
<i>syrD2</i>	5'-GGCAATACCGAACAGGAACAC-3'	Sorensen <i>et al.</i> , 1997

3.4 Pruebas LOPAT para la identificación de *P. syringae*

El esquema LOPAT [Lelliot *et al.*, 1966] se aplicó a cepas que presentaron fluorescencia positiva bajo luz ultravioleta (350 nm) después de ser cultivadas en medio KB durante 48 hs a 30 °C.

- **Producción de Levano:** las cepas se inocularon en agar nutritivo suplementado con sacarosa (5 % P/V). Se consideró resultado positivo la aparición de colonias abombadas después de 72 hs de incubación.
- **Presencia de citocromo C oxidasa:** se detectó utilizando discos que contienen el reactivo oxalato de dimetil-*p*-fenilendiamina, el cual es el sustrato de la enzima oxidasa. El disco se sumergió en suspensión bacteriana densa en 0,2 ml de agua destilada estéril. Se consideró como resultado positivo para la presencia de la enzima cuando se detectó un color fucsia-rosado en un tiempo menor a 30 segundos.
- **Pectinólisis en papa:** se observó a las 48-72 hs luego de inocular la cepa en rodajas de papas, previamente desinfectadas.

- **Producción de arginina dihidrolasa:** para estudiar la degradación de arginina se siguió el método descrito en [Thornley, 1960]. El medio de Thornley contiene L-Arginina y rojo fenol como indicador, las bacterias se inoculan en profundidad y se cultivan en condiciones anaeróbicas. La presencia de arginina dihidrolasa se evidencia por un viraje del indicador, ocasionado por la producción de amonio a partir del aminoácido. Evaluando como positivo el viraje en anaerobiosis a un color rosa más fuerte que el testigo en un período comprendido entre 2 a 10 días.
- **Respuesta de hipersensibilidad (RH) en plantas de tabaco:** El proceso de infección se realizó en plantas de tabaco con 45 días de crecimiento en cámaras de cultivo a 24°C, humedad ambiental del 50% y con un fotoperiodo de 16/8 hs (luz/oscuridad). La inoculación (10µl de solución bacteriana, 1×10^8 UFC) se realizó luego de generar tres lesiones mecánicas con aguja hipodérmica estéril. Como control negativo se inocularon 10µl de solución de $MgCl_2$ 10mM. Las plantas se mantuvieron en el laboratorio a 25°C con iluminación adicional. Para cada tratamiento se llevaron a cabo 3 repeticiones independientes. La presencia de signos característicos de la RH se analizaron luego de transcurridas 24 hs posterior a la infección [Kvitko, 2007].

3.5 Secuenciación del gen *ARNr 16S* de la cepa S5

Un cultivo fresco de la cepa S5 fue enviado a Macrogen Inc., Corea, para obtener la secuencia del gen *ARNr 16S*, utilizando los siguientes *primers* universales descritos en [Lane, 1991]: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3').

3.5.1 Análisis de la secuencias del gen *ARNr 16S*

Las secuencias de nucleótidos del gen *ARNr 16S* de cepas de referencia de diferentes géneros y especies se obtuvieron de la base de datos GenBank [NCBI; National Center for

Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank] y se utilizaron para fines comparativos según lo descrito en [Anzai, 2000]. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software BLAST [NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] [Altschul, 1997] a fin de realizar alineamientos y determinar los porcentajes de identidades.

Los alineamientos múltiples de las secuencias del gen *ARNr 16S* se realizaron empleando el programa ClustalW [Higgins, 1994]. Para el análisis filogenético de las secuencias alineadas se utilizó el software MEGA versión 4 [Tamura, 2007] y para la construcción del árbol filogenético el algoritmo de Neighbor Joining [Saitou y Nei, 1987] de acuerdo al modelo de 2-parámetros descritos en [Kimura, 1980]. La topología del árbol se analizó empleando el método estadístico “bootstrap” y los valores obtenidos se expresaron como el porcentaje relativo de 1000 replicaciones.

La secuencia de nucleótidos del gen *ARNr 16S* de la cepa nativa S5, aislada de hojas de avena, se publicaron en la base de datos *GenBank* siendo el número de acceso, KJ830937.

3.6 Medición de la formación de biofilms en microplacas.

La capacidad de formación de *biofilms* se determinó macroscópicamente de acuerdo a lo descrito *por* [O'Toole y Kolter, 1998] para *Pseudomonas*. Microplacas de 96 pocillos de PVC se inocularon con 150µl de un cultivo bacteriano (DO_{600nm} 0.1) crecido en el medio MET con el agregado de 20mM NH_4Cl y 5% (P/V) de sacarosa. Las placas fueron incubadas sin agitación a 30°C. Al realizar las mediciones, el contenido de cada pocillo se homogenizó y se determinó la absorbancia en un lector de MicroELISA a 600nm. Posteriormente, se removieron las células planctónicas de cada pocillo, se realizaron tres lavados con solución fisiológica y se incubó durante 15 min con 150µl de una solución de cristal violeta (CV) al 0.1% (P/V). Luego, se lavó cada pocillo tres veces con 200 µl de agua destilada y para determinar el biofilm formado se adicionó 150µl de etanol al 95% (V/V) con el fin de disolver el CV unido al biofilm. La absorbancia se determinó en un lector de Elisa a 570nm. El valor de la adhesión relativa (AR) se calculó por la siguiente fórmula: $AR = CV_{560nm} / DO_{620nm}$. Los resultados se expresaron como adhesión relativa al crecimiento bacteriano.

3.7 Caracterización de resistencia al cobre y antibióticos

Las cepas utilizadas para estos ensayos crecieron por 24 hs en medio KB a 30°C, con agitación de 150 rpm. Luego, el cultivo se diluyó en igual medio hasta alcanzar una DO_{600nm} de $\approx 0,1$, y se fraccionó en tubos con diferentes concentraciones de antibióticos o Cu_2SO_4 , según corresponda.

- Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones: tetraciclina 20 $\mu g/ml$ y 10 $\mu g/ml$; rifampicina 10 $\mu g/ml$ y 5 $\mu g/ml$; gentamicina 20 $\mu g/ml$ y 10 $\mu g/ml$; kanamicina 40 $\mu g/ml$ y 20 $\mu g/ml$; y ampicilina 200 $\mu g/ml$ y 100 $\mu g/ml$.
- El Cu_2SO_4 se utilizó a las siguientes concentraciones: 1mM; 1,5mM; 2mM; 2,5mM; 3mM; 3,5mM; 4mM; 4,5mM; 5mM; 5,5mM; 6mM; 6,5mM; 7mM; 7,5mM; 8mM; 8,5mM y 9mM. Debido a que las soluciones de Cu_2SO_4 presentan absorbancia a e 600nm, se utilizó como blanco de reacción soluciones del medio de cultivo con diferentes concentraciones de cobre ensayadas. Este valor se restó a los valores de crecimiento bacteriano obtenidas a las 24 hs y 48 hs.

3.8 Ensayos de movilidad bacteriana

-*Swimming*: para detectar este movimiento, se agregó a los diferentes medios de cultivos agar al 0,3%. Los medios que se utilizaron para este ensayo fueron: LB [Sambrook y Russell, 2001] diluido al 10% (V/V) con agua estéril (LB 10%) y medio mineral mínimo (MET) [Dehbi, 2001], modificado según Gallarato *et al.*, (2012), mediante el suplemento de sacarosa 20 mM como fuente de carbono y, colina o NH_4Cl , a igual concentración, como fuentes de nitrógeno. Una vez mezclado el medio a utilizar con el agar, se colocó (20 ml) en placas de Petri y se dejó evaporar el agua en campana de flujo laminar según lo descrito en [Déziell, 2001]. Las cepas, a estudiar, provienen de cultivos de 48 hs de crecimiento en medio LB sólido y se siembran por picadura con ansa de punta en el centro de la placa conteniendo los medios mencionados.

-*Swarming*: La preparación de las placas y los medios utilizados, fue similar a lo descrito en el ítem anterior, con la diferencia que la concentración de agar fue: 0,4% (P/V) y 0,5% (P/V). La

inoculación de las diferentes cepas de *P. syringae* se realizó mediante la deposición de 2,5µl del inóculo proveniente de cultivos de 48 hs en LB diluido al 10%, sobre la superficie del medio.

La cuantificación de ambos tipos de movilidad se realizó periódicamente mediante la medición del diámetro de la colonia durante, al menos, un periodo de 8 días.

3.9 Detección de toxinas

3.9.1 Detección de siringomicina

Una alícuota de 20 µl del cultivo a ensayar crecido durante 48 hs en LB líquido se inoculó en el centro de una placa de Petri con medio PDA, y se incubó a 30°C durante 5 días. Posteriormente, las placas se rociaron en forma homogénea utilizando un aspersor con una suspensión del hongo *Geotrichum candidum* y se incubaron a 30°C durante 24 hs. La zona de inhibición fue determinada desde el límite de la colonia bacteriana [Gross y De Vay, 1977]. Por cada cepa de *P. syringae* se realizaron cuatro repeticiones y como testigos se utilizaron dos placas de PDA rociados con la suspensión de *G. candidum* y sin suspensión bacteriana.

3.9.2 Detección de tabtoxina

La cepa S5 se hizo crecer a 30°C en medio mineral mínimo (MET) descrito por [Dehbi, 2001]. Cuando fue necesario se reemplazó la fuente de nitrógeno, NH₄Cl, por colina (20 mM). Luego de la incubación, el cultivo fue centrifugado a 12000 rpm y el sobrenadante fue filtrado mediante filtros millipore de 0,2 µm.

Para la determinación de tabtoxina se realizó un ensayo de difusión en agar [Hwang, 2005; Völksch y Weingart, 1998], donde la cepa reportera, *E. coli* E1 creció durante toda la noche (O/N) a 36°C en LB líquido, se centrifugó, se lavó el pellet con solución fisiológica y finalmente se diluyó hasta una DO_{600nm} de 0,3. Esta suspensión bacteriana se agregó en un medio mineral mínimo (HPi-BSM) con agar 0,7%, glucosa 20mM, NH₄Cl 20mM, fundido a 45°C. Luego de la solidificación del medio, se removieron discos de agar (5 mm) para crear pocillos donde se agregó 40 µl del sobrenadante filtrado del cultivo de S5 en MET. Para

revertir el efecto de tabtoxina, se agregó el aminoácido L-glutamina en una concentración final de 17 μ M [Kong, 2012]. Las placas fueron incubadas a 36°C durante 24 hs. Los valores de la actividad toxigénica (TA) de tabtoxina fueron calculados como la relación entre el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de *E. coli* E1 (en centímetros) con respecto a la DO_{600nm} del cultivo de *P. syringae* S5 de cuyo sobrenadante se obtiene la toxina.

3.10 Actividad Proteasa

La detección cualitativa de la actividad proteasa se realizó en el medio NYGA suplementado con 10% (v/v) de leche descremada estéril. En la superficie de las placas se depositaron discos de papel estéril impregnados con 1,5 μ L de inóculo de las diferentes cepas a ensayar: *P. syringae* S5, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *syringae* 61, luego se incubaron por 72 hs a 30°C. Los inóculos utilizados se hicieron crecer en medio KB líquido a 30°C, 150 rpm, durante 48 hs.

3.11 Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína soluble

Una alícuota de 100 μ l de los sobrenadantes de los cultivos a estudiar se incubaron con 100 μ l de azocaseína (5 mg/ml) en Tris-HCl 100 mM, pH 8, 1hs a 30°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 400 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en frío (4°C). La mezcla se centrifugó (5 min a 13.000 rpm), y sobrenadante (\approx 600 μ l) conteniendo TCA se transfirió a 700 μ l de NaOH 525 mM y se enfrió en hielo durante 30 minutos. Luego, se determinó la densidad óptica a 442 nm. Para este método se realizó, previamente, una curva de calibración con un estándar de proteinasa K [1 μ g/ μ L] para las siguientes concentraciones de sustrato (azocaseína): 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.12, 0.25 (μ g/ μ L).

3.12 Ensayos de *quorum-sensing*

3.12.1 Detección de AHLs de cadena corta

Para la determinación de AHLs de cadena corta (C4-C8), se empleó el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 que produce violaceína, cuya síntesis es inducida por AHLs de cadena corta (C4-C8) [Mc Clean, 1997]. Para este ensayo se utilizaron placas de Petri con medio LB/agar distribuido en capas de diferentes concentraciones: 1,5 % (P/V), capa base y 0,6% (P/V), la capa superior. A esta última se le adicionó 50 μ l del cultivo de *C. violaceum* CV026 (crecido O/N en LB) cada 5 ml de medio. Luego de solidificado el medio, se realizaron pocillos de 6 mm, con sacabocado, en la capa superior. En estos orificios se sembraron los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas a ensayar. Las placas se incubaron durante toda la noche a 30°C. Se consideró producción de AHLs cadena corta positivo al visualizar la difusión del pigmento violaceína alrededor de la zona de inoculación.

3.12.2 Detección de AHLs de cadena larga

La cepa *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), induce actividad β -galactosidasa al detectar la presencia de AHLs de cadena larga (C6-C12). Para este ensayo se utilizaron placas de Petri con medio AB conteniendo 40 μ g/ml de X-Gal en agar soft donde la concentración de agar en la capa inferior fue al 1,5% (P/V) y en la capa superior al 0,7 % (P/V). A esta última capa se le adicionó 0,5 ml de cultivo de la cepa reportera *A. tumefaciens* crecido O/N en LB líquido por cada 3 ml de LB agar 0,7% (P/V) fundido a 45°C. Posteriormente se sembraron cepas a estudiar, por punción con un ansa, sobre la superficie de la placa. Las placas se incubaron durante 24-48 hs a 30 °C [Cha, 1998]. Se consideró resultado positivo (producción de AHLs cadena larga) cuando se visualizó coloración azul alrededor de la zona de inoculación, debido a la hidrólisis de X-gal adicionado al agar.

3.13 Técnicas de manipulación de ADN

3.13.1 Extracción de ADN genómico

Las preparaciones de ADN genómico QIAprep Mini-spin kit (Qiagen). Dicho kit fue utilizado según las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

3.13.2 Preparación de ADN plasmídico

Se utilizó la técnica de extracción alcalina de plásmido sin fenol [Sambrook y Russel, 2001].

3.13.3 Conjugación bacteriana

La cepa utilizada como huésped donador fue *E. coli* S17-1 λ pir, la cual fue previamente transformada con el plásmido pUC18T-mini-Tn7T-Gm-gfpmut3a [Sambrook y Russell, 2001]. La conjugación entre la cepa *P. syringae* S5 y *E. coli* S17- λ pir (pUC18T-mini-Tn7T-Gm-gfpmut3a) se realizó como se describe en [Choi y Schweizer, 2006]. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon acoplado a una cámara digital Nikon DS-Qi1Mc, dichas imágenes se procesaron con el Software NIS Elements.

3.14 Cultivo de plantas

Las plantas se mantuvieron en cámaras de cultivo a 25°C, humedad ambiental del 50%, con un fotoperiodo de 16/8 hs (luz/oscuridad), y fueron regadas periódicamente con medio de cultivo Hoagland.

Glycine max (soja): Las semillas se lavaron con agua destilada estéril (ADE), luego se desinfectaron con una solución de alcohol etílico 70% (V/V) por 10 minutos e hipoclorito de sodio al 4% (V/V) durante 7 minutos. Posteriormente, se lavaron diez veces con ADE. Las semillas se distribuyeron de a 2 por maceta con vermiculita estéril, y se colocaron en cámaras

especiales utilizadas para el crecimiento de plantas. Luego de la germinación se seleccionó solamente una plántula por maceta.

Nicotiana tabacum (tabaco): Las semillas se hicieron germinar en una cama húmeda y posteriormente se cultivaron en condiciones de invernadero durante 8 semanas.

Arachis hypogaea L. cv *Granoleico* (Maní): las semillas se desinfectaron cubriéndolas con alcohol etílico al 96% (V/V) durante 30 segundos y se lavaron dos veces con ADE. Luego, se adicionó peróxido de hidrógeno al 15% (V/V), agitando suavemente durante 7 minutos y se lavó diez veces con ADE.

Avena sativa cultivar Cristal INTA: las semillas se desinfectaron con una solución de alcohol etílico al 70% (V/V) durante 5 min y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 4% (V/V) durante 7 min. Luego, se realizaron cinco lavados con ADE y tres semillas se sembraron en macetas con vermiculita estéril, al germinar, sólo se dejó una plántula por maceta.

Lycopersicon esculentum Mill, cv *Platense* (Tomate): Las semillas se hicieron germinar en una cama húmeda y posteriormente se cultivaron en condiciones de invernadero durante 8 semanas.

3.15 Ensayos de infección en plantas

3.15.1 Solución bacteriana utilizada para realizar la infección en plantas

Las cepas utilizadas se hicieron crecer en placas de PDA durante 48 hs a 30°C. Posteriormente, con una colonia aislada se inocularon 10 ml de medio KB líquido que se incubó por 48 hs a 30°C. Posteriormente, las bacterias se cosecharon, se lavaron con solución fisiológica y por último el *pellet* fue suspendido con solución fisiológica hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,1~0,2 (1x10⁶ -1x10⁷ UFC).

3.15.2 Ensayo de infección mediante la técnica de hoja desprendida

Se recolectaron hojas de plantas crecidas en cámara de cultivo y se guardaron a 4°C para conservar la humedad al momento de infectar. Posteriormente, se realizó una

desinfección superficial con alcohol etílico al 95% (V/V) durante 30 segundos y luego con solución de hipoclorito de sodio al 1% (V/V) por 5 min, Las hojas se lavaron por cinco veces con ADE y se depositaron en placas de Petri con agar al 0,9% (P/V) dejando el pecíolo inmerso en el medio. Se realizaron dos métodos de infección: i) mediante la generación de una lesión mecánica utilizando una aguja hipodérmica estéril e inoculando 10 μ l de la solución bacteriana o solución fisiológica estéril (control negativo); ii) por hisopado en el envés de la hoja utilizando un hisopo estéril embebido con la solución bacteriana o ADE (control negativo).

Las placas conteniendo las hojas infectadas, según i) y ii), se mantuvieron cerradas dentro de una cámara de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de 16/8 hs. Durante 10 días se realizó una evaluación de las lesiones y a medida que fueron apareciendo los síntomas se tomaron fotografías.

3.15.3 Ensayo de infección en plantas mediante la técnica de aspersión

Esta técnica se realizó con la finalidad de obtener condiciones de infección semejantes a las que ocurren a campo. Para ello, se diseñaron cámaras de vidrio que permitieron aislar las plantas creando condiciones de asepsia y humedad necesarias. El proceso de infección se realizó mediante la aspersión sobre las hojas con un atomizador estéril con la solución bacteriana, utilizando Silwet L-77 0,01% (V/V) como tensoactivo para facilitar la aplicación sobre la superficie de las hojas. Las plantas fueron cubiertas con bolsas de nylon humedecidas para crear una cámara de humedad durante tres días y posteriormente, se retiraron las bolsas para mantener las condiciones iniciales de crecimiento [Kurz, 2010; Haapalainen, 2012].

3.15.4 Aislamiento de *P. syringae* desde hojas infectadas in-vitro

Las hojas que exhibieron signos de bacteriosis se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico 95% (V/V) durante 30 segundos y por 5 min con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (V/V). Luego se lavaron por cinco veces con ADE. Posteriormente, las hojas se maceraron en un mortero estéril con solución fisiológica, y 100 μ l del macerado se inoculó en una placa con KB y gentamicina 60 μ g/ml. El macerado también fue utilizado para realizar microscopía de fluorescencia en fresco.

3.16 Amplificación de secuencias repetidas a lo largo del genoma.

La diversidad intraespecífica de *Pseudomonas* fluorescentes, aislados locales identificados como *P. syringae*, se determinó a través de la amplificación de secuencia BOX repetidas a lo largo del genoma [Wolska *et al.*, 2011; Parejko *et al.*, 2012].

3.16.1 BOX-PCR fingerprint.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el primer BOX1AR Tabla 4 [Versalovic *et al.*, 1991]. En un volumen final de reacción de 50µl se incluyeron:

Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM c/u
Primer BOXA1R	2 µM
Taq polimerasa	1,5 U
ADN genómico	150 ng

Las amplificaciones se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas [Ramette *et al.*, 2006]:

1 ciclo de:

95°C 5 min

35 ciclos de:

94°C 1 min

57°C 1 min

65°C 8 min

1 ciclo de :

65°C 15 min

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles al 2% (P/V) de agarosa conteniendo tampón TAE 1X y Buffer de siembra con GelGreen 6X, a 60 V en los primeros 30 min y a 90 V por los 60 min restantes. Luego fueron visualizados y fotografiados en transiluminador de luz azul.

3.16.2 Análisis de los datos genotípicos.

Las imágenes obtenidas de la electroforesis se analizaron de forma manual. A partir de ellos se obtuvieron matrices binarias correspondientes a la presencia/ausencia, en cada muestra, de los marcadores obtenidos en las amplificaciones. Estas matrices fueron analizadas con el programa InfoGen versión 2011 (Universidad Nacional de Córdoba), para calcular los datos de distancia y construir los dendrogramas correspondientes.

3.17 Detección del gen *hrcV*

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el par de primer SAF-F y SAF-R (Tabla 4), en un volumen final de reacción de 50µl [Vaseghi *et al.*, 2013].

Mix:

Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,5 mM
Primer SAF-F	0,25 µM
Primer SAF-R	0,25 µM
Taq polimerasa	1,5 U
ADN genómico	2 ng

.- Ciclos de temperatura utilizados:

1 ciclo de:

94°C 4 min

35 ciclos de:

94°C 30 seg

60°C 30 seg

72°C 1 min

1 ciclo de :

72°C 10 min

3.18 Detección de los genes *syrD* y *syrB* involucrados en la producción de siringomicina

La reacción de PCR se llevó a cabo independiente para cada par de cebadores de los genes *syrB* y *syrD*, en un volumen final de reacción de 50µl.

Mix:

Buffer 1X

MgCl₂ 1,5 mM

dNTPs 0,5 mM

Primer forward 0,5 µM

Primer reverse 0,5 µM

Taq polimerasa 1,5 U

ADN genómico 50 ng

.- Ciclos de temperatura utilizados:

1 ciclo de:

94°C 10 min

35 ciclos de:

94°C 1,5 min

62°C 1,5 min

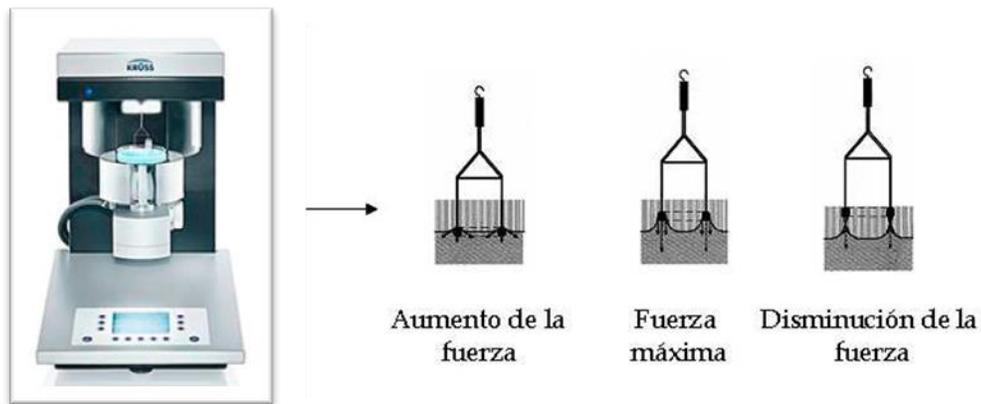
72°C 1 min

1 ciclo de :

72°C 10 min

3.19 Determinación de la tensión superficial.

La determinación de la disminución de la tensión superficial se realizó mediante el método de Du Nouy [Tadros, 2005] basado en el ángulo de contacto que el líquido establece con una superficie sólida, para ello se utiliza un equipo Kruss modelo K20. El método de Du Nouy es una medida dinámica que consiste en suspender verticalmente sobre la muestra a analizar, un anillo de platino, sumergirlo por debajo de la superficie y posteriormente se le hace ascender como se detalla en el siguiente esquema.



Diagramas de fuerzas al elevar con diferentes intensidades el anillo de la muestra, en medidas de tensión superficial mediante el método de Du Nouy, utilizando el equipo Kruss modelo K20.

3.20 Extracción y obtención del biosurfactante glicolipídicos.

A partir de 250ml de cultivo bacteriano crecido en medio descrito en (3.1), se purificó mediante precipitación ácida y extracción por solventes apolares (acetato de etílo), adaptado de [Giraldo 2012; Okkotsu *et al.*, 2013]. Luego de la evaporación del solvente, las muestras se suspendieron en agua destilada estéril.

3.21 Ensayos colorimétricos para la detección y cuantificación de glicolípidos.

3.21.1 Detección de glicolípidos en placas de agar CTAB/MB

Para evaluar las diferentes variables se hicieron placas con agar y CTAB/MB (3.1) según Siegmund y Wagner [1991]. En el agar se hicieron perforaciones con un sacabocados estéril de 5.5 mm de diámetro y se adicionó una alícuota de una solución de glicolípidos.

3.21.2 Cuantificación de glicolípidos; reacción del órcinol

El glicolípido purificado fue cuantificado por análisis espectrofotométrico usando la prueba de órcinol. Estos ensayos detectan y cuantifican los glicolípidos presentes después de la acidificación y calentamiento de la ramnosa con el reactivo. Las moléculas del azúcar que compone al glicolípido, reaccionan con el H₂SO₄ y órcinol (1,3-dihidroxi-5 metilbenceno) a altas temperaturas (30 min/80°C) formando un color amarillo-dorado lo cual se puede cuantificar midiendo su absorbancia a una DO_{421nm}. Para esta cuantificación se realizó previamente una curva de calibración con L-ramnosa a diferentes concentraciones entre el rango de 0-50 mg/ml [Ochsner *et al.*, 1994]. Preparación de la solución de órcinol: Órcinol

Metodología: A 100 µl de la muestra de glicolípido purificado se adicionó 600 µl de la solución de órcinol al 1.6 % (^P/_V) en H₂SO₄ al 60 % (^V/_V), llevando con agua a un V_f: 1000 µl. Se incubó a 80°C por 30 min, y finalmente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 421 nm.

3.21.3 Detección de glicolípidos en TLC

Los glicolípidos extraídos se disolvieron en cloroformo-metanol (9:1) y 10µl de la muestra se sembró en placas de cromatografía de capa fina (TLC) (gel de sílice 60 F; Merck). La fase móvil está compuesta por cloroformo-metanol-ácido acético (65: 15: 2) y para la visualización de los glicolípidos, la placa seca se sumergió brevemente en un agente de revelado compuesto por 0,15 g órcinol, 8,2 ml de ácido sulfúrico (60%, ^{v/v}) y 42 ml de agua des ionizada. Luego se incubó durante 5 min a 100°C.

3.21.4 Espectroscopía Infrarroja (IR)

En los estudios de absorción de radiación IR se utilizó la técnica FT-IR usando un espectrofotómetro BRUKER TENSOR 27, perteneciente al Departamento de Química de la UNRC. Las muestras dispersas en solución acuosa, se depositaron por “drop casting” sobre una oblea de silicio (111) y se secaron en un desecador a presión atmosférica y a temperatura ambiente para evitar la posible descomposición térmica de los materiales.

3.21.5 Espectrometría de masas (MS)

La identificación de glicolípidos se realizó mediante espectrometría de masas utilizando un equipo MICRO QTOF II (Bruker). Servicio prestado por ICYTAC – CONICET, de la Universidad Nacional de Córdoba.

3.22 Determinación de la inhibición del crecimiento de *G. candidum* por agentes surfactantes

Para este experimento se realizaron pocillos en placas de PDA sólido (**3.1**), a los que se les se agregó 100µl de los RL purificados, como control se agregó 100µl de agua destilada estéril en otro pocillo. Posteriormente, las placas se rociaron en forma homogénea utilizando un aspersor con una suspensión del hongo *G. candidum* y se incubaron a 30°C durante 24 hs. La zona de inhibición fue determinada desde el límite de los pocillos [Gross y De Vay, 1977].

3.23 Análisis estadístico

Las experiencias fueron realizadas en diseños aleatorizados y los valores representan las medias de tres repeticiones. Los datos se analizaron empleando el test de ANOVA con una comparación múltiple de variables por el test de LSD Fisher considerando diferencia significativa un nivel de $p=0,05$. Todos los análisis estadísticos se evaluaron con el software InfoStat (Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba).

Capítulo 4: Resultados y Discusión

Caracterización fenotípica y filogenética

4.1 Producción de pigmentos fluorescentes.

La producción de pigmentos fluorescentes es característica de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, por lo tanto para corroborar si la cepa en S5 pertenece a este grupo de bacterias se utilizó un medio de cultivo deficiente en hierro. Para ello, la cepa en estudio se la hizo crecer en placas con medio KB sólido durante 48 hs a 30°C y luego se irradió la placa con luz UV_{360nm}. Posteriormente, al observarse fluorescencia positiva (Figura 6) se procedió a caracterizar la cepa en base al esquema LOPAT que significa: producción de **L**evano, presencia de citocromo **c-O**xidasa, **P**ectinólisis en papa, producción de **A**rginina dihidrolasa y reacción de hipersensibilidad en **T**abaco. Estos ensayos fueron propuestos por Lelliot (1966) para caracterizar cepas de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de plantas infectadas.



Figura 6: Fluorescencia de la cepa S5 crecida durante 48 hs a 30°C en medio KB, al irradiarse la placa con luz U.V. 360nm.

4.2 Caracterización fenotípica en base al esquema LOPAT

4.2.1 Producción de Lévano: para verificar la producción de lévano, la cepa S5 se hizo crecer en agar nutritivo (AN) comercial Oxoid con sacarosa al 5% (p/v). Así, se manifiesta la presencia de la enzima levansacarasa, que sintetiza el polisacárido extracelular lévano a partir de sacarosa. Se ha descrito que la presencia de esta enzima otorga una ventaja selectiva a los fitopatógenos, ya que el lévano producido tiene importantes funciones durante el proceso de infección [Hettwer, 1995; Li y Ullrich, 2001]. Este ensayo se consideró positivo para la cepa S5: colonias convexas, blancas y mucosas después de 72 hs de incubación a 30°C (Figura 7).

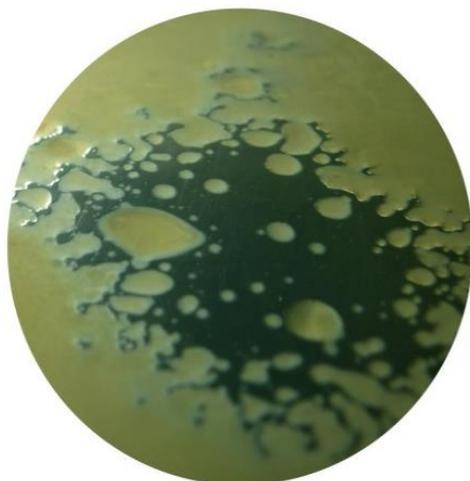


Figura 7: Detección de la producción de levano por la cepa S5 cultivada en AN suplementado con 5% sacarosa a 30°C durante 72hs.

4.2.2 Presencia de citocromo C oxidasa: la detección de citocromo C oxidasa se manifiesta con el reactivo oxalato de dimetil-*p*-fenilendiamina, un indicador redox contenido en un disco comercial. Para realizar este ensayo se agregan los discos impregnados con el reactivo en tubos que contienen suspensiones bacterianas de las cepas S5 y *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, ésta última como control positivo. La reacción resultó negativa para la cepa S5, y positiva para la cepa PAOI, observándose un color fucsia-rosado luego de 30 segundos en el tubo de la reacción positiva.

4.2.3 Pectinólisis en papa: este ensayo se consideró negativo ya que no se observó signos de pudrición de la papa luego de una incubación en cámara húmeda por 48 hs a 30°C. Como control positivo de la pectinólisis se utilizó la cepa *P. putida* SJ 01.

4.2.4 Producción de arginina dihidrolasa: para estudiar la degradación del aminoácido arginina se siguió la metodología descrita en [Thornley, 1960]. Para ello, la cepa S5 se incubó durante 72 hs a 30°C en anaerobiosis en presencia del indicador rojo fenol. La cepa S5 se considera arginina dihidrolasa negativa ya que no se observó un viraje en el color del indicador de pH.

4.2.5 Respuesta de hipersensibilidad (RH) de plantas de tabaco: el sistema de defensa más eficaz que tienen las plantas ante la presencia de un fitopatógeno es la RH. Esta respuesta por parte de la planta es compleja tal como se describe en el ítem 1.3.

Para este ensayo se utilizaron las cepas S5 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. La RH se evaluó dos días después de la inoculación de las cepas en el envés de hojas de planta de tabaco. Como se observa en la Figura 8 A y B las hojas inoculadas con ambas cepas presentaron, a las 72 horas posteriores a la inoculación, una clorosis en las células del parénquima, con una zona necrótica en el área infiltrada. Esto ocurre por generación de una reacción de incompatibilidad entre las cepas ensayadas y la planta de tabaco. En ambas Figuras 8 A y B se muestra el control negativo realizado mediante la inoculación de la hoja con una solución MgCl₂ 10mM presentando a igual tiempo de incubación síntomas negativos de clorosis. Se concluye que la RH positiva indica que ambas cepas bacterianas inoculadas, la cepa control y la S5 en estudio, son cepas patógenas que sintetizan proteínas de avirulencia (Avr) y son reconocidas por receptores específicos asociados a sistemas de defensa de la planta de tabaco.

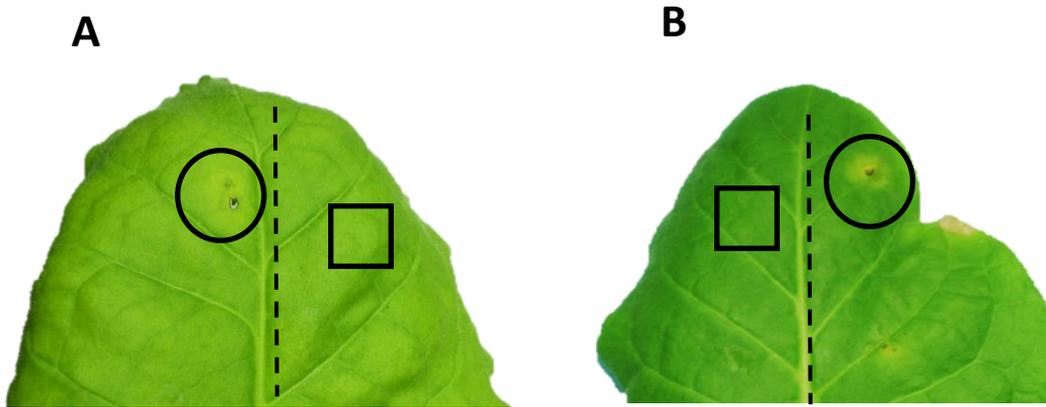


Figura 8: Respuesta de hipersensibilidad (RH) en hojas de plantas de tabaco infectadas con $10\mu\text{l}$ de solución bacteriana, 1×10^8 UFC: **(A)** *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (control positivo); y **(B)** cepa S5. La reacción positiva fue observada dentro de las 48 horas posteriores a la inoculación. Los círculos representan la zona inoculada con las respectivas cepas y los cuadrados marcan la inoculación con MgCl_2 10mM (control negativo).

Luego de obtener un perfil LOPAT concordante al descrito por [Brawn-Kiewnick y Sands, 2001] para las cepas pertenecientes a la especie *P. syringae*: producción de lévano y RH positivos y, negativas las pruebas de oxidasa, arginina dihidrolasa y producción de pectinólisis en papa, se concluye como primera aproximación que la cepa S5 se incluye dentro de la especie de *P. syringae*.

4.3 Caracterización filogenética mediante herramientas moleculares

La utilización de PCR en la identificación de cepas de *P. syringae*, es una de las técnicas de biología molecular mayormente empleada. Una gran variedad de secuencias incluyendo *16S rRNA*, *23S rRNA*, *ITS1*, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *carA*, *rpoB*, *rpoD*, *nos* y *nor*, han sido utilizados como marcadores filogenéticos [Boris y Bull 2009; Bennasar *et al.*, 2010; Bull *et al.*, 2011]. Sin embargo, la principal restricción impuesta por estos marcadores es que también detectan bacterias pertenecientes a otras especies del género *Pseudomonas*.

4.3.1 Detección del gen *hrcV*, localizado en la isla de patogenicidad de genoma

En *P. syringae*, las denominadas islas de patogenicidad son regiones genómicas que contienen los genes *hrp* / *hrc* que codifican el Hrp (sistema de secreción tipo III), el cual tiene

una gran importancia en las interacciones bacteria-planta, y la identificación global de sus efectores es importante para la comprensión de la patogénesis de las bacterias que utilizan sistemas de secreción tipo III.

La detección de *P. syringae* mediante herramientas moleculares es a menudo difícil y controversial. Sin embargo recientemente, ha sido propuesto el gen *hrcV*, localizado en las islas de patogenicidad del genoma bacteriano, para ser utilizado como un marcador efectivo para una rápida detección de pvs. de *P. syringae*. Este gen, en comparación con otros genes utilizados para tal fin, es ampliamente utilizado por su elevada especificidad, prevalencia y por presentar una alta conservación evolutiva en los diferentes pv. analizados [Vaseghi *et al.*, 2014].

Por lo expuesto y a fin de continuar con la caracterización de la cepa S5 aislada de avena, y en un principio incluida en la especie *P. syringae*, en esta tesis, se procedió a realizar una reacción de PCR utilizando los cebadores, diseñados por [Vaseghi *et al.*, 2014], a fin de detectar un fragmento de aproximadamente 440pb correspondiente al gen *hrcV*. En este ensayo se utilizó ADN genómico como molde, proveniente de diferentes bacterias: *P. fluorescens* (control negativo), *P. syringae* pv. *syringae* B728a (control positivo), y *P. syringae* S5 (cepa problema a analizar). En la reacción de PCR, se detectó un fragmento amplificado de \approx 400pb, tanto en la cepa control *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Figura 9 calle 2) como en *P. syringae* S5 (Figura 9 calle 3).

La clasificación filogenética de esta cepa, mediante la detección del fragmento amplificado correspondiente al gen *hrcV* nos permitió confirmar en base a lo propuesto por Vaseghi [2014], que la cepa en estudio pertenece a la especie fitopatógena *P. syringae*.

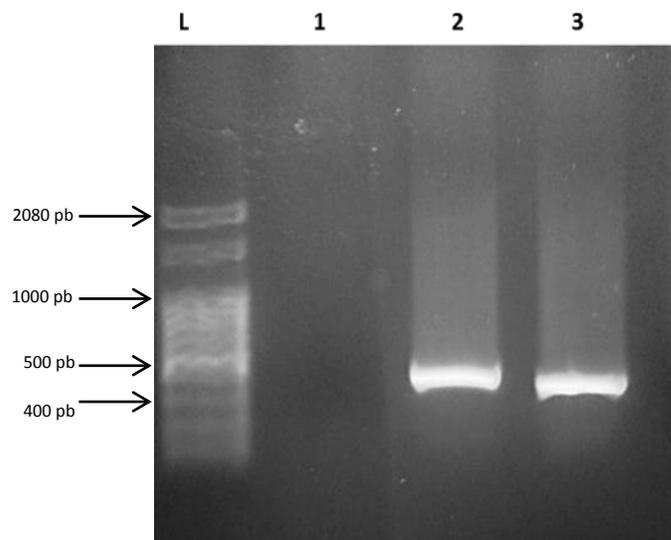


Figura 9: Detección del gen *hrcV*: electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), de los fragmentos producidos por PCR con cebadores SAF-F y SAF-R, y el ADN genómico de *Pseudomonas*; 1).- *P. fluorescens* (control negativo); 2).- *P. syringae* pv. *syringae* B728a (control positivo); 3).- *P. syringae* S5; L).- Leader 100pb.

4.3.2 Amplificación y secuenciación del gen *ARNr 16S*.

Para determinar la posición y las distancias filogenéticas entre la cepa S5 aislada de avena y las distintas cepas del género *Pseudomonas*, se realizó el correspondiente análisis de las secuencias del gen *ARNr 16S*. El estudio de dicho gen es uno de los caracteres más utilizados en taxonomía, hasta el momento, debido a que presenta poca variabilidad a nivel evolutivo, su producto es esencial y funcionalmente conservado.

Los resultados obtenidos en este alineamiento indicaron que la cepa S5, en función de la secuencia de nucleótidos del gen *ARNr 16S*, posee elevados porcentajes de identidad con bacterias de la especie *P. syringae* (Tabla 5).

Tabla 5: Resultado del alineamiento y cálculo del porcentaje de identidad de las secuencias del gen *ARNr 16S* de la cepa S5 aislada de avena y secuencias de cepas obtenidas de la base de datos *GenBank* (NCBI).

Sequences producing significant alignments:					
Select: All None Selected:0		Show all columns			
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
	Description	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas syringae pv. atropurpurea gene for 16S rRNA	93%	0.0	99%	AB001440.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas syringae pv. porri partial 16S rRNA gene, isolate P55	93%	0.0	99%	FN554248.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas syringae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3310	93%	0.0	99%	AB680056.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 strain DC3000 16S ribosomal RNA, complete sequence	93%	0.0	99%	NR_074597.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas syringae pv. tomato strain HX-2816 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0.0	99%	JQ945227.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas syringae pv. tomato strain HX-616 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0.0	99%	JQ945216.1

En un estudio previo, apoyado por pruebas estadísticas de validación cruzada, se reveló que un valor del 98.65% de identidad del gen *ARNr 16S* puede ser utilizado como umbral para la diferenciación de dos especies [Kim *et al.*, 2014]. Por lo tanto, la identificación obtenida con el análisis BLASTn indica que la cepa S5 pertenece a la especie *P. syringae* ya que presenta un porcentaje de identidad adecuado para tal clasificación, teniendo una mayor identidad con *P. syringae* pv. *atropurpurea*.

Con la finalidad de determinar la distancia evolutiva y las relaciones filogenéticas entre la cepa S5 y las principales especies del género *Pseudomonas*, se construyó un árbol filogenético (Figura 10).

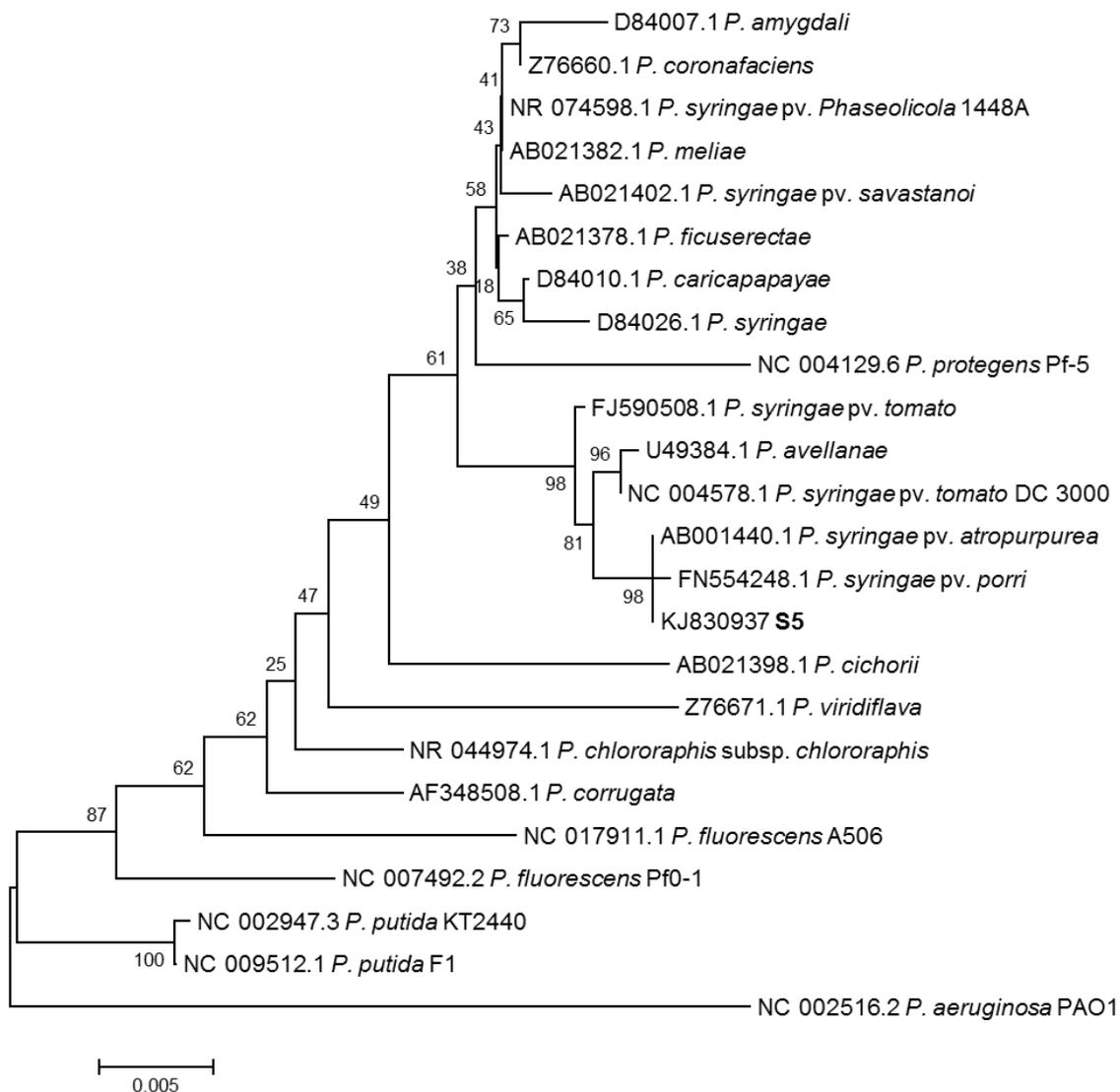


Figura 10. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del gen *ARNr 16S* de la cepa nativa **S5** y de las principales especies del género *Pseudomonas*. A nivel de las ramas se muestran los valores de *bootstrap* expresados como un porcentaje de 1000 replicaciones. La barra representa la sustitución de 5 nucleótidos cada 1000. Junto a la denominación de cada cepa se encuentran los números de acceso a las secuencias depositadas en *GenBank*.

El árbol filogenético obtenido (Figura 10) muestra la formación de un clúster principal, en el cual la cepa *P. aeruginosa* PAO1 queda excluida; a su vez este *cluster* principal se subdivide en dos clúster donde se diferenciaron las cepas perteneciente a la especie *P. putida* de

las demás cepas analizadas. La cepa **S5** se ubicó dentro del clúster conformado principalmente por cepas de la especie *P. syringae* y presenta una mayor relación filogenética con la cepa *P. syringae* pv. *atropurpurea*, corroborando el resultado obtenido previamente por el análisis realizado con el software BLASTn. Es de destacar que el pv. *atropurpurea* se aisló de *Lolium multiflorum*, perteneciente a la familia de las *Poaceae*, al igual que *Avena sativa* [Takahashi *et al.*, 1996].

A partir de estos resultados se nombrará a esta cepa, aislada de hojas de avena, como *P. syringae* S5.

4.3.3 BOX-PCR fingerprint: diversidad entre cepas de *P. syringae*.

Para analizar la diversidad entre la cepa *P. syringae* S5 (de avena) con aislados locales de otros cultivos e identificados como pertenecientes a la especie *P. syringae* y, con algunas cepas de referencia, se realizó la amplificación de secuencias de BOX repetidas a lo largo del genoma. La amplificación de estas secuencias es un método desarrollado para clasificar bacterias en base a patrones de *fingerprint* genómico.

BOX-PCR es una poderosa herramienta para la diferenciación de cepas en microbiología médica, epidemiología y ecología microbiana por su alto nivel resolutivo [Ishii y Sadowsky, 2009].

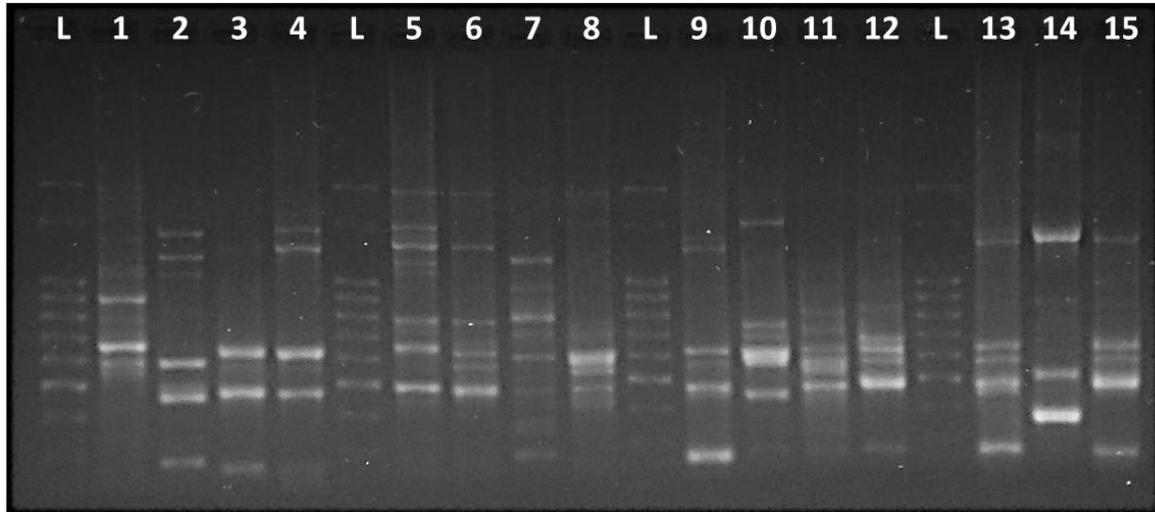


Figura 11: BOX-fingerprint de cepas de *P. syringae* de referencia y aisladas en el sur de Córdoba. Productos de PCR en gel de agarosa 2% (P/v). Las cepas analizadas son: (1) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; (2) *P. syringae* pv. *syringae* 61; (3) *P. syringae* pv. *maculicola*; (4) *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a; (5) *P. syringae* pv. *tabaci* 6605; (6) *P. syringae* pv. *glycinea* B076; (7) *P. syringae* S5; (8) *P. syringae* VT2; (9) *P. syringae* Q; (10) *P. syringae* EM1; (11) *P. syringae* LS3; (12) *P. syringae* A5; (13) *P. syringae* C13; (14) *P. syringae* pv. *syringae* B728a; y (15) *P. putida*; L: Ladder 100 pb.

En la Figura 11 se observa la resolución de los perfiles obtenidos para las cepas analizadas. La reacción de PCR realizada para este experimento fue puesta a punto en el laboratorio. Cuando se utilizó el cebador BOXA1R se obtuvieron perfiles de bandeo característicos para cada una de las cepas utilizadas; seis cepas de referencia y los aislados locales; siete cepas identificadas como *P. syringae* y una cepa como *P. putida* SJ 01. Los perfiles están compuestos por un número de 7 a 11 bandas de diferentes tamaños, desde 100pb a 2080pb.

Con las condiciones de amplificación utilizadas se generaron un total de 31 marcadores, que representaron sólo bandas polimórficas; de éstas, 5 generaron un perfil duplicado, es decir que presentaron la misma matriz a lo largo de las muestras analizadas. De esta manera, se obtuvieron un total de 15 muestras con perfil único. En la Tabla 6 se encuentra la descriptiva de los marcadores generados. Se construyó una matriz bidimensional binaria que se analizó con el software InfoGen versión 2011.

Tabla 6: Descripción de datos de marcadores obtenidos por BOX-PCR.

Resumen	Cantidad de casos
Muestras	15
Muestras duplicadas	0
Bandas (número)	31
Patrón bandas duplicadas	5
Bandas monomórficas	0
Bandas polimórficas (%)	100,00
Primers	1

Se calcularon las distancias entre las diferentes muestras a través de la aplicación del modelo *Simple Matching*, con un índice de correlación cofenética de 0,803 y se construyó el correspondiente dendrograma para marcadores moleculares BOX (Figura 12).

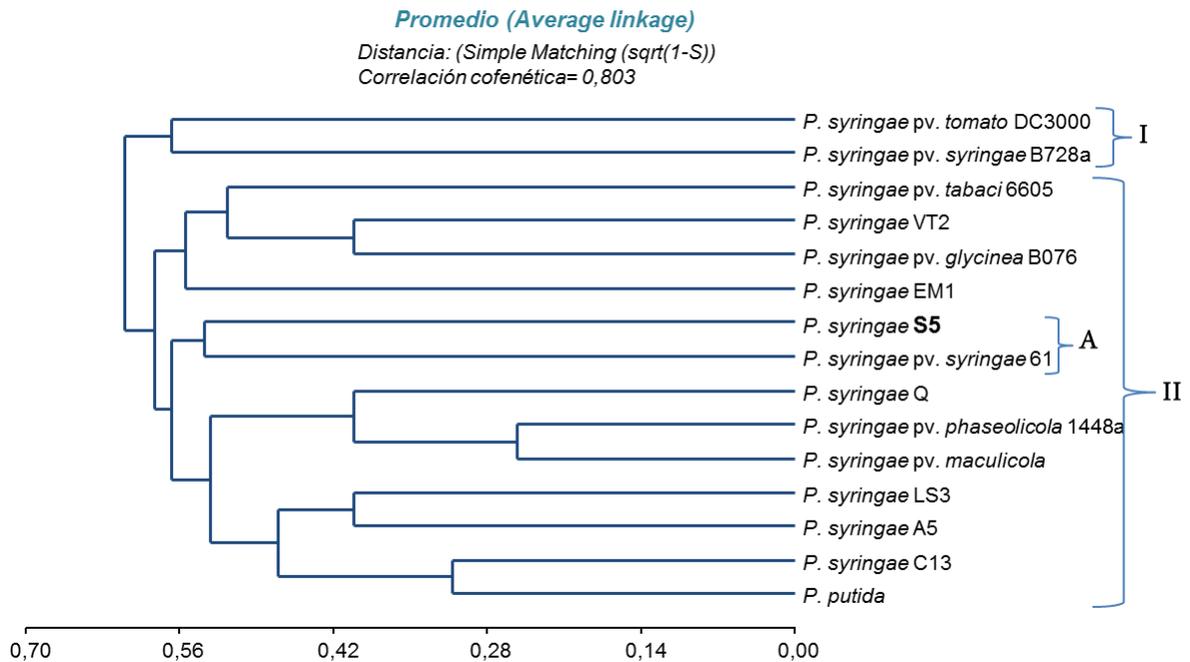


Figura 12: Dendrograma obtenido a partir de los perfiles BOX-fingerprint para las cepas *P. syringae* aisladas en el sur de Córdoba y para cepas de referencia.

En el dendrograma (Figura 12) se observa la conformación de dos *cluster* (I y II) que comparten aproximadamente un 40% de similitud. El grupo I está conformado por las cepas de referencia *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *syringae* B728a con un 44% de similitud. El grupo II está compuesto por el resto de las cepas analizadas, encontrándose dentro de éste, (agrupamiento A) la cepa nativa *P. syringae* S5 aislada de avena y la cepa de referencia *P. syringae* 61 aislada de hojas de trigo.

Se observa que las cepas VT2, EM1, Q, LS3, A5 y C13 aisladas en la región a partir de plantas de soja y caracterizadas como pertenecientes a la especie *syringae* [Oliva *et al.*, 2015], también encuentran similitud dentro del grupo II.

Para completar el análisis se utilizó una cepa de *P. putida* SJ 01 aislada de rizósfera, la cual presentó mayor relación con la cepa nativa C13, ambas separándose del resto de las cepas de *P. syringae*, con un 55% de similitud entre ellas.

Es de resaltar que la cepa *P. syringae* S5 (aislada de avena) no presenta una relación de similitud con las otras cepas aisladas de plantas de soja de la región. Sin embargo, se agrupa con mayor similitud con *P. syringae* pv. *syringae* 61, aislada de plantas de trigo, ambos cultivares pertenecientes a la familia *Poaceae*.

En conclusión, estos resultados evidencian la presencia de una diversidad genómica existente entre las cepas de *P. syringae* analizadas. Siendo éste, un resultado diferente al obtenido por Eltlbany *et al.*, [2012], en donde mediante el análisis BOX-PCR señalaron que cepas del fitopatógeno *Pseudomonas savastanoi*, aisladas de diferentes hospederos y regiones geográficas, presentaban una gran similitud con respecto a su diversidad genómica analizada por igual técnica de BOX-PCR.

4.4 Caracterización de factores de virulencia en *P. syringae* S5

En la historia de la fitopatología, la caracterización de diferentes factores asociados a la virulencia como la movilidad tipo *swimming* y *swarming*, síntesis de proteasas, desarrollo de biofilms, producción de fitotoxinas, entre otros, han sido objeto de estudio ya que estos factores demostraron estar altamente asociados con la iniciación de la enfermedad o la virulencia en ciertas interacciones planta-patógeno.

Además, algunos microorganismos producen sustancias que son tóxicas para plantas, hongos y bacterias. Identificar y aislar estas toxinas se considera como una estrategia alternativa para el desarrollo de herbicidas y plaguicidas biológicos, menos perjudiciales para el medio ambiente que los productos químicos sintéticos utilizados en la actualidad. Estos conocimientos tienen gran importancia en relación con las aplicaciones prácticas en la agricultura [Kimura *et al.*, 2001].

4.4.1 Resistencia al cobre y antibióticos.

La determinación de la tolerancia al metal de cobre (*Cu*) por parte de estas cepas, es de relevancia ya que el control de la enfermedad a campo se basa casi exclusivamente en productos a base de este metal. La resistencia es otorgada por genes localizados en una isla genómica para algunas cepas, y en plásmido para otras cepas de *P. syringae* [Feil *et al.*, 2005].

Cazorla y *col.* [2002] han descrito que las cepas que presentan una concentración inhibitoria mínima (MIC) menor o igual a 0,8mM de Cu_2SO_4 se consideran sensibles a este metal. Como se observa en la Tabla 7A la cepa *P. syringae* S5 presenta una MIC de 4,5mM ya que el crecimiento determinado a las 24 y 48 hs es semejante, lo que significa ausencia de crecimiento a las 48 hs de incubación en presencia de *Cu*. La MIC determinada para la cepa de referencia, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, se observa en presencia de 7,5 mM de CuSO_4 (Tabla 7B).

Por lo tanto, se concluye que ambas cepas presentan resistencia al metal de *Cu*, siendo la cepa de referencia resistente a mayores concentraciones del metal que *P. syringae* S5.

Tabla 7: Determinación de la tolerancia al metal de cobre de las cepas.

A				B			
Cu^{+2} mM	DO _{600nm} To	DO _{600nm} 24hs	DO _{600nm} 48hs	Cu^{+2} mM	DO _{600nm} To	DO _{600nm} 24hs	DO _{600nm} 48hs
0	0,07	1,95	-	0	0,08	1,76	-
1	0,07	2,03	-	1	0,08	1,79	-
3	0,07	0,76	-	3	0,08	1,73	-
3,5	0,07	0,07	1,1	3,5	0,08	1,6	-
4,5	0,07	0,03	0,04	4,5	0,08	1,43	-
5,5	0,07	0,03	0,02	5,5	0,08	0,68	-
6,5	0,07	0,03	0,03	6,5	0,08	0,17	0,3
7,5	0,07	0,06	0,05	7,5	0,08	0,06	0,04

Referencias: (A) *P. syringae* S5 y (B) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Las cepas se cultivaron en tubos con medio de cultivo KB y diferentes concentraciones de Cu_2SO_4 , a 30°C y con agitación de 150 rpm, durante 48 hs. El crecimiento se determinó por absorbancia a DO_{600nm} cada 24 hs, los tubos donde la absorbancia a las 24 hs fue mayor a la obtenida en To (presencia de crecimiento bacteriano), fueron descartados para la determinación de la absorbancia a DO_{600nm} a las 48 hs.

La capacidad de los microorganismos, aislados de suelo y plantas, de crecer en presencia de una gran variedad de antibióticos le brinda ciertas ventajas adaptativas que favorece la competencia por un sitio en la rizósfera y filósfera. Esto les permite desarrollar un papel importante en la neutralización de los efectos antagónicos por parte de otros microorganismos [Hernández Forte *et al.*, 2012].

Los ensayos realizados para conocer la resistencia o sensibilidad a diferentes antibióticos, dieron como resultado que la cepa *P. syringae* S5 fue sensible a: 100µg/ml de ampicilina, 20 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de gentamicina y tetraciclina, y a 5µg/ml de rifampicina.

En general, las cepas de *P. syringae* presentan resistencias a alguno de estos compuestos otorgada principalmente por la presencia de plásmidos [Sundin y Bender, 1993]. Sin embargo, en la cepa *P. syringae* S5 no se detectó la presencia de ADN extracromosomal, al menos, siguiendo las técnicas de extracción y purificación de plásmidos descritas en [Sambrook y Russel, 2001].

4.4.2 Movilidad bacteriana

Tal como se describió en el capítulo 1 (Introducción), los microorganismos utilizan diversos tipos de movilidad, durante el proceso de colonización. Esta capacidad de migración es un fenómeno que puede afectar las interacción patógeno-huésped tanto en animales como en vegetales.

Para determinar ambos tipo de movilidad (*swimming* y *swarming*), se llevó a cabo la metodología descrita en Materiales y Métodos, utilizándose el medio de cultivo KB diluido al 10% (V/V), con la adición de diferentes concentraciones finales de agar según la movilidad a determinar: 0,3% para *swimming* y 0,5% para *swarming* [Butler, 2010]. En la Figura 13 se observa que la cepa *P. syringae* S5 presentó ambos tipos de movilidad luego de 8 días de incubación a 30°C.

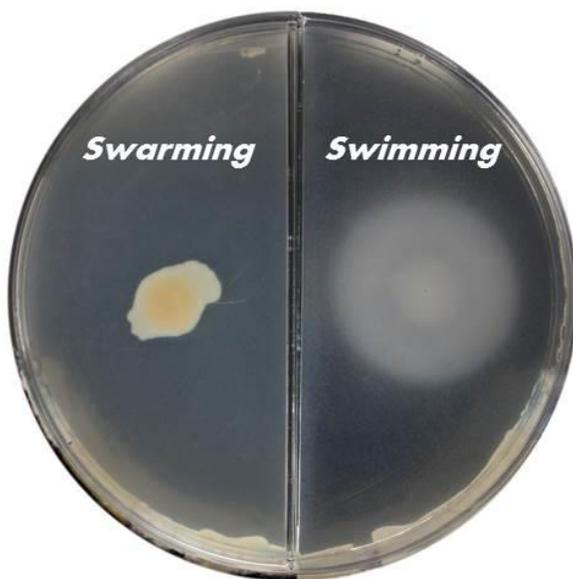


Figura 13: Movilidad de *P. syringae* S5 en placas de KB al diluido al 10% (V/V), con agar al 0,5% (P/V) (izquierda) y con 0,3% (P/V) (derecha). Las placas se incubaron durante 8 días en estufa a 30°C. La imagen es representativa de 3 repeticiones independientes (n=3).

4.4.3 Detección cualitativa de actividad proteasa

Los microorganismos infecciosos secretan actividad proteasa como factores de virulencia facilitando la colonización de diferentes nichos, por lo tanto fue de interés determinar la producción y secreción de esta proteína en la cepa *P. syringae* S5. La determinación se realizó mediante ensayos llevados a cabo en medio de cultivo NYGA suplementado con leche descremada estéril al 10% (V/V). Para el ensayo se utilizaron otros pv. con fines comparativos, tales como, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *syringae* 61 y, como control negativo, se utilizó agua estéril. En la Figura 14 se observa un halo transparente únicamente alrededor de la zona de crecimiento de la cepa de *P. syringae* S5, indicando la presencia de actividad proteasa en esta cepa. Las otras cepas incorporadas al experimento no presentaron un halo similar, por lo tanto la actividad proteasa se considera negativa.

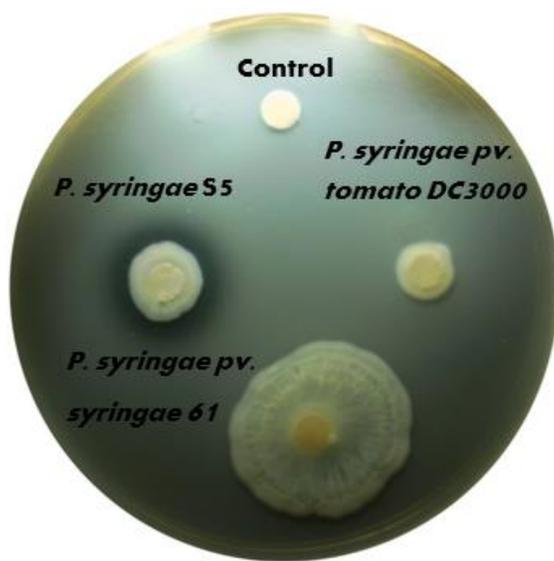


Figura 14: Actividad proteasa en placas con medio NYGA suplementado con 10% (V/V) de leche descremada estéril. Se ensayaron las cepas *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; *P. syringae* pv. *syringae* 61; *P. syringae* S5 y, agua estéril como control negativo, la placa fue incubada por 72 hs a 30°C.

4.4.4 Análisis de *quorum-sensing*

Las bacterias sintetizan moléculas que intervienen en los mecanismos de señalización celular y en la regulación de genes específicos en respuesta a su densidad poblacional. Este mecanismo es denominado *quorum-sensing* (QS). En la especie *P. syringae*, este sistema de QS controla rasgos que participan en la aptitud epífita y virulencia. El proceso más estudiado de QS en bacterias Gram negativas implica la producción de acil homoserin lactonas (AHL) de cadena carbonada corta (C4-C8) y de cadena larga (C6-C16) [Dulla y Lindow, 2008].

Para determinar si la cepa S5 produce moléculas señal del tipo AHLs, se llevó a cabo un estudio con cepas indicadoras tales como: a) *C. violaceum* CV026, una doble mutante mini Tn5 derivada de *C. violaceum* ATTC 31532, que produce violaceína, cuya síntesis es inducida por AHLs de cadena corta; y b) *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), para detectar AHLs de cadena larga mediante la inducción de actividad β -galactosidasa vinculada a *traR*.

4.4.4.1 Determinación de AHL de cadena corta

Para realizar este ensayo se utilizaron las cepas *P. syringae* S5, *P. fluorescens* WCS17 y como control positivo de la producción de AHLs de cadena corta, la cepa *P. aeruginosa* PAOI Δppx . En los pocillos se colocaron los sobrenadantes de las diferentes cepas crecidas en medio KB líquido, a 30°C y 150rpm durante 73 hs. Como se observa en la Figura 15 la cepa *P. syringae* S5 no presentó producción de AHLs de cadena corta en comparación con el control positivo, *P. aeruginosa* PAOI Δppx . Sin embargo, no se descarta la posibilidad que la cepa S5 sintetice este tipo de moléculas de señalización bacteriana ya que han sido detectadas en otras cepas de *P. syringae*.

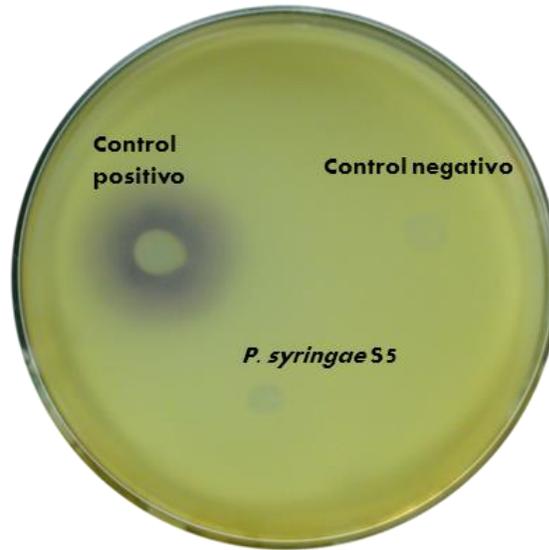


Figura 15: Producción de AHLs de cadena corta en la cepa de *P. syringae* S5 en el medio LB. Se utilizó la cepa *P. aeruginosa* PAOI Δ *ppx* (control positivo) y *P. fluorescens* WCS17 (control negativo).

4.4.4.2 Determinación de AHLs de cadena larga

Para este ensayo se utilizaron las cepas: a) *P. syringae* S5, b) *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pTiC58 Δ accR) (control positivo), y c) *A. tumefaciens* NTL4 (control negativo). Estas cepas fueron inoculadas por punción con ansa sobre la superficie de la placa. Los resultados se muestran en Figura 16 donde se observa un halo azul producto de la hidrólisis del sustrato X-Gal en las zonas inoculadas con las cepas *P. syringae* S5 y *A. tumefaciens* NTL4 (pTiC58 Δ accR), esto indica que la cepa en estudio, *P. syringae* S5 produce moléculas de AHLs de cadena larga, en estas condiciones de cultivo.

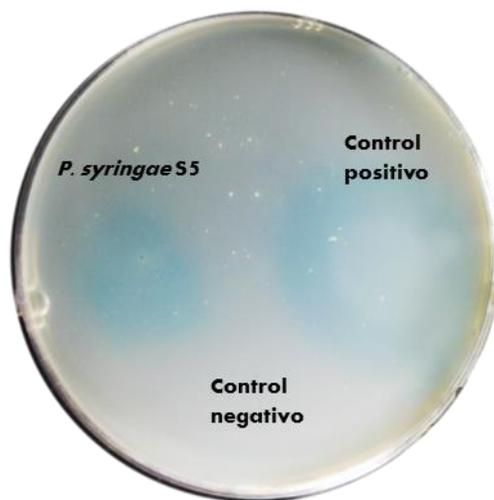


Figura 16. Producción de AHLs de cadena larga en medio AB utilizando *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) como biosensor. Se ensayaron: A) la cepa *P. syringae* S5; B) la cepa *A. tumefaciens* NTL4 pTiC58 Δ accR, como control positivo y, C) la cepa *A. tumefaciens* NTL4 como control negativo.

4.4.5 Formación de biofilm

La formación de biofilm depende, en parte, del estado nutricional en que se desarrollan los microorganismos. Así, las bacterias que crecen en un medio rico en nutrientes no tienen la necesidad de agruparse [Malamud *et al.*, 2012]. A fin de determinar si *P. syringae* S5 produce biofilm se realizó el ensayo en un medio mineral mínimo (MET) con NH₄Cl y sacarosa, como se describe en Materiales y Métodos. La presencia de biofilm se visualizó macroscópicamente mediante la tinción con cristal violeta [O'Toole y Kolter, 1998]. La tinción con cristal violeta es una metodología que no permite diferenciar las diferentes etapas en el desarrollo del biofilm, permite únicamente determinar de manera indirecta cuantas células se encuentran adheridas a la superficie. Cuantitativamente se determina calculando el valor de la adhesión relativa relativizando la adhesión bacteriana (CV_{560nm}) a la superficie en relación con el crecimiento de las cepas (DO_{620nm}), siendo $AR = CV_{560nm} / DO_{620nm}$. Para *P. syringae* S5 en el medio de cultivo mencionado, este valor fue de $0,41 \pm 0,03$, por lo que se concluye que esta cepa tiene la capacidad de formar biofilm.

4.4.6 Detección de la fitotoxina siringomicina

Algunas cepas de *P. syringae* tienen la capacidad de sintetizar siringomicina, una fitotoxina que afecta el transporte de los iones a través de la membrana de células eucariotas, alterando la liberación de metabolitos [Hutchison y Gross, 1997]. Para detectar esta toxina se empleó la técnica microbiológica descrita por Gross y De Vay [1977], la cual consiste en utilizar el hongo *Geotrichum candidum* cuyo crecimiento es inhibido en presencia de una cepa bacteriana productora de siringomicina.

Para este estudio los microorganismos ensayados fueron: i) *P. syringae* S5, ii) *P. syringae* pv. *syringae* B728a, como control positivo según lo demostrado por Feil *et al.*, [2005]; y iii) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (control negativo). El hongo se inoculó en una placa únicamente con el medio PDA para obtener un control del crecimiento homogéneo de *G. candidum*, (Figura 17 A). Luego del periodo de incubación, se observó que la cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, seleccionada como control negativo, no genera inhibición en el crecimiento del hongo *G. candidum* (Figura 17 B), resultados que concuerdan con lo descrito por [Hwang, 2005]. Mientras que, en los ensayos realizados con las cepas *P. syringae* pv. *syringae* B728a, control positivo (Figura 17 C), y *P. syringae* S5 (Figura 17 D), se observa un halo de inhibición que rodea la zona de crecimiento bacteriano en el centro de las respectivas placas. Por lo que se concluye que, *P. syringae* S5 podría ser productora de siringomicina, un inhibidor del crecimiento de *G. candidum*.

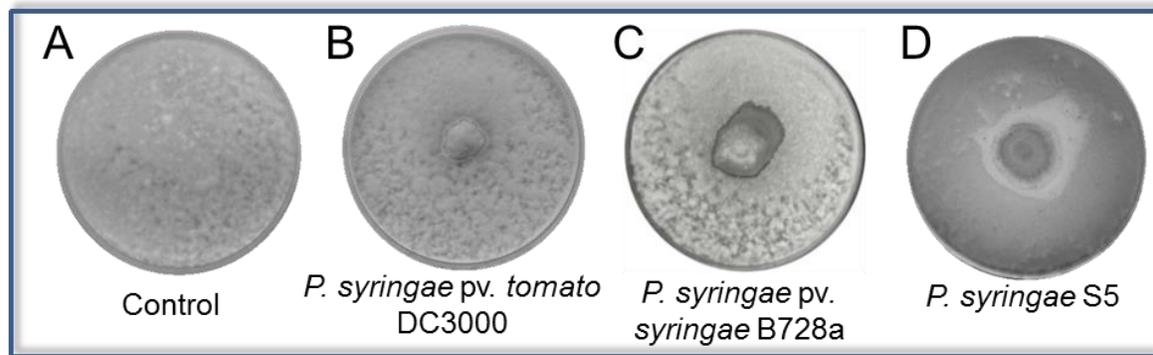


Figura 17: Ensayo de detección de siringomicina en cepas de *Pseudomonas syringae*. El estudio fue realizado en placas de PDA inoculadas con: (A) *G. candidum* en ausencia bacteriana; en presencia de: (B) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, control negativo; (C) *P. syringae* pv. *syringae* B728a, control positivo; (D) *P. syringae* S5. Las placas se incubaron por 24 hs a 30°C. Las imágenes son representativas de al menos 3 repeticiones.

4.4.7 Caracterización del compuesto inhibidor del crecimiento de *G. candidum* producido por *P. syringae* S5

Con la finalidad de corroborar que la inhibición del crecimiento de *G. candidum* generada por la cepa *P. syringae* S5 (Figura 17 D) es causada por la producción de un compuesto perteneciente a la familia de las siringomicinas (lipodepsinonapetido), se utilizó la técnica descrita por Sorensen *et al.*, [1998]. Esta técnica consiste en la utilización de cebadores específicos para detectar los genes marcadores *syrB* y *syrD*. Estos genes son muy conservados y están involucrados en la biosíntesis y exportación de siringomicina, respectivamente.

En la Figura 18 se observa el resultado obtenido al utilizar como molde el DNA genómico de la cepa *P. syringae* S5 y *P. syringae* pv. *syringae* B728a, esta última como control positivo. La presencia de los genes *syrB* y *syrD* (Figura 18) solamente fue detectada en el DNA genómico de la cepa *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Por lo tanto, en base a la bibliografía consultada, planteamos como hipótesis que la inhibición del crecimiento de *G. candidum* podría ser causada por otro tipo de compuesto de naturaleza anfipática, como los biosurfactantes (BS), y no ocasionada por siringomicina.

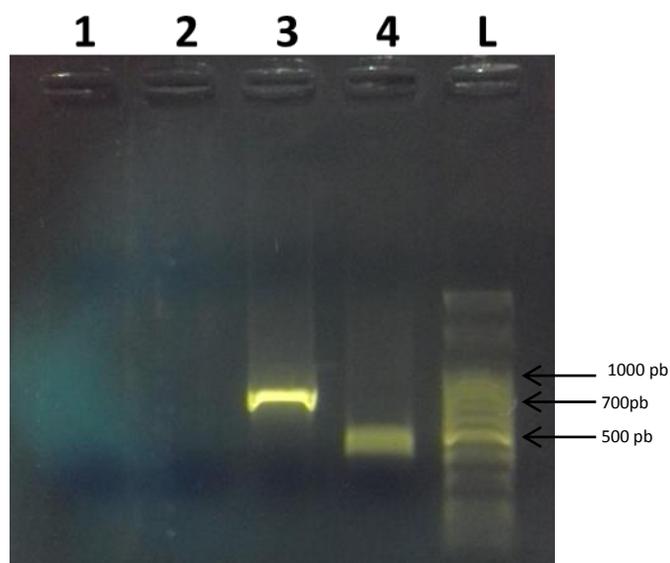


Figura 18: Detección de genes *syrB* y *syrD*: electroforesis en gel de agarosa 1% (P/v) de la reacción de PCR para los cebadores: *syrB* (calle 1 y 3) y *syrD* (calle 2 y 4), utilizando como molde DNA genómico de las cepas *P. syringae* S5 (calle 1 y 2) y *P. syringae* pv. *syringae* B728a -control positivo- (calle 2 y 4). L: Leader 100pb.

4.4.7.1 Detección de biosurfactantes (BS) producidos por *P. syringae* S5.

Los biosurfactantes se clasifican principalmente por su composición química y origen microbiano, y se pueden encontrar tanto intracelularmente, como adheridos a la pared celular, o siendo excretados al medio. Dependiendo de su grupo polar se pueden clasificar en cinco grupos diferentes (Desai y Banat, 1997): glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, tensioactivos poliméricos y tensioactivos particulados. Además, estos compuestos son capaces de disminuir la tensión superficial e interfacial utilizando los mismos mecanismos que los tensioactivos químicos.

Los glicolípidos están constituidos por mono-, di-, tri- y tetrasacáridos de azúcares como glucosa, manosa, trehalosa, soforosa, celobiosa, manosileritritol, y ramnosa, además del componente apolar. Dentro de este grupo cabe destacar a los ramnolípidos, producidos por diferentes especies de *Pseudomonas* [Giraldo, 2012].

En base a lo anteriormente mencionado, se realizaron ensayos para determinar si este tipo de compuesto es capaz de inhibir el crecimiento de *G. candidum*, para ello se utilizaron las cepas: *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1 WT) y PAO1 $\Delta algR$, mutante sobreproductora de ramnolípidos (RL) [Okkotsu *et al.*, 2013]. En la Figura 19 se observan halos de inhibición del crecimiento del hongo *G. candidum* (Figura 19 B y C), generados por ambas cepas de *P. aeruginosa*, siendo esta inhibición mayor en la placa donde creció la cepa PAO1 $\Delta algR$.

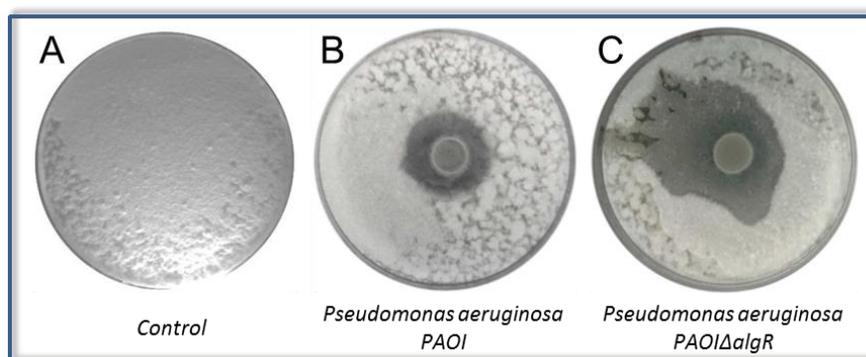


Figura 19: Inhibición en el crecimiento de *G. candidum* en placas de PDA en: (A) ausencia de bacterias; (B) inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 y (C) con *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta algR$. Las bacterias crecieron durante 4 días a 37°C. Imágenes representativas de al menos 3 repeticiones.

En base a estos resultados y a fin de corroborar el efecto inhibitorio de los BS sobre el hongo, realizamos un experimento adicional utilizando 40 μ l de una solución de Silwet L-77 diluida 1/100 (BS sintético) (Figura 20 A), como control negativo se agregó 40 μ l de agua destilada estéril (Figura 20 B).

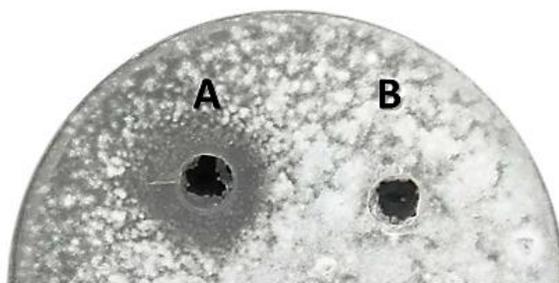


Figura 20: Inhibición del crecimiento de *G. candidum* en placas de PDA en presencia de (A) Silwet L-77 (dilución 1/100 v/v) y (B) agua destilada estéril, como control.

El surfactante sintético, genera una inhibición en el crecimiento del hongo (Figura 20). Esto corrobora la hipótesis formulada con anterioridad, donde se plantea que la inhibición del crecimiento de *G. candidum* observada en las Figura 17 y Figura 19 es causada por la producción de BS sintetizados por las bacterias ensayadas. A partir de estos resultados, fue de interés identificar si la cepa *P. syringae* S5 sintetiza compuestos con propiedades BS que puedan ser causante de la inhibición del crecimiento observada en la Figura 17.

4.4.7.2 Determinación de la tensión superficial.

La tensión superficial se expresa en unidades de fuerza por unidad de longitud (dyn/cm) y depende de las fuerzas cohesivas intermoleculares, las cuales son diferentes en el seno y en la superficie de un líquido. En esta tesis se realizó la determinación de la disminución de la tensión superficial del agua por presencia de BS utilizando el método de Du Nouy [Tadros, 2005], descrito en Materiales y Métodos (*ítem 3.19*).

Las mediciones se efectuaron utilizando los sobrenadantes de cultivos de *P. syringae* S5 libres de células, diluidos con agua MiliQ. A cada una de las diluciones se le determinó la tensión superficial, hasta observar una disminución del valor predeterminado para el agua MiliQ (72 +/- 0.1 dyn/cm). Como resultado se observó que la dilución 1/25 del sobrenadante del cultivo de *P. syringae* S5 disminuyó la tensión superficial del agua a un valor promedio de 37,75 dyn/cm, (n=4).

En base a este resultado, podemos concluir que la cepa *P. syringae* S5 libera al espacio extracelular compuestos surfactantes que disminuyen la tensión superficial del agua.

4.4.7.3 Detección de ramnolípidos.

Dentro de los diferentes tipos de glicolípidos, el ramnolípidos es el comúnmente sintetizado por especies del género *Pseudomonas*, por lo tanto se realizaron ensayos para determinar si el agente surfactante producido por *P. syringae* S5 causante de la disminución de la tensión superficial del agua, pertenece al grupo de los RL. Para ello, se utilizó el método CTAB/MB agar (descrito en el ítem 3.20.1 de Materiales y Métodos), desarrollado por Siegmund y Wagnerk [1991] y comúnmente utilizado para el *screening* de cepas productoras de glicolípidos extracelulares como el RL [Pinzon y Ju, 2009]. Para este ensayo se empleó el medio de cultivo para la producción de BS sólido, suplementado con bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) y azul de metileno (MB). La detección se realiza debido a que los tensioactivos aniónicos secretados por las bacterias forman un complejo insoluble con el MB y CTAB. Así, las colonias productoras de glicolípidos se rodean de halos azul oscuro y blancos producto de la precipitación de los glicolípidos. En la Figura 21 se observa la presencia de los halos descritos, en las cepas ensayadas; *P. syringae* S5 y *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta algR$ (control positivo, hiper-productora de RL), indicando que ambas cepas producen un tipo de glicolípidos, posiblemente del grupo de los ramnolípidos, secretados al medio de cultivo.

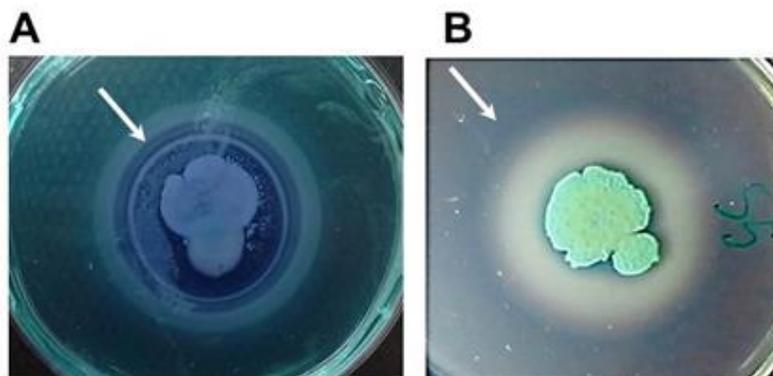


Figura 21: Detección de glicolípidos: (A) *P. aeruginosa* PAO1 Δ algR; (B) *P. syringae* S5, luego de 3 y 4 días de incubación, respectivamente. El medio de cultivo para la producción de biosurfactantes, se suplemento con CTAB y MB. Los halos detectados son visibles por el acomplejamiento de CTAB/MB/RL.

Es importante tener en cuenta que los glicolípidos producidos por una bacteria, como los RL, son una mezcla de diversos tipos y variantes estructurales. La metodología utilizada basada en CTAB/MB no permite diferenciar los diferentes RL y por lo tanto es necesaria la utilización de técnicas de cromatografía y/o espectrometría. Para ello, se procederá en primera instancia a la extracción, purificación y cuantificación de los glicolípidos producidos por la cepa *P. syringae* S5.

4.4.7.4 Extracción, purificación y cuantificación de biosurfactantes (BS).

Luego de determinar cualitativamente que la cepa *P. syringae* S5 es productora de glicolípidos, se procedió a la extracción, purificación y cuantificación de los mismos mediante la metodología descrita en el ítem 3.19 de Materiales y Métodos.

Por lo tanto, y con el fin de conocer si los extractos purificados a partir de las cepas *P. syringae* S5 y *P. aeruginosa* PAO1 Δ algR contenían los glicolípidos observados en la Figura 21, se realizó una detección cualitativa por el método CTAB/MB agar. En la Figura 22 se observa que los extractos purificados de ambas cepas contienen glicolípidos que forman halos de color azul y blancos, al igual que en la Figura 22.



Figura 22: Imagen de los halos formados por los glicolípidos purificados a partir de cultivos bacterianos y depositados en pocillos realizados en placas con CTAB y MB. En cada pocillo se depositó: 62µg/ml de sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 Δ algR (izquierda) y, 100µg/ml de sobrenadante de *P. syringae* S5 (derecha). Las placas se revelaron luego de 2 días de incubación a 30°C.

4.4.7.5 Inhibición del crecimiento de *G. candidum*.

Luego de purificar y cuantificar los glicolípidos producidos por la cepa *P. syringae* S5, se determinó la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento de *G. candidum*, según la metodología descrita en el ítem 3.21 de Materiales y Métodos. Para ello, se agregó el glicolípido purificado en un pocillo del agar (Figura 23A), y como control, en otro pocillo, agua destilada estéril (Figura 23B); como resultado se observó una inhibición del crecimiento de *G. candidum* en la zona próxima al pocillo donde se depositó el glicolípido purificado de *P. syringae* S5. En conclusión, la inhibición del crecimiento de *G. candidum* es producida por los glicolípidos que la cepa *P. syringae* S5 sintetiza y que secreta al medio. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, hay que destacar que la técnica microbiológica de detección de siringomicina descrita por Gross y De Vay [1977], y utilizada en diferentes estudios [Arrebola *et al.*, 2007; Rivera Hoyos y Castaño Zapata, 2011; Kong *et al.*, 2012], no es específica para la detección de esta toxina, sino en general para compuestos anfipáticos.

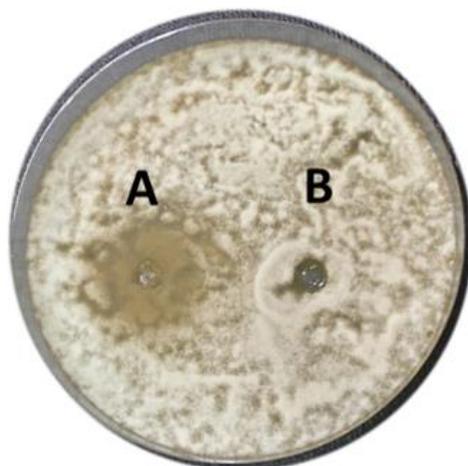


Figura 23: Inhibición del crecimiento de *G. candidum* en placas de PDA. (A) En presencia de glicolípidos purificados a partir de la cepa *P. syringae* S5 (62 μ g/ml) y (B) agua destilada estéril, como control. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

4.4.7.6 Identificación del biosurfactante por espectroscopia Infrarroja (IR)

La irradiación de moléculas con luz IR induce una oscilación de enlaces químicos a frecuencias características y, por lo tanto, absorbe la energía. La transmisión de radiación resultante se mide sobre un espectro de frecuencia de aproximadamente 400-4.000 cm^{-1} . Las bandas son características de cada grupo funcional y permiten identificar las sustancias químicas a partir de los espectros obtenidos, designando las absorciones características a los grupos funcionales correspondientes en base a la literatura [Leitermann *et al.*, 2008; Thavasi *et al.*, 2011].

Mediante esta técnica de espectroscopia, se analizaron los glicolípidos obtenidos de los extractos de *P. syringae* S5. Como resultado se obtuvo un espectro (Figura 24), en donde se observan bandas de absorción que se encuentran entre 1300 y 1000 cm^{-1} e indican la presencia de grupos C-O, propios de azúcares como los polisacáridos. Las bandas dobles en 2921 y 2855 cm^{-1} se derivan de vibraciones de estiramiento CH de grupos alifáticos simétricos, como las representadas en las cadenas de ácido grasos del ramnolípido. La banda encontrada en 1730 cm^{-1} es característica de enlaces éster y grupos de ácido carboxílico. En el área entre 1200 - 1460 cm^{-1} , denominada región de la huella digital del espectro, revela bandas que representan

las vibraciones de C-H y O-H, típicas para los hidratos de carbono como por ejemplo, en las unidades polares de la molécula.

De acuerdo con los grupos funcionales descritos en el espectro obtenido, el BS purificado de *P. syringae* S5 se clasifica como un glicolípido. Cabe destacar que en el espectro obtenido (Figura 24) se observaron iguales bandas de absorción a las obtenidas por Leitermann *et al.*, [2008] al analizar RL extraídos de *P. aeruginosa* DSM 7108.

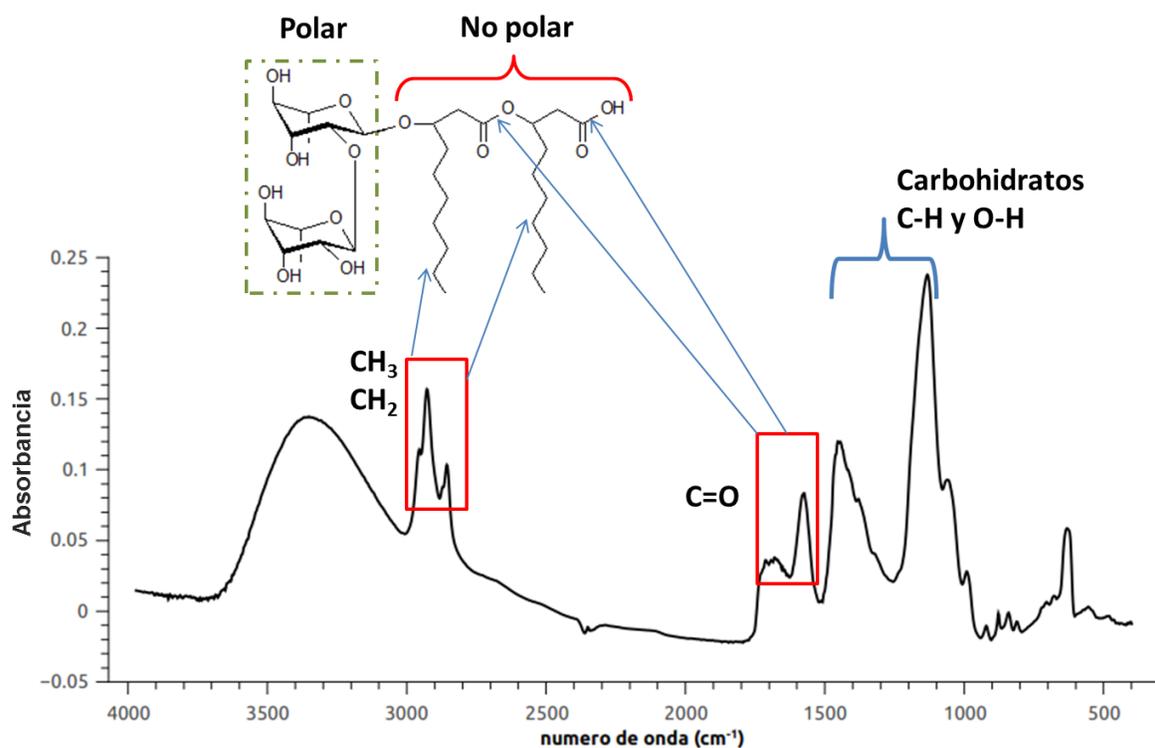


Figura 24: Espectroscopia infrarroja. Espectro obtenido del análisis mediante espectrometría por IR de los glicolípidos en solución acuosa, extraídos de *P. syringae* S5. Los análisis se realizaron utilizando la técnica FT-IR en un espectrofotómetro BRUKER TENSOR 27.

4.4.7.7 Identificación del BS mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Después de conocer la naturaleza glicolípida del BS obtenido, se procedió a realizar cromatografía en capa fina (TLC) para comparar el glicolípido producido por *P. syringae* S5, con los RL extraídos de *P. aeruginosa* PAOI Δ algR. El ensayo se realizó como se detalla en Materiales y Métodos ítem 3.20.3.

Los resultados obtenidos mediante el revelado de los azúcares neutros que reaccionan con el órcinol en presencia de solución de ácido sulfúrico al 60% (V/V), sugieren que *P. syringae* S5 produce BS semejantes a los RL producidos por *P. aeruginosa* PAOI Δ algR. Siendo, además, el patrón de *spots* revelado similar al descrito por Laabei *et al.*, [2014] para la cepa *P. aeruginosa* PAOI, en donde se diferencian dos tipos de RL: mono- ramnolípido y di-ramnolipidos.

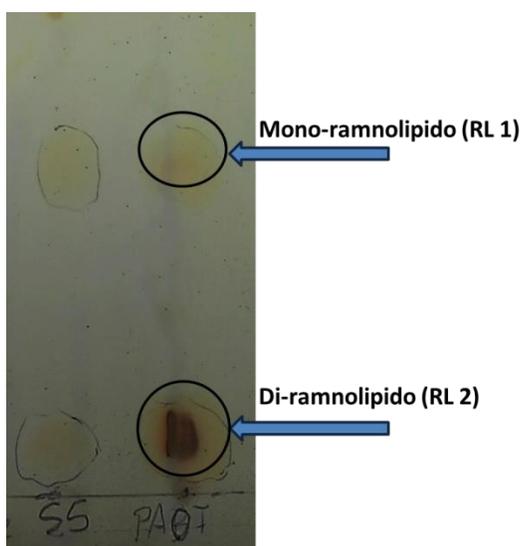


Figura 25: Resolución de los glicolípidos mediante cromatografía en capa fina (TLC). Patrón de glicolípidos obtenidos de los extracto de cada cultivo de las cepas: *P. aeruginosa* PAOI Δ algR (derecha) y *P. syringae* S5 (izquierda) en las concentraciones finales de 62 μ g/ml y 100 μ g/ml, respectivamente. Las flechas azules indican los *spots* correspondientes a los tipos de RL; mono-ramnolípido y di-ramnolipidos descritos para *P. aeruginosa* PAOI por Laabei *et al.*, [2014].

4.4.7.8 Identificación de glicolípidos mediante espectroscopía de masa (MS)

Dentro de los diferentes tipos de glicolípidos producidos por microorganismos, el RL es el mayormente sintetizado por *P. aeruginosa*. Sin embargo, se ha descrito, en otras especies y géneros, bacterias productoras de RL pertenecientes la mayoría a dos géneros estrechamente relacionados: *Pseudomonas* y *Burkholderia* [Walter *et al.*, 2010].

Los dos tipos principales de RL sintetizados por bacterias son: los mono-ramnolípidos y los di-ramnolípidos. Sin embargo, existen más de 58 congéneres y homólogos de RL con diferentes combinaciones de cadenas de acilo saturadas e insaturadas y de moléculas de azúcar [Pereira *et al.*, 2012].

En base a lo expuesto, planteamos la hipótesis que el glicolípido sintetizado por *P. syringae* S5 podría pertenecer a la familia de los RL. Por lo tanto, para conocer la estructura de este glicolípido se realizaron análisis de espectrometría de masas (MS) para poder identificar los componentes presentes en las muestras, en base a la relación m/z característico de cada molécula. Para ello, se analizaron los extractos de BS obtenidos de diferentes cepas de *P. syringae* y de la cepa *P. aeruginosa* PAOI (como control positivo) para la detección de los picos de m/z ya definidos para los RL.

El análisis de los espectros de los iones $[M + Na]^+$ generados, se realizó considerando la carga del gas de colisión Na^+ (23Da). En el espectro resultante de la muestra perteneciente a *P. aeruginosa* PAOI (Figura 26) se detectó la presencia picos de un ion a m/z 673.3 correspondiente a di-ramnolípidos (RhaRha $C_{10}C_{10}$), y otro a m/z 527.3 del mono-ramnolípidos (Rha $C_{10}C_{10}$). Como se mencionó anteriormente, en la bibliografía se ha descrito a estos picos como característicos de los surfactantes producidos por cepas de *P. aeruginosa* analizados por MS [Pereira *et al.*, 2012].

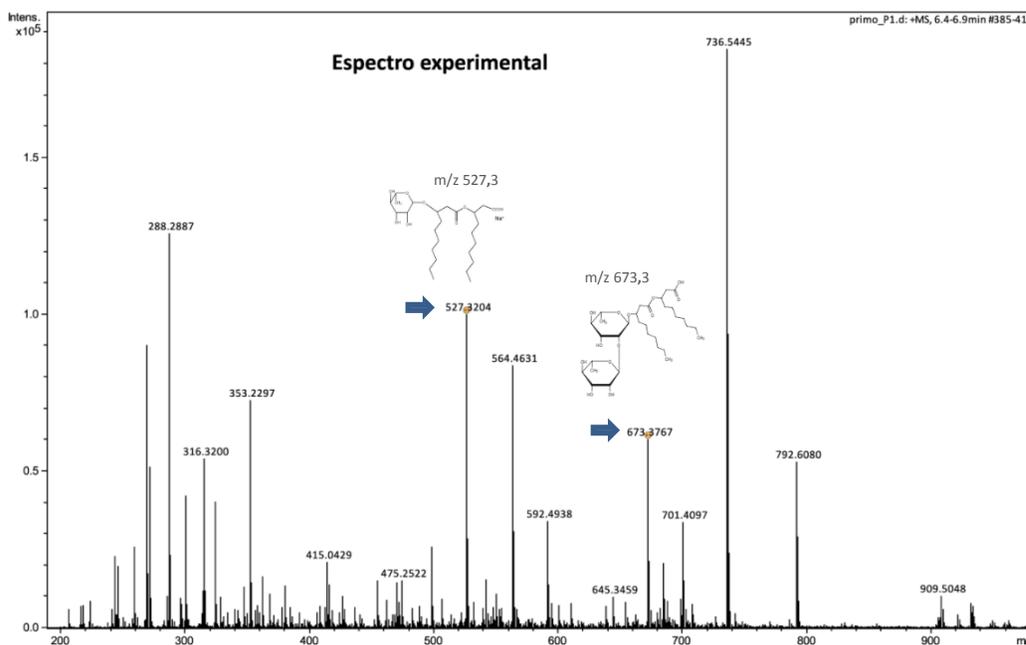
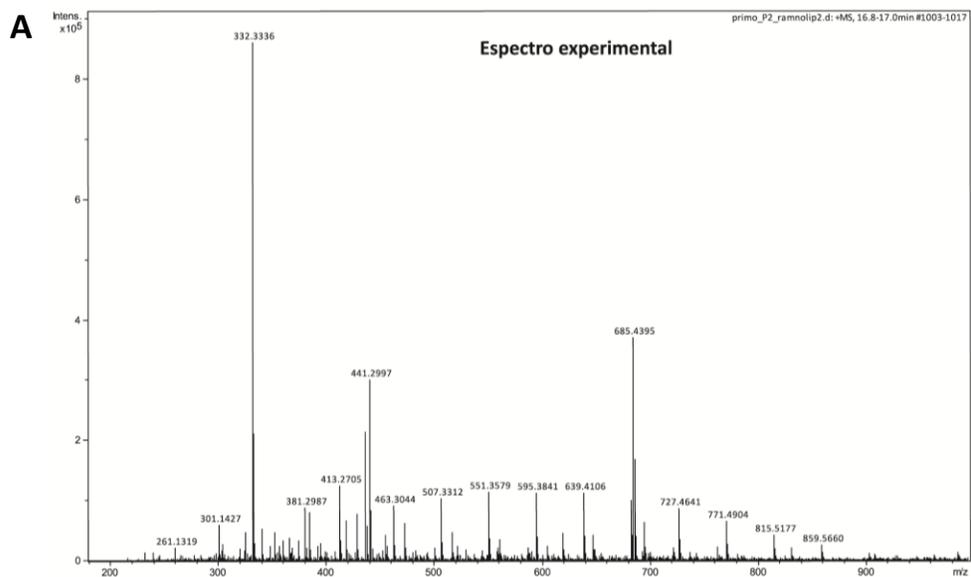


Figura 26: Espectro experimental del análisis MS ESI (+) Q-TOF inyección directa de los extractos de biosurfactantes obtenidos de la cepa *P. aeruginosa* PAOI. Las flechas azules indican los picos m/z 673.3 y m/z 527.3, correspondientes a los iones moleculares de los compuestos di-ramnolípido (RhaRhaC₁₀C₁₀) y mono-ramnolípido (RhaC₁₀C₁₀), respectivamente.

En el espectro obtenido para la cepa *P. syringae* S5 (Figura 27), solamente se observa un pico a m/z 527.3 correspondiente al mono-ramnolípido (Rha C₁₀C₁₀) pero debido a su baja intensidad (Figura 27B), éste, no sería un resultado concluyente para confirmar la producción de RL por parte de esta cepa. Por lo tanto, para identificar al compuesto BS sintetizado por *P. syringae* S5, es necesario realizar otros análisis donde se combine la espectrometría de masas tándem (MS/MS) con UPLC, lo cual ofrece una resolución de cromatografía líquida superior, y permite identificar y discriminar isómeros de glicolípidos con rendimientos muy altos [Smyth *et al.*, 2014]. Cabe mencionar que en muchos casos, no se ha logrado una determinación de la estructura de los RL, debido a su gran diversidad de congéneres [Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011].

Se analizó, también, la producción de BS de las cepas *P. syringae* pv. *syringae* B728a y *P. syringae* pv. *syringae* 61. Como resultado, en el espectro experimental obtenido para la cepa B728a (Figura 28) no se detectó la presencia de picos que se correspondan a iones

moleculares de los glicolípidos descritos en la bibliografía consultada. En cambio, en el espectro experimental de la muestra obtenida de *P. syringae* pv. *syringae* 61 se detectó la presencia de un pico a m/z 673.3 (Figura 29) que se corresponde al ión molecular del di-ramnolípido (RhaRhaC₁₀C₁₀). Es de destacar que la vía de síntesis de los RL indica que el mono-ramnolípido (RhaC₁₀C₁₀) es el precursor del di-ramnolípido RhaRhaC₁₀C₁₀., Por tanto, si el di-ramnolípido está presente, su homólogo y precursor el mono-ramnolípido también debería ser sintetizado por la bacteria y detectado. Este resultado se condice con los obtenidos para las cepas bacterianas *B. glumae* (anteriormente *Pseudomonas glumae*), *B. plantarii*, *B. pseudomallei* y *B. thailandensis*, en donde se detectó principalmente la producción de una especie de RL, Rha-RhaC14-C. Sin embargo, posteriormente nuevos estudios detectaron en *B. pseudomallei* y *B. thailandensis* otros congéneres de RLs [Dubeau *et al.*, 2009], incluyendo mono-RLs, principalmente el Rha-C14.



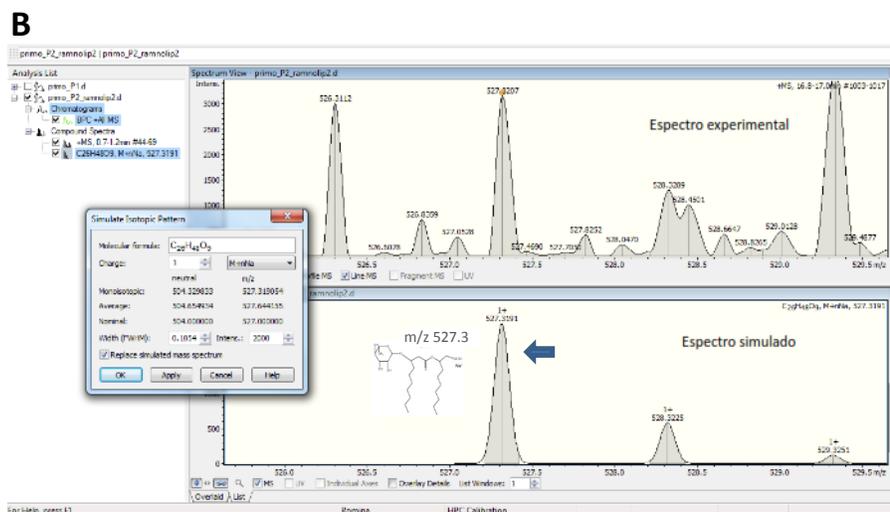


Figura 27: **A)** Espectro experimental del análisis MS ESI (+) Q-TOF inyección directa de los extractos de biosurfactantes obtenidos de la cepa *P. syringae* S5. **B)** Ampliación del espectro, debido a la baja intensidad del pico observado a m/z 527.3, señalado con la flecha azul, correspondientes al monorhamnólípido (RhaC₁₀C₁₀).

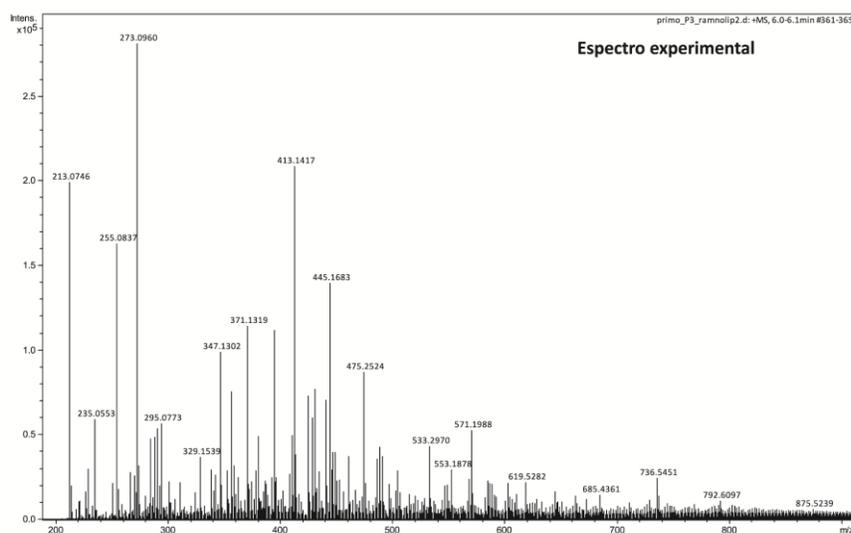


Figura 28: Espectro experimental del análisis MS ESI (+) Q-TOF inyección directa de los extractos de biosurfactantes obtenidos de la cepa *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Sin picos correspondientes a iones moleculares identificados.

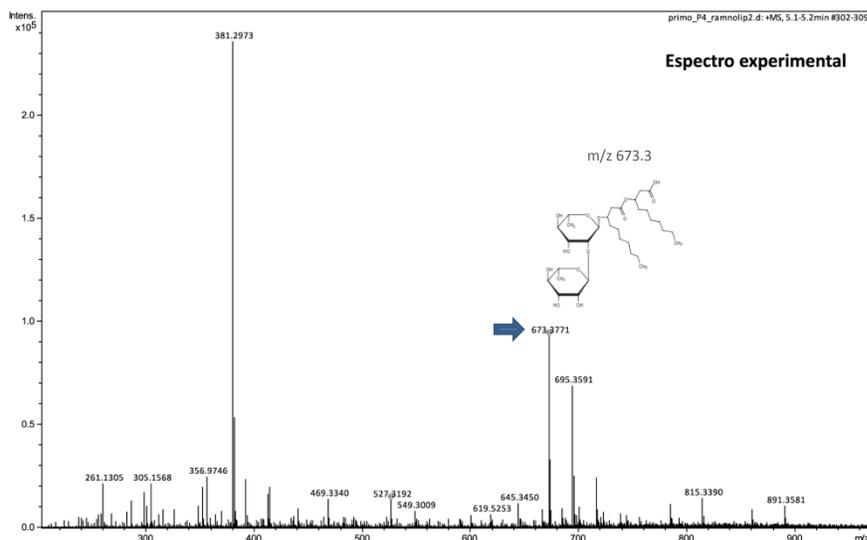


Figura 29: Espectro experimental del análisis MS ESI (+) Q-TOF inyección directa de los extractos de biosurfactantes obtenidos de la cepa *P. syringae* pv. *syringae* P61. La flecha azul indica el pico m/z 673.3, correspondientes al ión molecular de los compuestos di-ramnolípidos (RhaRhaC₁₀C₁₀).

4.4.7.9 Análisis bioinformático de los genes codificantes de la síntesis de ramnolípidos

En *P. aeruginosa* la porción lipídica y la glucídica de RL son sintetizadas de *novo*, siendo dTP-L-ramnosa (proveniente de la gluconeogénesis) y β -hidroxiácidos (procedentes de la síntesis de *novo* de ácidos grasos) los precursores de la biosíntesis. La parte hidrofóbica del glicolípidos incluye la acción de RhlA 3-(3-hidroxi-*alcanoil*oxi *alcanoato* sintetasa) que cataliza la transferencia de grupos β -hidroxi-*alcanoil* para dar lugar a los HAA (polihidroxi-*alcanoatos*) generalmente de diez átomos de carbono (Figura 30). Por otro lado, las enzimas involucradas en la síntesis de dTDP-L-ramnosa están codificadas por los genes *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* y *rmlD* en el operón *rmlBDAC* [Rahim *et al.*, 2000]. Posteriormente, se producen dos reacciones de glicosilación llevadas a cabo por dos ramnosiltransferasas específicas, RhlB (*ramnosiltransferasa* 1) y RhlC (*ramnosiltransferasa* 2) [Sánchez, 2010] (Figura 30).

Los resultados experimentales expresados anteriormente dieron indicios de que las cepas *P. syringae* pv. *syringae* P61 y posiblemente *P. syringae* S5, tienen la capacidad de

sintetizar glicolípidos, del tipo ramnolípido. Se realizó una búsqueda en la base de datos *Pseudomonas.com* de proteínas ortólogas a las que participan en la síntesis de ramnolípidos en bacterias del género *Pseudomonas*, como resultado se detectó la presencia de ortólogos para las enzimas RhlA, RhlB y RhlC, en diferentes especies del género excepto en la especie *P. syringae*. Por otro lado, en cepas de *P. syringae* se encontraron proteínas con $\approx 50\%$ de identidad con RhlA, descritas como *3-hydroxyacyl-CoA-ACP transferase*, (Anexo 1).

Proteínas ortólogas a las enzimas, RmlA, RmlB, RmlC y RmlD, involucradas en la síntesis de dTDP-L-ramnosa están presentes en diferentes cepas de *P. syringae*. Además, los genes codificantes tienen la misma organización y un entorno genético similar al de *P. aeruginosa* PAOI (ver Anexo 2).

En conclusión, el análisis bioinformático realizado demostró la presencia en diferentes cepas pertenecientes a la especie *P. syringae*, de la enzima *3-hydroxyacyl-CoA-ACP transferase* encargada de realizar la síntesis de HAA (polihidroxialcanoatos). Por lo tanto, la especie *P. syringae* presenta las enzimas necesarias para la síntesis de los precursores del ramnolípido, pero aún en esta especie bacteriana no se han descrito enzimas homólogas a RhlB y RhlC, necesarias para las reacciones de glicosilación que unen a dTDP-L-ramnosa con HAA que dan lugar a los RL. Sin embargo, se han encontrado enzimas con funciones glucosiltransferasa que podrían reemplazar las funciones de RhlB y RhlC en *P. syringae*.

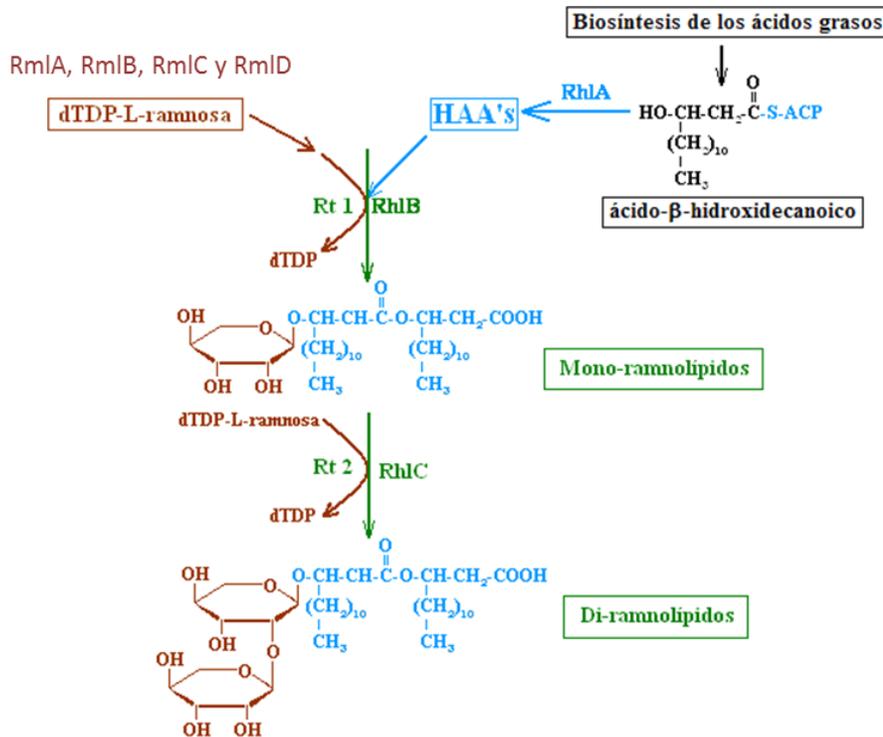


Figura 30: Ruta de biosíntesis de los ramnolípidos [Delgado, 2009].

4.4.8 Determinación del rango de huésped de la cepa *P. syringae* S5

Se realizaron ensayos de infección en diferentes tipos de cultivos de importancia agrícola para nuestra región a fin de determinar el rango de hospedadores que *P. syringae* S5 es capaz de infectar. Para ello se implementaron, dependiendo el tipo de plantas, diferentes técnicas de infección y metodologías para la detección del fitopatógeno luego del proceso infectivo.

En la Figura 31 se representa el ensayo de infección en hojas de soja (*Glycine max*) mediante las técnicas de hisopado en el envés de la hoja (Figura 31A) y por hoja desprendida mediante la generación de una lesión mecánica (Figura 31B), descritas en Materiales y Métodos. Como resultado se observa que la cepa *P. syringae* S5 y la cepa *P. syringae* pv. *glycinea* EM1 (control positivo) generaron una sintomatología típica con áreas necróticas de forma angulosa rodeadas por un halo clorótico en las zonas de la hoja donde se inocularon, independientemente de la técnica de infección utilizada.

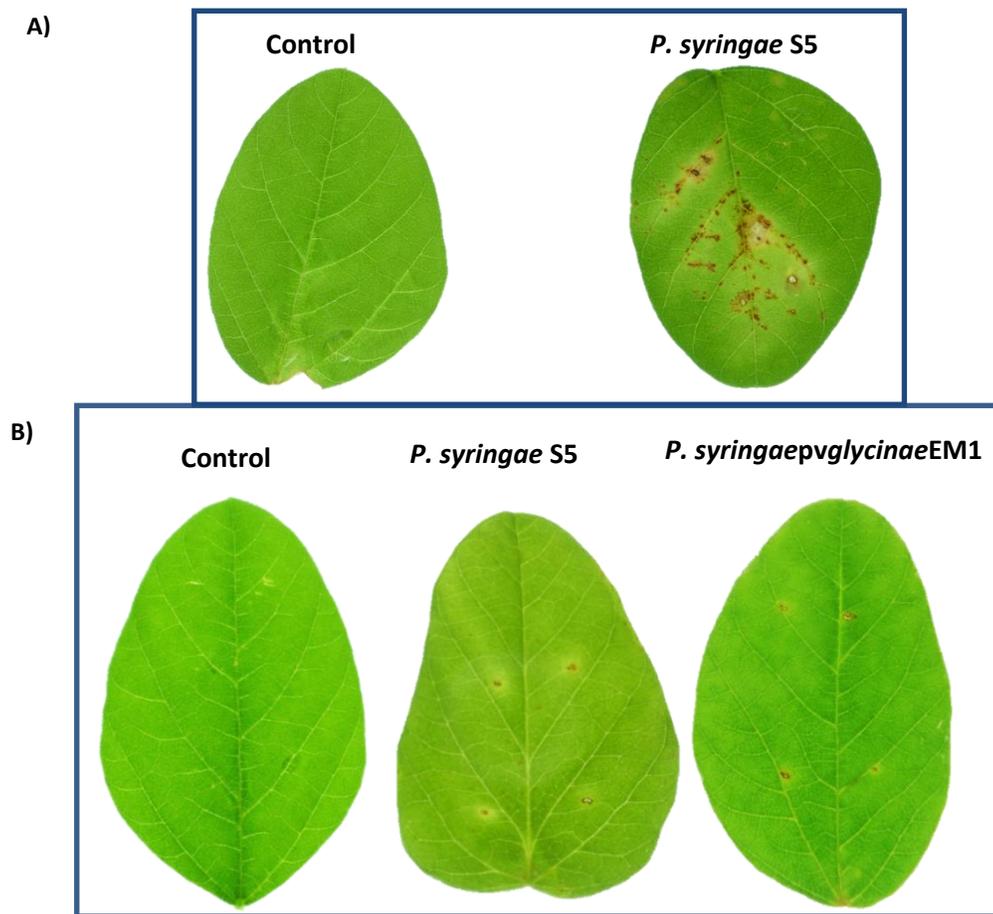
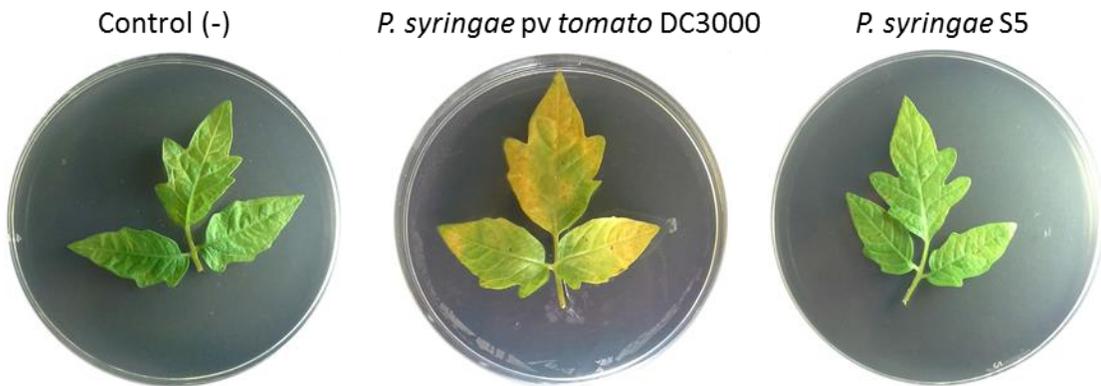


Figura 31: Sintomatología de infección en hojas de *Glycine max*, ensayos realizados mediante dos técnicas de infección con las cepas *P. syringae* S5 y *P. syringae* pv. *glyciniae* EM1. A) Imágenes de los signos de infección obtenidas a los 10 días de realizar el hisopado en el envés de la hoja con la cepa *P. syringae* S5. B) Imagen registrada a los 6 días luego de la inoculación mediante la generación de una lesión mecánica. En ambos ensayos se inoculó 10 μ l de la solución bacteriana de cada cepa señalada en la imagen ($1,4 \times 10^6$ UFC). El control se realizó inoculando 10 μ l de solución fisiológica. El experimento se repitió en cinco plantas diferentes para cada cepa, y se examinaron tres hojas por planta. n= 3.

En la Figura 32 se observan los ensayos realizados para determinar si la cepa S5 infecta uno de los cultivares de tomate mayormente utilizado en Argentina (*Lycopersicon esculentum* Mill cultivar (cv) *Platense*). Las hojas inoculadas con la cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 presentan una sintomatología típica localizada en las zonas donde se realizó la inoculación. Sin embargo, las hojas inoculadas con *P. syringae* S5 no presentaron signos de infección bacteriana, al igual que en las hojas inoculadas con solución fisiológica considerado

como control negativo. Para ambas técnicas, tanto para la generación de una lesión mecánica en hoja desprendida (Figura 32A) como para la aspersión del inoculo bacteriano (Figura 32B), se obtuvieron idénticos resultados.

A)



B)

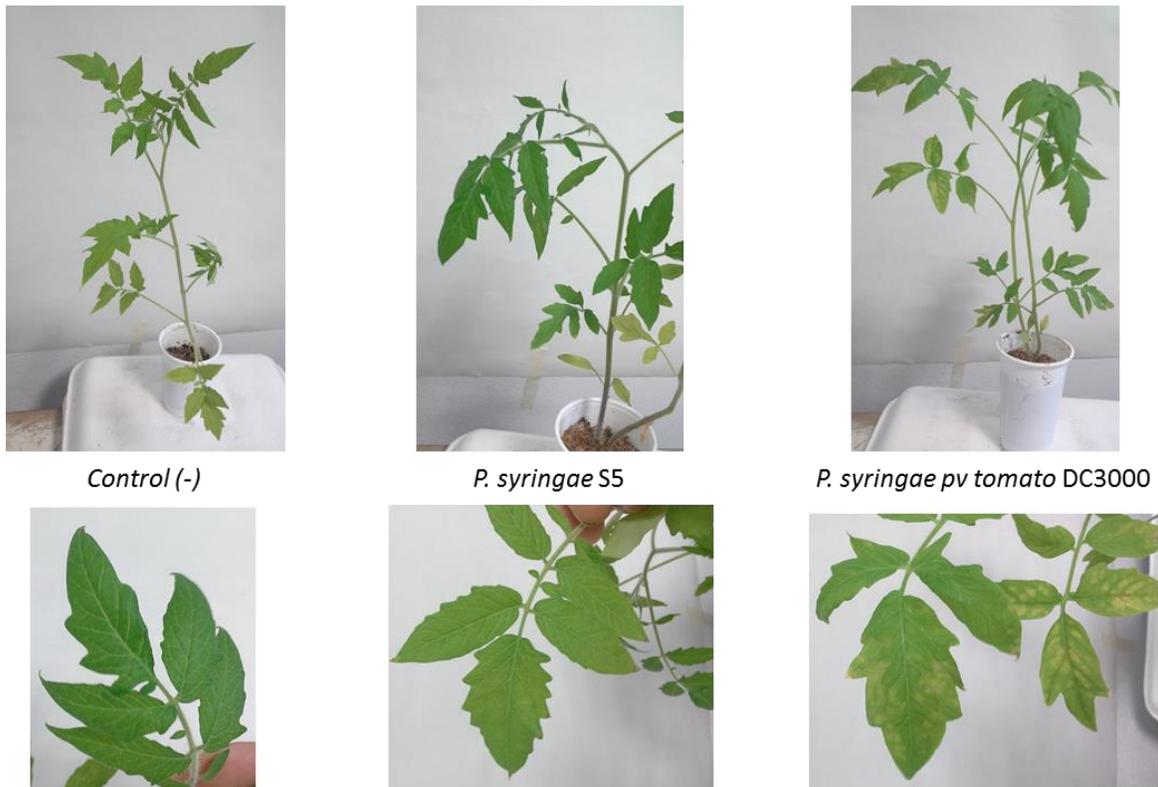


Figura 32: Signos de infección en plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill cv *Platense* obtenidas luego de la infección con *P. syringae* S5 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. El ensayo se realizó mediante las técnicas de: **A)** generación de una lesión mecánica de la hoja desprendida, y **B)** mediante la aspersión de la solución bacteriana en plantas cultivadas en macetas. En ambos métodos se inoculó a las hojas con una solución bacteriana de cada cepa ($1,8 \times 10^6$ UFC) y, con solución fisiológica para el control negativo. El experimento se repitió en cinco unidades de plantas u hojas diferentes para cada cepa.

A fin de facilitar la identificación del patógeno luego del periodo de infección, se procedió al marcaje de la cepa *P. syringae* S5 con la proteína verde fluorescente (o GFP, del inglés, *green fluorescent protein*) por inserción del gen *gfp* en el cromosoma bacteriano, para luego realizar un re-aislamiento e identificación de la cepa por microscopia de fluorescencia a partir de hojas con signos de infección bacteriana.

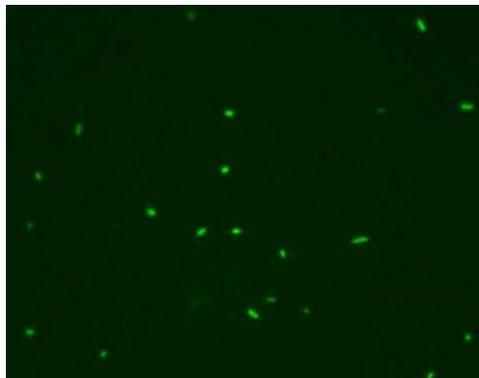
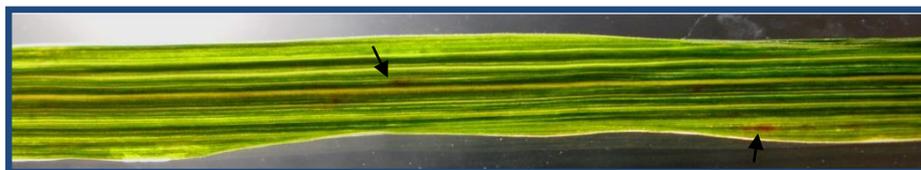


Figura 33: Microscopia de fluorescencia de un cultivo puro de *P. syringae* S5::gfp.

Para corroborar la capacidad infectiva de la cepa *P. syringae* S5::gfp y su detección mediante fluorescencia, se realizaron ensayos de inoculación en plantas de avena (hospedador original de la cepa en estudio). En la Figura 34A, se observa la presencia de signos de infección en la superficie de la hoja y, mediante microscopia de fluorescencia se observó la fluorescencia emitida por la proteína GFP sintetizada por la cepa *P. syringae* S5::gfp localizada dentro de la estructura de la hoja (Figura 34B).

A)



B)

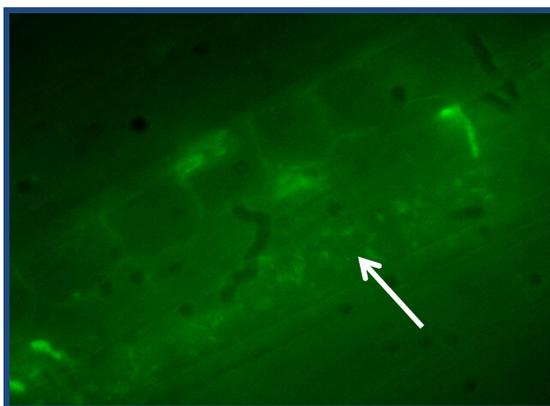


Figura 34: Imágenes de los ensayos realizados mediante la aspersión de la solución bacteriana de *P. syringae* S5::*gfp* ($1,8 \times 10^6$ UFC) en plantas de avena con 30 días de crecimiento en cámara de cultivo. **A)** Imagen de los signos de infección en la superficie de la hoja (flechas indicadoras); **B)** Imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia (amplificación de 100x).

Con la finalidad de conocer si la leguminosa *Arachis hypogaea* L. cv *Granoleico* (Maní) puede ser infectada por *P. syringae* S5, se realizó un ensayo de infección en plantas con la cepa *P. syringae* S5::*gfp*, para poder realizar un re-aislamiento e identificación de la cepa por microscopia de fluorescencia a partir de hojas con signos de infección bacteriana.

El ensayo de infección se realizó mediante la generación de una lesión mecánica en hojas de plantas de maní crecidas durante 45 días en cámara de cultivo. Luego de 6 días de la inoculación, se observó la presencia de una zona clorótica rodeando el sitio de infección (Figura 35). Posteriormente, y mediante microscopia de fluorescencia se detectó la presencia de fluorescencia emitida por GFP en la zona de inoculación en la superficie de las hojas (Figura 35B). Además, se extrajo el tejido vegetal próximo al sitio de infección y luego de un macerado se procedió a su visualización por microscopia de fluorescencia (Figura 35C). Esto evidencia que *P. syringae* S5::*gfp* puede colonizar y persistir en plantas de maní, infectando sus hojas.

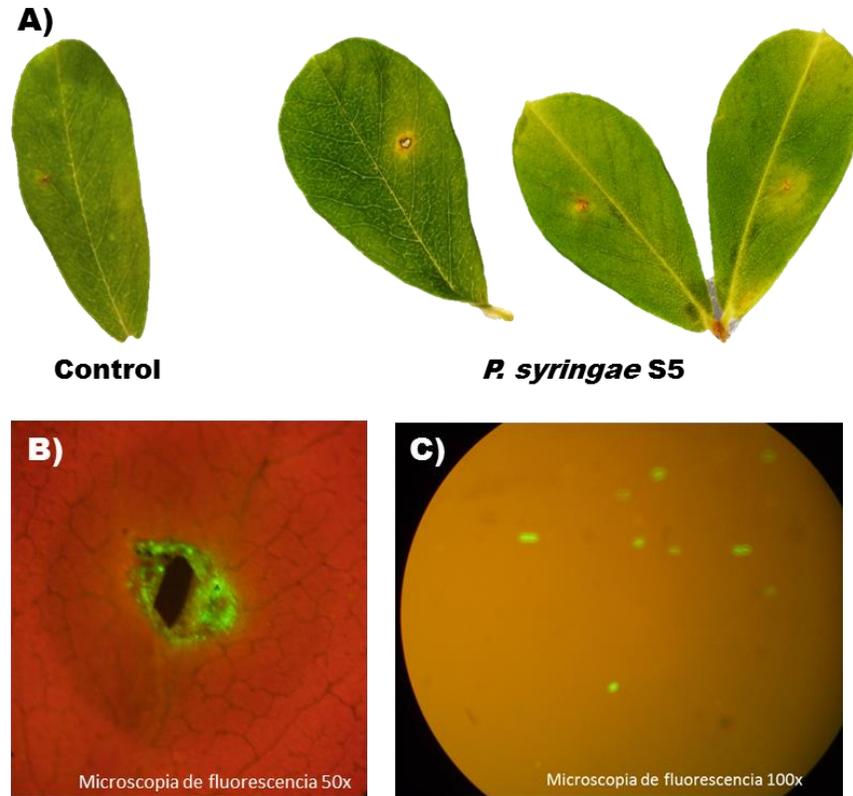


Figura 35: Ensayo de infección de *P. syringae* S5::*gfp* en hojas de *Arachis hypogaea* L. cv. *Granoleico* (maní). **A)** hojas de maní inoculadas, mediante la técnica de lesión mecánica, con 10 μ l de solución fisiológica (control negativo) o con una solución bacteriana de *P. syringae* S5::*gfp*. Imágenes de microscopia de fluorescencia; **B)** superficie de las hojas con una amplificación de 50x, y **C)** preparado fresco a partir del macerado del tejido infectado (amplificación de 100x). Imágenes registradas a los 6 días post infección. El experimento se repitió en cinco hojas diferentes para cada cepa.

La cepa *P. syringae* S5 aislada de un cultivar regional de avena, podría ser considerado como un fitopatógeno potencialmente agresivo ya que puede infectar otros cultivos de importancia agronómica de la región, como soja y maní. Esta capacidad de poder proliferar en diferentes hospederos, otorga una ventaja adaptativa, permitiendo al fitopatógeno tener una mayor perdurabilidad en el ambiente donde se encuentra.

Capítulo 5.

Colina y su relación con la producción de diferentes factores patogénicos.

5.1 Producción de tabtoxina en *P. syringae* S5

Como se menciona en el ítem 1.4, tabtoxina, cuyo mecanismo de acción es inhibir irreversiblemente a la enzima glutamina sintasa, se encuentra dentro del grupo de toxinas que son intensamente estudiadas en *P. syringae* y contribuyen de manera significativa a la bacteriosis en plantas.

En ensayos preliminares, se determinó que *P. syringae* S5 sintetiza tabtoxina mediante la detección de la actividad toxigénica (AT) realizando un ensayo de difusión en agar utilizando como microorganismo indicador a la cepa *E. coli* E1 como se detalla en Materiales y Métodos. Para corroborar que *E. coli* es inhibida por la toxina y no por otro compuesto, se realizó un control con el agregado de L-glutamina, aminoácido que revierte el efecto producido por tabtoxina (Figura 36).

Luego de determinar la producción de esta toxina por parte de la cepa S5, se realizaron experimentos a fin de determinar si colina incrementa la producción de esta toxina en la cepa S5, para ello se agregó, al ensayo de difusión en agar, colina como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de carbono. Al determinar la AT se observó que la presencia de colina como única fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MET, genera un aumento de aproximadamente el 55% en la producción de esta toxina en relación a lo encontrado cuando NH_4Cl es la fuente de nitrógeno (Figura 37). Además, en nuestro laboratorio, se ha observado que los derivados de colina tales como, betaína y dimetilglicina, inducen la AT con valores superiores (20% y 30%, respectivamente) a los encontrados en el cultivo control con NH_4Cl como fuente de nitrógeno [Gallarato *et al.*, 2012]. Es importante destacar que no sólo colina o sus metabolitos incrementan la producción de tabtoxina, ya que Messaadia y Harzallah [2011] han descrito que fructosa y glicerol como fuentes de carbono, incrementan la producción de tabtoxina en otro pv. de *P. syringae*, pv. *tabaci*.

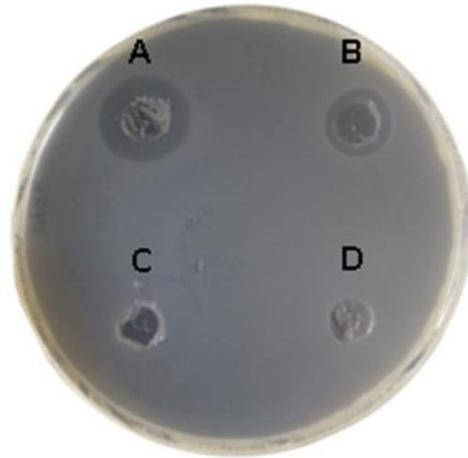


Figura 36: Detección de actividad toxigénica (AT) de tabtoxina mediante el ensayo difusión en agar utilizando *E. coli* E1 como microorganismo indicador. En los pocillos realizados en el agar se depositó 40µl de los sobrenadantes de cultivos de *P. syringae* S5 crecida en diferentes condiciones; **A:** sacarosa 20mM + colina 20mM; **B:** sacarosa 20mM + NH₄Cl 20mM; **C:** ídem A + L-glutamina 17µM; **D:** ídem B + L-glutamina 17µM.

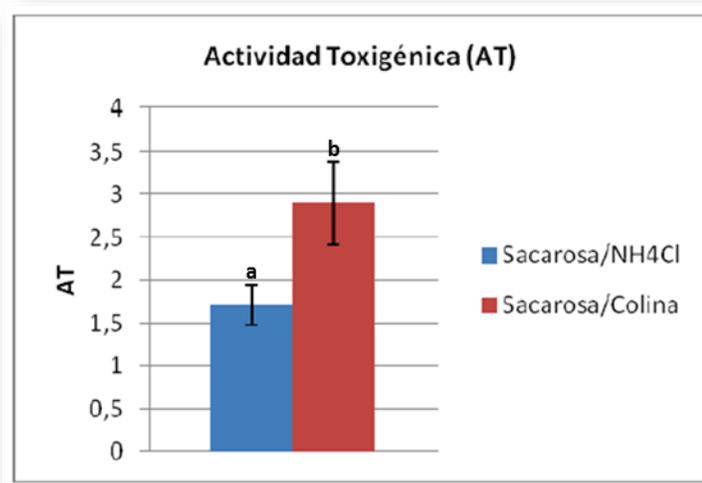


Figura 37: Actividad toxigénica (AT) de *P. syringae* S5 cultivada durante 72 hs con sacarosa como fuente de carbono y dos fuentes de nitrógeno diferentes, amonio y colina. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones realizadas en ensayos independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

5.1.2 Expresión génica del operón de tabtoxina

En base a los resultados citados anteriormente donde la AT de tabtoxina es inducida por algunas fuentes de carbono y nitrógeno, se propuso estudiar la expresión génica de tabtoxina en *P. syringae* S5 en presencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Para ello, se utilizó el gen reportero *lacZ* en una fusión transcripcional, empleando el plásmido suicida pUC18-mini-Tn7T-Gm-*lacZ* [Choi *et al.*, 2006]. Este plásmido permite la introducción del mini-Tn7 en el cromosoma de la cepa en estudio, en una posición específica.

Debido a que la biosíntesis de esta fitotoxina se realiza mediante un complejo enzimático codificado por un operón, en principio se trabajó con el promotor del gen *tabC* ubicado corriente arriba de dicho operón. Luego de obtener la construcción génica fusionando el promotor del gen *tabC* al plásmido suicida, mediante el empleo de diferentes protocolos de electroporación y conjugación no fue posible obtener la recombinación del vector en el genoma de *P. syringae* S5. Es por ello que no se llevó a cabo el objetivo de determinar la expresión del gen *tabC* en diferentes condiciones nutricionales. Una problemática similar, ha sido descrita en la bibliografía consultada [Bretz, 2004]. Estos estudios describen resultados negativos al intentar obtener mutantes por inserción. No está claro por qué dichas estrategias de mutación pudieron concretarse, pero existen evidencias que sugieren que las mutaciones que implican la recombinación homóloga en *P. syringae* pv. *syringae* DC3000 son dificultosas de obtener [Bretz, 2004].

5.3 Influencia de la fuente de nitrógeno y de carbono en la producción de tabtoxina, y su relación con la actividad proteasa.

La síntesis de tabtoxina consta de un precursor inactivo que se activa por acción de peptidasas (metaloproteasas). En base a lo expuesto se propuso que el incremento de la AT de tabtoxina determinado en presencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, podría relacionarse con un aumento en la actividad de proteasas bacterianas.

Por lo tanto, se determinó la influencia de las fuentes de carbono (fructosa y glicerol) y nitrógeno (colina), sobre la actividad de tabtoxina y de proteasas en la cepa *P. syringae* S5 en fase estacionaria. La síntesis de tabtoxina, al igual que la mayoría de la producción de metabolitos secundarios, ocurre en dicha fase de crecimiento [Bender *et al.*, 1999]. Se

cuantificó AT de tabtoxina y la actividad proteolítica en muestras de sobrenadante de ambos cultivos extraídos a las 48 y 72 hs de crecimiento, tal como se describe en Materiales y Métodos.

5.3.1 Determinación de AT y actividad proteasa en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.

La cepa *P. syringae* S5, se cultivó en el medio MET con sacarosa (fuente preferencial de carbono) y colina (alternativa) o NH₄Cl (preferencial) como fuentes de nitrógeno. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 8, y concuerdan con los resultados previos donde la AT está incrementada cuando la cepa *P. syringae* S5 crece con colina como fuente de nitrógeno, en comparación a los cultivos con NH₄Cl. Sin embargo, la actividad proteasa expresada como unidades de azocaseína, no se incrementa en presencia de colina respecto a la presencia de NH₄Cl en el medio. Es de destacar que el valor de actividad proteasa fue de un 10% en cultivos con colina con respecto al control sacarosa/NH₄Cl.

Por lo tanto, podemos concluir que el aumento de la AT no está relacionado con un incremento de la actividad proteolítica al menos en la cepa de estudio *P. syringae* S5 y en el medio de cultivo sacarosa/colina. La actividad proteasa se expresa en condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo (fuente preferencial de C y de nitrógeno) y se inhibe cuando la fuente de nitrógeno no es la preferencial.

Tabla 8. Actividad toxigénica y cuantificación de actividad proteasa en cultivos de *P. syringae* S5 crecidos con colina o NH₄Cl (20mM), como fuentes de nitrógeno. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones realizadas en ensayos independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Las letras diferentes en la tabla indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

Fuente de Carbono y Nitrógeno	DO _{600nm} \pm DS		AT		Unidades de azocaseína/ μ l	
	48 hs	72 hs	48 hs	72 hs	48 hs	72 hs
Sacarosa/ NH ₄ Cl	1,78 \pm 0,09	1,74 \pm 0,11	0,65 \pm 0,18 (a)	0,86 \pm 0,09 (a)	0,40 \pm 0,02 (a)	0,45 \pm 0,02 (a)
Sacarosa/colina	1,79 \pm 0,09	1,91 \pm 0,04	1,15 \pm 0,14 (b)	1,35 \pm 0,12 (b)	0,04 \pm 0,02 (b)	0,06 \pm 0,01 (b)

5.3.2 Determinación de AT y actividad proteasa en presencia de diferentes fuentes de carbono.

La cepa *P. syringae* S5, se cultivó en el medio MET con la adición de diferentes fuentes de carbono. En la Tabla 9, se observa un incremento de la AT del $\approx 40\%$ en fructosa/ NH_4Cl , en relación con la actividad obtenida en el medio con la fuente preferencial de carbono (sacarosa/ NH_4Cl). Se obtuvieron AT similares entre los cultivos de glicerol/ NH_4Cl y sacarosa/ NH_4Cl (Figura 38). Además, en la condición fructosa/ NH_4Cl , la AT determinada a las 72 hs de cultivo fue mayor que a las 48 hs. Esto concuerda con lo descrito por Messaadia y Harzallah [2011] para *P. syringae* pv. *tabaci*. Sin embargo, no se observa una diferencia en la actividad proteolítica, expresada como unidades de azocaseína. Por lo que concluimos que no existe relación directa entre el aumento de la AT y la actividad proteolítica en los cultivos de fructosa/ NH_4Cl , de manera similar a lo determinado en colina/sacarosa (Tabla 8).

En resumen, colina y fructosa como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, incrementan la AT, pero no influyen en la actividad proteasa. Por lo tanto, el efecto de estos nutrientes sobre el aumento de la AT de tabtoxina podría estar relacionado a nivel transcripcional mediante la regulación de la expresión del operón de tabtoxina. Dicha regulación a su vez, estaría regulada por reguladores transcripcionales vinculados al metabolismo de carbono y nitrógeno, tales como los sistemas de dos componentes NtrB/NtrC y/o CbrB/CbrC. Mientras que, la actividad proteasa sería independiente de estos sistemas.

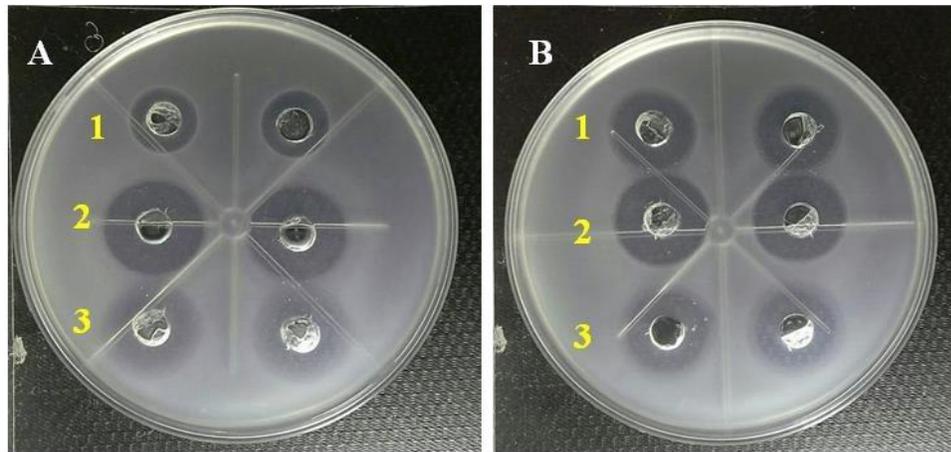


Figura 38. Imagen representativa de los ensayos realizados para determinar la influencia de diferentes fuentes de carbono en la producción de tabtoquina. A) Producción de tabtoquina a 48 hs y B) 72 hs de incubación. Halo de inhibición obtenido alrededor de los pocillos con sobrenadante del cultivo de: **1)** sacarosa/ NH_4Cl , **2)** Glicerol/ NH_4Cl y **3)** fructosa/ NH_4Cl .

Tabla 9. Actividad toxigénica y cuantificación de actividad proteasa en cultivos de *P. syringae* S5 en presencia de las fuentes de carbono indicadas. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones realizadas en ensayos independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Las letras diferentes en la tabla indican que las diferencias son estadísticamente significativas.

Fuente de Carbono y Nitrógeno	$\text{DO}_{600\text{nm}} \pm \text{DS}$		AT		Unidades de azocaseína/ μl	
	48 hs	72 hs	48 hs	72 hs	48 hs	72 hs
Sacarosa/NH_4Cl	$1,78 \pm 0,09$	$1,74 \pm 0,11$	$0,65 \pm 0,17$ (a)	$0,86 \pm 0,09$ (a)	$0,40 \pm 0,02$ (a)	$0,45 \pm 0,02$ (b)
Glicerol/NH_4Cl	$2,03 \pm 0,14$	$2,22 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,15$ (a)	$0,68 \pm 0,13$ (b)	$0,57 \pm 0,06$ (b)	$0,50 \pm 0,03$ (b)
Fructosa/NH_4Cl	$1,20 \pm 0,1$	$1,28 \pm 0,14$	$0,72 \pm 0,13$ (a)	$1,26 \pm 0,10$ (c)	$0,66 \pm 0,03$ (b)	$0,53 \pm 0,04$ (b)

Los resultados indican que *P. syringae* S5 presenta una mayor AT de tabtoxina con fructosa como fuente de carbono en comparación a la actividad obtenida con la fuente preferencial, sacarosa.

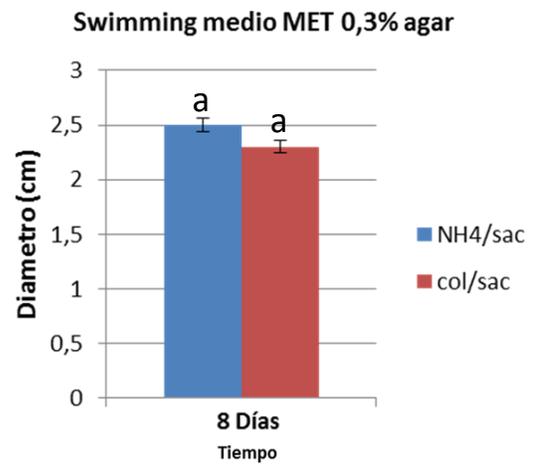
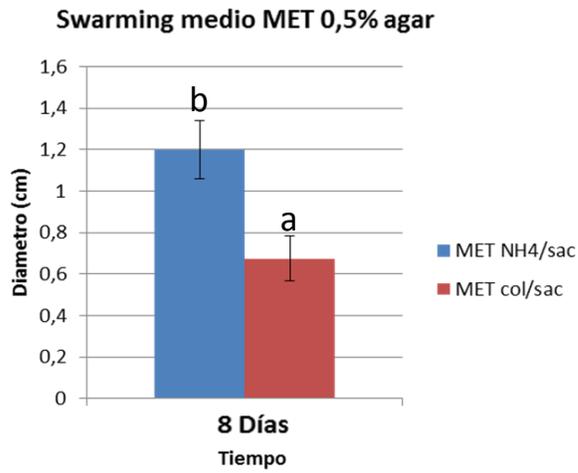
5.4 Movilidad bacteriana

Para estudiar el efecto de colina sobre la movilidad tipo *swarming* y/o *swimming* en *P. syringae* S5 se realizaron ensayos en medios de cultivo MET suplementado con sacarosa y colina (fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente) o sacarosa y NH₄Cl. Siendo NH₄Cl una fuente preferencial de nitrógeno, se considera a estos cultivos como control o de referencia de la movilidad. Además de la cepa *P. syringae* S5, se incorporó a modo comparativo la cepa de referencia *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

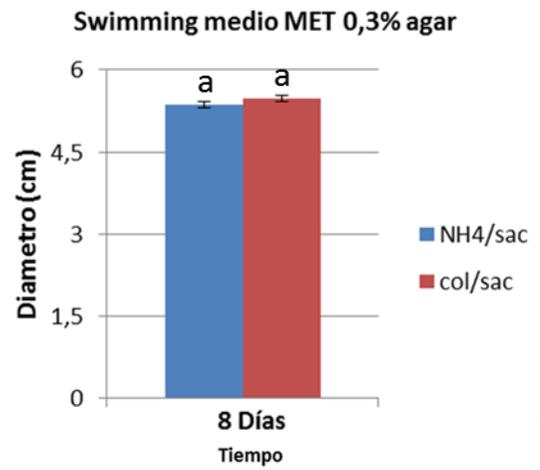
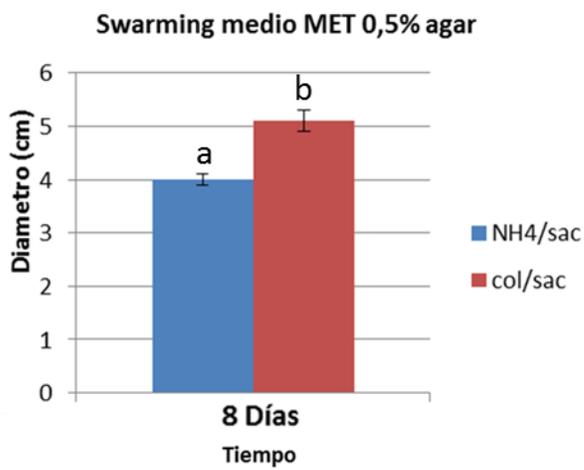
La movilidad tipo *swarming* y *swimming* en *P. syringae* S5 no es estimulada en presencia de colina, siendo aún menor a la movilidad detectada en presencia NH₄Cl. Sin embargo, la cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 presentó un aumento de aproximadamente un 30% en la movilidad *swarming* cuando colina es la fuente de nitrógeno. La movilidad tipo *swimming* no manifiesta diferencias significativas al modificar la fuente de nitrógeno (Figura 39).

En base a estos resultados podemos concluir que colina como única fuente de nitrógeno no influye en la movilidad *swarming* o *swimming* de la cepa *P. syringae* S5, mientras que, el *swarming* de la cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 se incrementa en presencia de este compuesto de amonio cuaternario.

A)



B)



c)

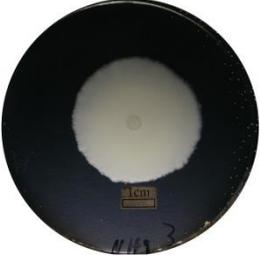
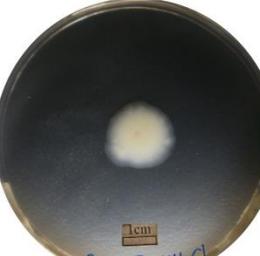
Cepa	Fuente de Nitrógeno	Swarming	Swimming
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	NH ₄ Cl		
	Colina		
<i>P. syringae</i> S5	NH ₄ Cl		
	Colina		

Figura 39: Medición de la movilidad tipo *swarming* y *swimming* en dos patovares de *P. syringae*, en presencia de diferentes fuentes nitrogenadas. **A)** *P. syringae* S5. **B)** *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Para ambos tipos de movilidad se utilizó el medio MET/agar 0.5% y 0,3% p/v, respectivamente. Las placas se cultivaron a 30°C durante 8 días y luego se cuantificó el diámetro de movilidad. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes. ANOVA, test LSD Fisher, $p < 0,05$. Las letras diferentes en las barras indican que las diferencias son estadísticamente significativas. **C)** Imágenes representativas de los tipos de movilidad ensayados en las diferentes condiciones para cada cepa.

5.5 Cuantificación de glicolípidos producidos en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.

En *P. aeruginosa* se ha estudiado que la expresión de los genes implicados en la síntesis de glicolípidos es regulada por dos sistemas de *quorum sensing*, los cuales se activan cuando *P. aeruginosa* crece en condiciones de limitación de fosfato o de nitrógeno [Medina *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2010]. Además, se conoce que el metabolismo de colina en *P. aeruginosa* [Massimelli *et al.*, 2011] está regulado por el sistema de dos componentes NtrB/C responsable de la regulación de genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno. Por lo tanto, fue de nuestro interés conocer si la síntesis de glicolípidos en la cepa S5 es regulada de manera análoga a *P. aeruginosa* bajo condiciones de limitación de fosfato o en presencia de fuentes alternativas de nitrógeno.

En este trabajo se procedió a la extracción, purificación y a la cuantificación de los glicolípidos producidos por la cepa *P. syringae* S5 en un medio basal mínimo suplementado con diferentes compuestos considerados como fuentes limitantes de nitrógeno: colina y sus derivados metabólicos, betaína y dimetilglicina (DMG); y diferentes tipos de aminoácidos como lisina, alanina y arginina. Para las condiciones de limitación de fosfato se empleó el medio mineral mínimo con bajo y alto contenido de Pi descrito como LPi-BSM y HPi-BSM, respectivamente [Lucchesi *et al.*, 1989], y con las fuentes preferenciales de nitrógeno y carbono.

La cuantificación de los glicolípidos se realizó utilizando la metodología de reacción del orcinol descrita en Materiales y Métodos. La concentración de glicolípidos obtenidos en las diferentes condiciones de cultivo se expresó en $\mu\text{g/ml}$ de glicolípidos sintetizados por mg de biomasa bacteriana.

En la Tabla 10 se observa que la síntesis de glicolípidos en la cepa *P. syringae* S5, se incrementa cuando en el medio de cultivo contiene fuentes no preferenciales de nitrógeno como colina, sus derivados metabólicos o aminoácidos. Siendo lisina y DMG las fuentes de nitrógeno que incrementaron la mayor producción del glicolípido. La producción de glicolípidos también fue mayor en condiciones limitantes de fosfato presente en el medio de cultivo (Tabla 11). Por lo tanto, se plantea como hipótesis que el sistema de regulación que interviene en la síntesis de estos glicolípidos, en la cepa S5, es afectado por la disponibilidad de nitrógeno o fosfato, al igual a lo descrito para *P. aeruginosa* [Medina *et al.*, 2003].

Tabla 10: Síntesis de glicolípidos en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. La cepa *P. syringae* S5 creció en un medio mineral mínimo/sacarosa suplementado con colina, betaína, dimetilglicina (DMG), lisina, alanina y arginina como fuentes de nitrógeno (10mM). Las concentraciones del glicolípidos se expresaron: $\mu\text{g/ml}$ de glicolípidos sintetizados/mg de biomasa bacteriana. El gráfico de la izquierda representa el incremento relativo de glicolípidos sintetizados en relación a lo detectado en NH_4Cl , considerando este valor como 1. Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes.

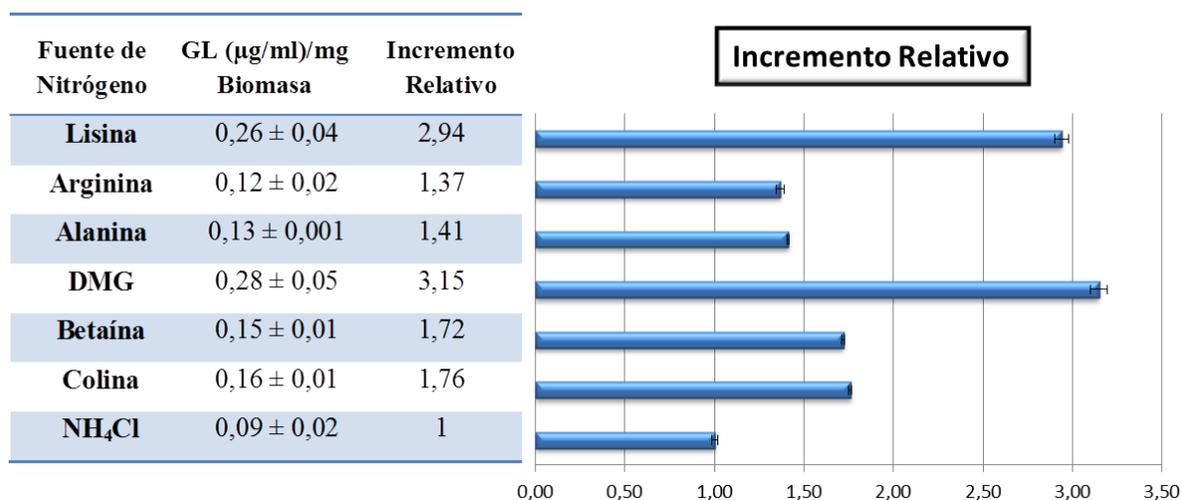
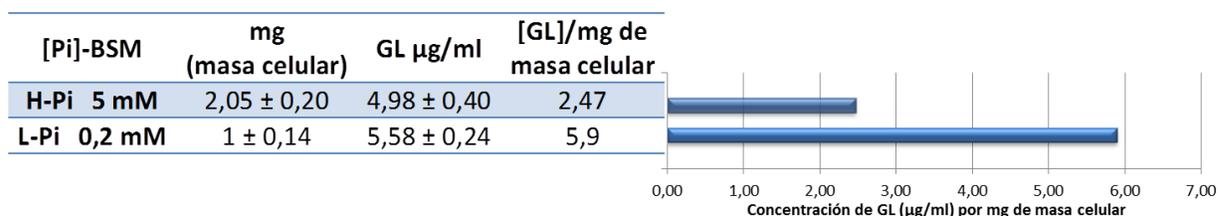


Tabla 11: Síntesis de glicolípidos variando las condiciones de disponibilidad de fosfato. La cepa *P. syringae* S5 creció en un medio mineral basal (BSM) con sacarosa/ NH_4Cl 20mM, suplementado con alta concentración de fosfato (H-Pi) 5mM y bajo fosfato (L-Pi). Los datos se corresponden a la media \pm SD de 3 repeticiones independientes.



5.6 Colina y fosforilcolina fosfatasa (PchP), su relación con la patogénesis en *P. syringae*.

Colina, como se menciona en el ítem 1.5, proporciona un beneficio nutricional y energético durante la colonización y el establecimiento en el hospedador. Esto es aplicable tanto al patógeno humano, *P. aeruginosa*, como al vegetal, *P. syringae* [Wargo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013]. En nuestro laboratorio se describió que la utilización de colina por parte de *P. aeruginosa*, como fuente de carbono y nitrógeno, es responsable de la inducción de diferentes enzimas y proteínas, luego, se relacionó a colina con la patogénesis producida por esta bacteria [Lisa *et al.*, 1994b; Diab *et al.*, 2006]. Así, la cepa *P. aeruginosa* PAOI induce, entre otras, tres enzimas en presencia de colina: acetilcolinesterasa (AChE) [Domenech *et al.*, 1991], fosfolipasa C hemolítica (PlcH) [Lucchesi *et al.*, 1989] y fosforilcolina fosfatasa (PChP) [Lisa *et al.*, 1983,1994b, 2007].

En nuestro grupo de trabajo se ha realizado una caracterización parcial de la actividad PchP de diferentes cepas dentro del género *Pseudomonas*: *P. aeruginosa* PAOI, *P. protegens* Pf-5, *P. putida* KT2440 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 [Beassoni, 2006; Kilmurray, 2012]. La actividad enzimática más estudiada es la PchP de *P. aeruginosa* PAOI [Otero *et al.*, 2011, Beassoni *et al.*, 2011; Infantes *et al.*, 2012]. El gen *pchP* está altamente conservado en el grupo de *Pseudomonas* y PchP se ha descrito como una enzima dependiente de Mg⁺⁺ con actividad frente al sustrato artificial *p*-NPP, y con un pH óptimo de 5.0, razón por la cual se la definió, en un principio, como fosfatasa ácida [Lisa *et al.*, 1983; Beassoni, 2006].

La enzima PchP de *P. aeruginosa* se diferenció de otras fosfatasa ácidas al presentar inhibición por altas concentraciones de sustrato, fosforilcolina (PCh), siendo esto una característica distintiva que permitió la identificación de la actividad PchP en extractos periplásmicos de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 [Beassoni, 2006].

A su vez, en nuestro laboratorio, demostramos que en presencia de colina *P. syringae* S5 presenta actividad PchP [Gallarato *et al.*, 2012], lo que permitiría la obtención de fósforo y colina a partir de PCh, metabolito presente en el apoplasto vegetal [McNeil *et al.*, 2000]. Debido a que PchP presenta actividad en un amplio rango de pH [Domenech *et al.*, 1991] la presencia de esta enzima sería una ventaja para la bacteria cuando el pH del apoplasto disminuye tal como ocurre en plantas en situaciones de estrés [Netting, 2002]. Cabe destacar

que en estas circunstancias no se detecta actividad fosfatasa alcalina (AlkPasa). Por lo tanto, la bacteria mediante PchP obtiene fósforo del medio, aunque AlkPasa este inhibida. De estemodo colina, mediante la inducción de PchP, podría también contribuir a la virulencia de *P. syringae* S5, permitiendo a la bacteria acceder a nutrientes necesarios para el crecimiento y tolerar condiciones de estrés osmótico.

De acuerdo a la hipótesis planteada en esta tesis, y al demostrar que colina presente en el medio de cultivo como única fuente de nitrógeno incrementa la expresión de algunos factores de patogenicidad descritos en este trabajo, concluimos que la utilización de este compuesto de amonio cuaternario por parte de *P. syringae* brinda ventajas durante el proceso de colonización e infección en la planta hospedadora. En la Figura 40 se observa un esquema que representa la incorporación de colina durante la interacción planta-microorganismo, y como la adquisición de este compuesto influye sobre *P. syringae*.

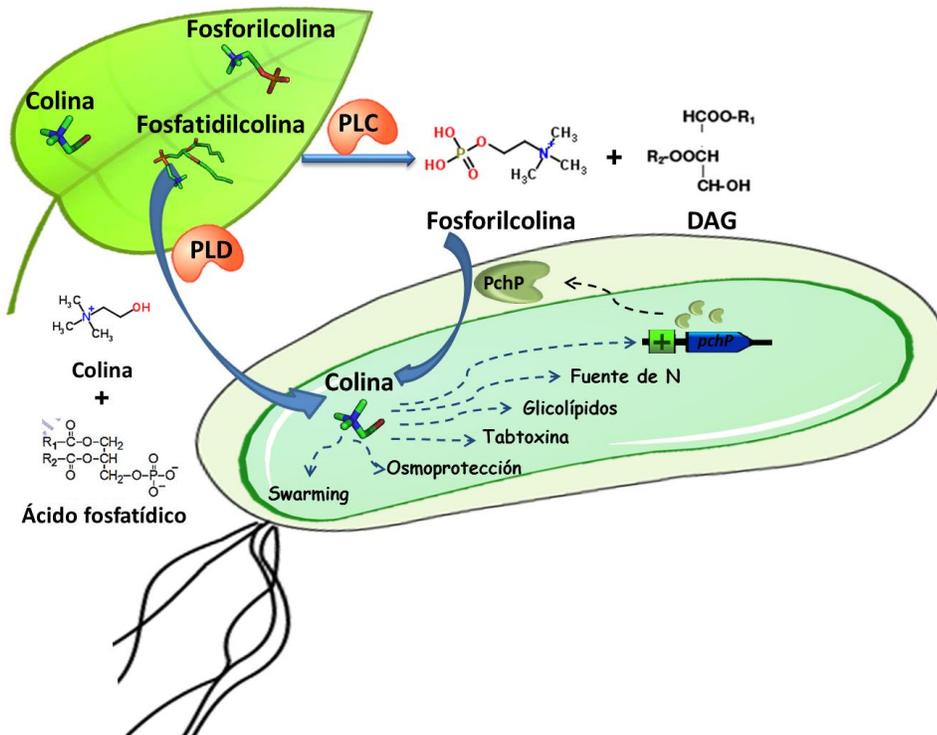


Figura 40: Incorporación de colina durante la interacción planta-microorganismo, y su función en *P. syringae*. En los tejidos vegetales colina se encuentra como tal o formando parte de moléculas como fosforilcolina, fosfatidilcolina o acetilcolina [Miura y Shih, 1984]. Fosfolipasas presentes en la

planta (PLD y PLC) catalizan la hidrólisis de fosfatidilcolina, a su vez PchP presente en el periplasma bacteriano cataliza la hidrólisis de fosforilcolina liberando colina y fosfato. En *P. syringae* colina puede ser oxidada a betaína, poderoso osmoprotector o utilizada como fuente de energía para el crecimiento. Además, colina genera un incremento de la actividad toxigénica de tabtoxina, de la movilidad tipo *swarming*, y la síntesis de glicolípidos.

Capítulo 6

Conclusiones

- La cepa fluorescente S5, aislada en nuestra región desde hojas de avena, fue clasificada en base al esquema LOPAT como una bacteria fitopatógena perteneciente a la especie *P. syringae*. Mediante análisis filogenético, realizado a partir de la secuenciación y análisis bioinformático del gen ARNr 16S, se observó que S5 presenta una mayor relación filogenética con la cepa *P. syringae* pv. *atropurpurea*.

-El análisis de BOX-PCR permitió conocer diversidad genómica entre las cepas estudiadas. Encontrándose una gran similitud entre la cepa S5 aislada de avena, con la cepa de referencia *P. syringae* 61 aislada de trigo y dos cepas aisladas en nuestra región desde plantas de soja, *P. syringae* A5 y *P. syringae* EM1.

- En la cepa *P. syringae* S5 se detectó la producción de diferentes factores que favorecen la virulencia tales como: movilidad (*swarming* y *swimming*), acil homoserin lactonas de cadena larga, biosurfactantes, proteasas, biofilm y fitotoxina (tabtoxina).

- La actividad toxigénica de tabtoxina se incrementa en *P. syringae* S5 cuando colina es fuente de nitrógeno. También, la presencia de fructosa como fuente de carbono, incrementa dicha actividad. La activación de tabtoxina en presencia de estos compuestos no está relacionada con el incremento de la actividad proteasa, si no, a un aumento en la biosíntesis del precursor de la toxina.

- El crecimiento del hongo *G. candidum* es inhibido por glicolípidos secretados por *P. syringae* S5. Se descarta la inhibición por siringomicina ya que los genes *syrB* y *syrD* no fueron detectados. Por lo tanto, es importante destacar que la técnica microbiológica de detección de siringomicina descrita por Grossy De Vay [1977], no es específica para la detección de dicha toxina, informando en algunos casos falsos positivos.

- Los glicolípidos sintetizados por *P. syringae* S5 se incrementan cuando el medio de cultivo contiene fuentes no preferenciales de nitrógeno tales como aminoácidos o colina (y sus derivados metabólicos). Lisina y dimetilglicina incrementaron la mayor producción de glicolípidos.

- La cepa *P. syringae* S5 aislada de un cultivar regional de avena, puede infectar otros cultivos de importancia agronómica de la región, como soja y maní. Esta capacidad de poder proliferar en diferentes hospederos, otorga una ventaja adaptativa permitiendo al fitopatógeno tener una mayor perdurabilidad en el ambiente donde se encuentra.

Bibliografía

Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Le F, De E, Markus MM. (2011). Rhamnolipids : Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. *Microbiology Monographs* 20:13-55

Abdel-Mawgoud AM, Le´pine F, Deziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins, and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1323–1336

Achouak W, Thierry JM, Rouband P, Heulin T. (2000). Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiol.* 31:11-19.

Achtman M. (2008). Evolution, population structure and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 62:53–70.

Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Álvarez E, Soares A, Marques dos A, Iglesias A. (2006). Patogenicidad y diversidad genética de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaco* aislada de *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus* y *Glycine max* en Brasil. *Rev Protección Veg.* 21:16-21.

Anzai Y, Kim H, Park J-P, Wakabayashi H, Oyaizu H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on *16S rRNA* sequence. *Int J Sys Evol Microbiol.* 50:1563-89.

Arrebola E, Cazorla FM, Romero D, Pérez-García A, de Vicente, A. (2007). A nonribosomal peptide synthetase gene (*mgoA*) of *P. syringae* pv. *syringae* is involved in mangotoxin biosynthesis and is required for full virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, 20: 500-509.

Arrebola E, Cazorla FM, Perez-García A, de Vicente A. (2011). Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins* 3: 1089-1110.

Beattie GA, Lindow SE. (1999). Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology* 89:353-359.

Beassoni PR. (2006). Relación entre estructura y función de la fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias del género *Pseudomonas*. Tesis Doctoral.

Beassoni PR, Otero LH, Boetsch C, Domenech CE, Gonzalez-Nilo FD, Lisa AT. (2011). Sitedirected mutations and kinetic studies show key residues involved in alkylammonium interactions and reveal two sites for phosphorylcholine in *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase. *Biochim Biophys Acta: Proteins and Proteomics* 1814:858-863.

- Bender CL, Alarón-Chaidez F, Gross DC.** (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 266-292.
- Bennasar A, Mulet M, Lalucat J, García VE.** (2010) PsuedoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiol* 10:118.
- Bima P, Fontán H, Ocampo A.** (2014) Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Córdoba. Sistemas de Producción de Cultivos Intensivos Tomo I.
- Boller T y Felix G** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbeassociated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406.
- Boris AV, Bull TC** (2009). The impact of genomic approaches on our understanding of diversity and taxonomy of plant pathogenic bacteria. In: Jackson RW (ed) Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology. Horizon Scientific Press, Norwich, 37–61
- Bouchet V, Huot H, Goldstein R.** (2008). Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin Microbiol Rev.* 2:262-273
- Brawn-Kiewnick A, Sands DC.** (2001). *Pseudomonas*. En Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Tercera Edición. Editado por N. W. Schaad, J.B. Jones y W. Chun. EE UU: APS PRESS
- Brelles-marin G, Bedmar EJ, Marin GB.** (2001). Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria, *J Biotechnol.* 91:197–209.
- Bretz JR.** (2004). *Pseudomonas syringae* Pathogenesis: regulation of type III secretion and identification of a secreted effector. Tesis Doctoral.
- Bull CT, Clarke CR, Cai R, Vinatzer BA, Jardini TM, Koike ST.** (2011) Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101:847–858
- Butler MT, Wang Q, Harshey RM** (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *PNAS USA.* 107:3776-81
- Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA.** (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 187: 7351-7361.
- Calvio C, Celandroni F, Ghelardi E, Amati G, Salvetti S, Ceciliani F, Galizzi A, Senesi S.** (2005) Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon, *J Bacteriol* 187:5356-5366.

Castro Masegosa, Gabriel (2012). Estudio inicial de *Pseudomonas* fitopatógenas aisladas de daños en plantas de estropajo, pino y tomate de cultivos veracruzanos. Universidad Veracruzana, facultad de Biología. Tesis Doctoral.

Cazorla FM, Arrebola E, Sesma A, Pérez-García A, et al., de Vicente A. (2002). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology* 92:909-916.

Cha CE, Gao O, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 1119-1129.

Chen C, Beattie GA. (2007). Characterization of the osmoprotectant transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and demonstration that cystathionine synthase domains are required for its osmoregulatory function. *J. Bacteriol.* 189: 6901–6912.

Chen C, Beattie GA. (2008). *Pseudomonas syringae* BetT Is a Low-Affinity Choline Transporter That Is Responsible for Superior Osmoprotection by Choline over Glycine Betaine. *J. Bacteriol.* 190:2717–2725.

Chen C, Li S, McKeever DR, Beattie G. (2013). The widespread plant-colonizing bacterial species *Pseudomonas syringae* detects and exploits an extracellular pool of choline in hosts. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 75:891–902.

Chen C, Malek AA, Wargo MJ, Hogan DA, Beattie GA. (2009). The ATP-binding cassette transporter Cbc choline/betaine/carnitine recruits multiple substrate-binding proteins with strong specificity for distinct quaternary ammonium compounds. *Mol Microbiol.* 75:29-45.

Chilton NW, Barbano JP. (1974). Guidelines for reporting clinical trials. *J Periodontal Res Suppl.* 14: 207-208.

Choi KH, Schweizer HP. (2006). Mini-Tn7 insertion with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* 1:153–161.

Danhorn T y Fuqua C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401–422.

Defacci MA. (2003). Bacteriosis en hojas de avena causadas por *Pseudomonas* fitopatógenas: estudios microbiológicos, bioquímicos y moleculares. Tesis de grado, UNRC.

Deflaun MF, Tanzer AS, McAteer AL, Marshall B, Levy SB. (1990) Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*, *Appl Environ Microbiol* 56:112-119.

Dehbi F, Harzallah D, Larous L. (2001). Effects of nutritional factors on production of 19 tabtoxin, a phytotoxin, by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Meded Rijksuniv Gen. Fak 20 Land bouwkd Toegep *Biol. Wet.* 66: 241-247.

Delgado CLM. (2009) El papel de la proteína RhlA en la síntesis de ramnolípidos (rhl's) y polihidroxicanoatos(PHA's) en *Pseudomonas aeruginosa*, Tesis de maestría, Facultad de Química UNAM.

Desai JD, Banat IM. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47-64.

Déziel E, Comeau Y, Villemur R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol.* 183: 1195-1204.

Diab F, Bernard T, Bazire A, Haras D, Blanco C, Jebbar M. (2006). Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiol* 152:1395-1406.

Domenech CE, Garrido MN, Lisa AT. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* cholinesterase and phosphorylcholine phosphatase: two enzymes contributing to corneal infection. *FEMS Microb Lett*, 82: 131-136.

Domenech CE, Otero LH, Beassoni PR, Lisa AT. (2011). Phosphorylcholine phosphatase: a peculiar enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. SAGE-hindawi access to research enzyme research. Article ID 561841.

Dubeau D, Déziel E, Woods D, Lépine F. (2009) Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol* 9:263

Dulla G, Lindow SE. (2008). Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *PNAS USA*, 105:3082–7.

Dye DW, Bradbury JF, Goto M, Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar name and pathotypes strains. *Review of Plant Pathol*, 59:153–68.

Eltlbany N, Prokscha ZZ, Castañeda-Ojeda MP, et al., Smalla K. (2012). A new bacterial disease on *Mandevilla sanderi*, caused by *Pseudomonas savastanoi*: lessons learned for bacterial diversity studies. *Appl Environ Microbiol*, 78: 8492–7.

Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, et al., Lindow SE. (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:11064–11069.

- Ferrante P, Scortichini M.** (2015). Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathol*, 64:51–62
- Gallarato LA, Primo ED, Lisa AT, Garrido MN.** (2012). Choline promotes growth and tabtoxin production in a *Pseudomonas syringae* strain. *Adv Microbiol*. 2:327-331.
- Garrido M, Lisa A, Albelo S, Lucchesi G, Domenech C.** (1990). Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase as a phosphorylcholine phosphatase activity. *Mol. Cel. Biochem*. 94: 89 - 95.
- Giraldo JD.** (2012). Producción de Ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25: Evaluación de su Actividad Emulsificante y de Remoción de Metales Pesados. *Tesis de Licenciatura en Biología (Microbiología y Parasitología)*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Grgurine I, Mariotti F, Fogliano V, Gallo M, Scaloni A, et al., Graniti A.** (2002) A new syringopeptine produced by vean strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Biochim Biophys Acta*, 1597, 81–89.
- Gross DC y DeVay JE.** (1977). Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiol Plant Pathol*, 11:13–28.
- Haapalainen M, Mosorin H, Dorati F, Wu RF, Roine E, et al., Lin NC.** (2012). Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts. *J Bacteriol*, 194: 4810–22.
- Hernández Forte I, Nápoles García MC, Rosales J, et al., Ramírez Pedroso JF.** (2012). Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*, 33: 21-28.
- Hettwer U, Gross M, Rudolph K.** (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol*. 177: 2834–2839.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22:4673-4680.
- Huang HC, Schuurink R, Denny TP, Atkinson MM, et al., Collmer A.** (1988). Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J Bacteriol*, 170:4748-4756.
- Hutchison ML, Gross DC.** (1997). Lipopeptidephytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol Plant Microbe Interact* 10:347-354.

Hwang MSH, Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW, Guttman DS. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol*, 71: 5182–5191.

Infantes L, Otero LH, Beassoni PR, Boetsch C, Lisa AT, Domenech CE, Albert A. (2012). The structural domains of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase cooperate in substrate hydrolysis: 3D structure and enzymatic mechanism. *J Mol Biol*. 423:503-14.

INTA-Informe Fitopatológico N° 11 Cultivo de Soja. (2013). Roya de la soja y enfermedades de fin de ciclo. Período informado: 15 al 21 de marzo de 2013.

Ishii S, Sadowsky MJ. (2009). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol*. 11:733–740.

Itoh S, Honda H, Tomita F, Suzuki T. (1971) Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on n-Paraffin. *The J Antibiotics*. 24:855-859

Jones JD y Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323-329.

Juhas M, Eberl L, Tümmler B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*, 7:459–71.

Kahlon RS. (2016). *Pseudomonas*- Plant Interactions II: Biology and Pathogenesis of *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas: Mol and Appl Biol* 469-518.

Katagiri F y Tsuda K. (2010). Understanding the plant immune system. *Mol Plant Microbe Interact* 23:1531-1536.

Kilmurray C. (2012). Caracterización de los parámetros cinéticos de la enzima fosforilcolina fosfatasa de distintos miembros del género *Pseudomonas*. Tesis Doctoral

Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64: 346-351.

Kimura M, Anzai H, Yamaguchi I. (2001). Microbial toxins in plant-pathogen interactions: Biosynthesis, resistance mechanisms, and significance. *J Gen Appl Microbiol*, 47:149–160.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 16:111-120.

Kinscherf TG, Willis DK. 2005. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam antibiotic tabtoxin in *Pseudomonas syringae*. *J Antibiot*, 58:817–821.

Kong HS, Roberts DP, Patterson CD, et al., Lydon J. (2012). Effect of overexpressing rsmA from *Pseudomonas aeruginosa* on virulence of select phytotoxin-producing strains of *P. syringae*. *Phytopathology*, 102: 575–587.

Kurz M, Burch AY, Seip B, Lindow SE, Gross H. (2010). Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. *Appl Environ Microbiol*, 76: 5452–62.

Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, Oh H-S, Collmer A. (2007). Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J Bacteriol*, 189:8059–8072.

Laabei M, Jamieson WD, Lewis SE, Diggle SP, Jenkins ATA. (2014). A new assay for rhamnolipid detection important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl Microbiol Biotechnol*. 98:7199-7209.

Lane DJ. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: E. Stackebrandt y M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley y Sons, New York, 115-175.

Leitermann F, Syldatk C, Hausmann R. (2008). Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy. *J Biol Eng*, 2:13.

Lelliot RA, Billing E y Hayward AC. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *J Appl Microbiol* 29:470-489.

Li H, Ullrich MS. (2001). Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol*. 183: 3282–3292.

Li S, Yu X, Beattie G. (2013). Glycine betaine catabolism contributes to *Pseudomonas syringae* tolerance to hyperosmotic stress by relieving betaine-mediated suppression of compatible solute synthesis. *J Bacteriol*, 195: 2415–2423.

Lisa AT, Beassoni PR, Massimelli MJ, Otero LH, Domenech CE. (2007). A glance on *Pseudomonas aeruginosa* phosphoryl choline phosphatase, an enzyme whose synthesis depends on the presence of choline in its environment. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Appl Microbiol* (Méndez-Vilas A, ed), 1:255-262.

Lisa AT, Garrido MN, Domenech CE. (1983). Induction of acid phosphatase and cholinesterase activities in *Pseudomonas aeruginosa* and their in vitro control by choline, acetylcholine and betaine. *Mol Cell Biochem*, 50:149-155.

Lisa AT, Garrido MN, Domenech CE. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase and cholinesterase induced by choline and its metabolic derivatives may contain a similar anionic peripheral site. *Mol Cell Biochem*, 63: 113-118.

Lisa AT, Lucchesi GI, Domenech CE. (1994a). Pathogenicity of *P. aeruginosa* and its relationship to the choline metabolism through the action of cholinesterase and phosphatase and phospholipase C. *Curr Microbiol* 29: 193 - 199.

Lisa AT, Casale C, Lucchesi GI and Domenech CE. (1994b). Cholinesterase, acid phosphatase and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr Microbiol* 28: 71-76.

Loh J, Pierson EA, Pierson LS, Stacey G, Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5: 285–290.

Lucchesi GI, Lisa AT, Casale CH, Domenech CE. (1995). Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol*, 28:71-76.

Lucchesi GI, Lisa AT, Domenech CE. (1989). *P. aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Microbiol.* 57: 335 - 338.

Malamud F, Conforte VP, Rigano LA, et al., Vojnov AA. (2012). *hrpM* is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Mol Plant Pathol*, 13:1010-1018.

Martínez AZ. (2012) Tesis Doctoral. “Propiedades bioquímicas de tensioactivos biológicos de origen bacteriano”. Universidad de Murcia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Massimelli MJ, Sánchez DG, Buchieri MV, Olvera L, et al., Lisa AT (2011). Choline catabolism, σ_{54} factor and NtrC are required for the full expression of the *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene. *Microbiol Res* 166: 380–390.

McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, et al., Williams P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol*, 143: 3703-3711.

McNeil SD, Nuccio ML, Rhodes D, Shachar-Hill Y, Hanson AD. (2000). Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. *Plant Physiol*, 123: 371-380.

Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G (2003). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR* encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiol* 149:3073-3081

Messaadia N, Harzallah D. (2011). Regulatory effects of carbon sources on tabtoxin production (A β -lactam phytotoxin of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*). *J Eng Technol Manage* 73: 904-908.

Miura G y Shih TM. (1984). Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. *Physiologia Plantarum*, 61:417–421.

Moore ERB, Mau M, Arnscheidt A, Bottger EC, Hutson RA, et al., Timmis KN. (1996). The determination and comparison of the 16S rRNA genes sequences of species of the genus

Pseudomonas (Sensu strict) and estimation of the natural intrageneric relationships. *System Appl Microbiology*, 19:478-492.

Müller MM, Hörmann B, Sylđatk C, Hausmann R (2010). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:167-174.

Naum M, Brown EW, Mason-Gamer RJ. (2008). Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the Enterobacteriaceae?. *J Mol Evol.* 66: 630-642.

Nau-Wagner G, Opper D, Rolbetzki A, et al., Bremer E. (2012). Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine-responsive GbsR repressor. *J Bacteriol*, 194:2703–2714.

Netting A. (2002). pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular response to stress and their implication for plant water relations. *J Exp Botany* 53: 151-173.

Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 176:2044–2054.

Okkotsu Y, Tiekü P, Fitzsimmons LF, Churchill ME, Schurr MJ. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation modulates rhamnolipid production and motility. *J Bacteriol*, 195: 5499–5515.

Oliva MDLM, Carezzano ME, Giuliano M, Daghero J, et al., Demo M. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biol* 17:758-65

Otero LH, Beassoni PR, Boetsch C, Lisa AT, Domenech CE. (2011). Different effects of Mg²⁺ and Zn²⁺ on the two sites for alkylammonium compounds in *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase. *Enzyme Res* On line, DOI:10.4061/2011/826784.

O'Toole GA, Kolter R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28: 449-461.

Palleroni NJ. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 231-251.

Palleroni NJ. 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies of the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiol*, 149: 1-7.

Parejko JA, Mavrodi DV, Mavrodi OV, Weller DM, Thomashow LS. (2012). Population structure and diversity of phenazine-1-carboxylic acid producing fluorescent *Pseudomonas* spp. from dryland cereal fields of central Washington State (USA). *Microb Ecol*, 64: 226-241.

Pereira JF, Gudiña EJ, Dória ML, Domingues MR, Rodrigues LR, Teixeira JA, Coutinho JA. (2012) Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil. *Eur J Mass Spectrom*, 18:399-406.

Pinzon NM y Ju LK. (2009). Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnol Lett*, 31:1583–1588.

Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB, Lam JS. (2000), Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiol*, 146:2803–2814.

Ramette A, Moenne-Loccoz Y, Defago G. (2006) Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 369–381.

Rivera Hoyos LD, Castaño Zapata J. (2011). Etiología de la muerte descendente del duraznero [*Prunus persica* (L.) Batsch] en los municipios de Manizales y Villamaría, departamento de Caldas. *Rev Acad Colomb Cienc*, 35: 61-69, ISSN 0370-3908.

Sage AE, Vasil ML. (1997). Osmoprotectant-dependent expression of plcH, encoding the haemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 179:4874-4881

Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Ev*, 4: 406-425.

Sambrook J, Russel DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring 21 Harbor Laboratory Press.

Sánchez DG, Hernández M, Otero LH, Serra AL, Encarnación S, Domenech CE, Lisa AT. (2012). Acetyl cholinesterase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, is encoded by the *pa4921* gene, and belongs to the SNGH family. *Res Microbiol*, 167:317-325.

Sánchez MM. (2010). Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolípidos biotensioactivos. Tesis de doctorado, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Murcia.

- Schenk A, Berger M, Keith LM, Bender CL, Muskhelishvili G, Ullrich MS.** (2006). The algT gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and new insights into the transcriptional organization of the algT-muc gene. *J Bacteriol*, 188: 8013–8021.
- Schreiber G, Kolar H, Foisner R, Kubicek CP.** (1986). Choline stimulates synthesis of extracellular proteins in *Trichoderma reesei* QM 9414. *Arch Microbiol*, 144: 41-47.
- Scortichini M, Rossi MP, Loreti S, Bosco A, Fiori M, et al., Janse JD.** (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*, the causal agent of bacterial twig dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathol*, 95: 1316-1324.
- Siegmund I, Wagner F.** (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Tech.* 5:265-268.
- SINAVIMO (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas)** (2010). SENASA. <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/pseudomonas-syringae-pv-syringae>
- Smith LT, Pocard JL, Bernard T, Le Rudulier D.** (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 170:3142-3149.
- Smyth T, Rudden M, Tsauosi K, Banat IM.** (2014) Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids. Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Springer Protocols Handbooks pp 29-60. Print ISBN 978-3-662-49135-5.
- Sorensen KN, Hee-Kim K, Takemoto JY.** (1998) PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl Environ Microbiol* 64:226-230.
- Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M.** (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*, 43: 159-271.
- Steen H y Mann M.** (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 699-711.
- Stefanova M.** (2008). El fuego salvaje (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* l.): etiología, epidemiología y medidas de control. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. C. de la Habana.
- Sundin GW, Bender CL.** (1993). Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol* 59:1018-1024.
- Tadros TF** (2005). Adsorption of surfactants at the air/liquid and liquid/liquid interfaces. En: Applied Surfactants: Principles and Applications. Weinheim: Wiley VCH, p. 81-82.
- Takahashi Y, Protection P, Omura T.** (1996). Detection and Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea* by PCR Amplification of Specific Fragments from an Indigenous Plasmid, 783–788.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596-1599.

Tang JL, Gough CL, Barber CE, Dow JM, Daniels MJ. (1987). Molecular cloning of protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. *Mol Gen Genet*, 210:443-448.

Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. (2011) Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresour Technol* 102: 3366-3372.

Thomas MD, Langston-Unkefer PJ, Uchytel TF, Durbin RD. (1983). Inhibition of glutamine synthetase from pea by tabtoxinine- β -lactam. *Plant Physiol*, 71: 912-915.

Thornley MJ. (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J Appl Bacteriol*, 23: 27-52.

Uchytel TF, Durbin RD. (1980). Hydrolysis of tabtoxin by plant and bacterial enzymes. *Experient*. 36: 301-302.

Vaseghi A, Safaei N, Bakhshinejad B, Mohsenifar A, Sadeghizadeh M. (2013) Detection of *Pseudomonas syringae* pathovars by thiol-linked DNA-Gold nanoparticle probes. *Sens Actuators B Chem*, 181:644-651.

Versalovic JSM, Koeuth T, Lupski JR. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Acids Res*, 19: 6823-6831.

Völsch B, Weingart H. (1998). Toxin production by pathovars of *P. syringae* and their antagonistic activities against epiphytic microorganism. *J Basic Microbiol*, 38: 135 - 145.

Walter V, Syldatk C, Hausmann R. (2010). Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. En: R. Sen, ed. Springer *Biosurfactants*. 1-13.

Wargo MJ. (2013). Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microb*, 79: 2112-2120.

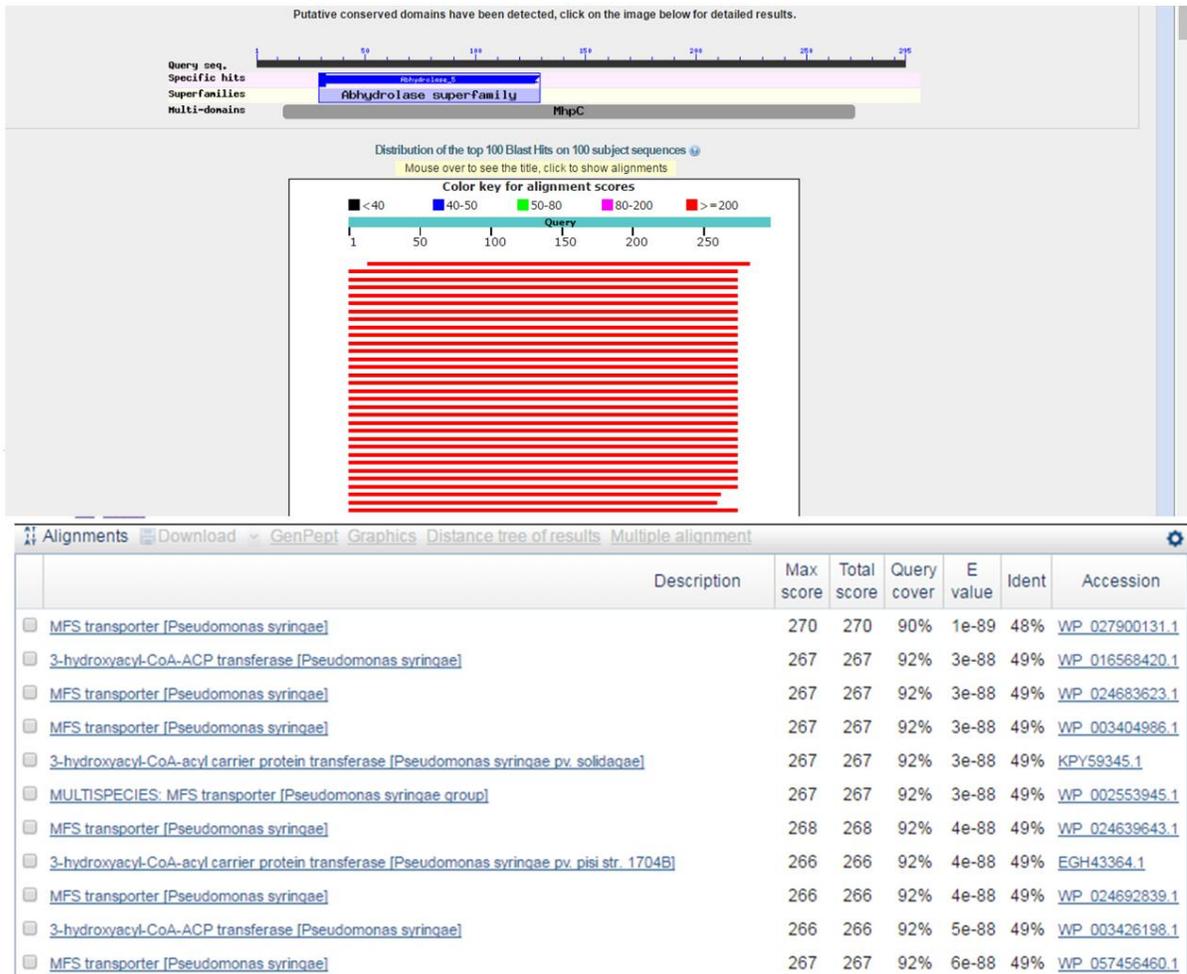
Wolska K, Kot B, Jakubczak A, Rymuza K. (2011) BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *P. aeruginosa* isolates. *Folia Histochem Cytobiol*, 49: 734-738.

Xin XF, y He SY. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathol*, 51:1-611.

Yu X, Lund SP, Scott RA, Greenwald JW, Records AH, et al., Beattie GA. (2013). Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *PNAS*. USA. 110:E425-E434.

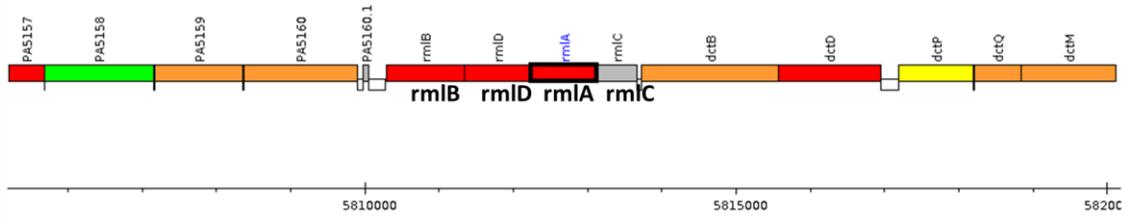
Anexos

Anexo 1

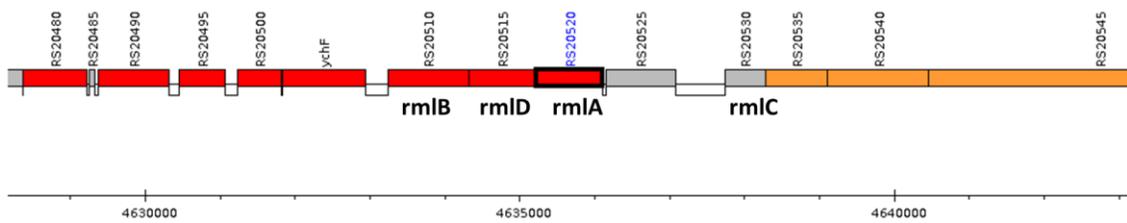


Anexo 2

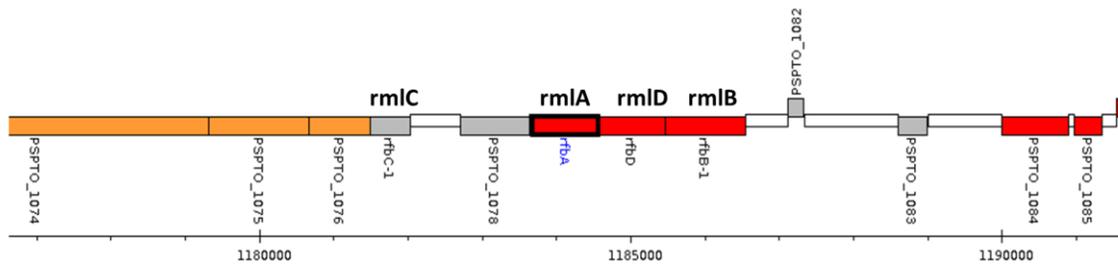
Pseudomonas aeruginosa PAO1, PA5163 (rmlA)



Pseudomonas syringae CC1557, N018_RS20520



Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000, PSPTO_1079 (rfbA)



Anexo 3

Análisis estadístico

Cepa: *Pseudomonas syringae* S5

- Análisis estadístico de la movilidad tipo *swimming*, en medio de cultivo MET con diferentes fuentes de nitrógeno.

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,57	0,46	4,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,05	1	0,05	5,26	0,08
Columnal	0,05	1	0,05	5,26	0,08
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,09	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,22192

Error: 0,0096 gl: 4

Columnal	Medias	n	
MET col/sac	2,33	3	A
MET NH4/sac	2,52	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

- Análisis estadístico de la movilidad tipo *swarming*, en medio de cultivo MET con diferentes fuentes de nitrógeno.

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,90	0,88	10,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,35	1	0,35	36,57	0,00
Columnal	0,35	1	0,35	36,57	0,00
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,39	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,22192

Error: 0,0096 gl: 4

Columnal	Medias	n	
MET col/sac	0,68	3	A
MET NH4/sac	1,17	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Cepa: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* DC3000

- Análisis estadístico de la movilidad tipo *swimming*, en medio de cultivo MET con diferentes fuentes de nitrógeno.

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,53	0,41	1,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,02	1	0,02	4,50	0,10
Columna1	0,02	1	0,02	4,50	0,10
Error	0,01	4	0,00		
Total	0,03	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,13088

Error: 0,0033 gl: 4

Columna1	Medias	n	
MET NH4/sac	5,37	3	A
MET col/sac	5,47	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

.- Análisis estadístico de la movilidad tipo *swarming*, en medio de cultivo MET con diferentes fuentes de nitrógeno.

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,86	0,83	6,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	1,93	1	1,93	25,13	0,01
Columna1	1,93	1	1,93	25,13	0,01
Error	0,31	4	0,08		
Total	2,23	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,62769

Error: 0,0767 gl: 4

Columna1	Medias	n	
MET NH4/sac	4,00	3	A
MET col/sac	5,13	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

.-Análisis estadístico de la actividad toxigénica en cultivos de *P. syringae* S5 en el medio MET con diferentes fuentes de carbono.

Tiempo de cultivo: 48 hs

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	9	0,53	0,37	5,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,01	2	0,01	3,36	0,11
Columna1	0,01	2	0,01	3,36	0,11
Error	0,01	6	0,00		
Total	0,02	8			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,08019

Error: 0,0016 gl: 6

Columna1	Medias	n	
Gli/NH4	0,64	3	A
sac/NH4	0,65	3	A
Fru/NH4	0,72	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

Tiempo de cultivo: 72 hs.

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna3	9	0,99	0,98	3,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,52	2	0,26	220,27	0,00
Columna1	0,52	2	0,26	220,27	0,00
Error	0,01	6	0,00		
Total	0,53	8			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,06889

Error: 0,0012 gl: 6

Columna1	Medias	n		
Gli/NH4	0,68	3	A	
sac/NH4	0,86	3		B
Fru/NH4	1,26	3		C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

.-Análisis estadístico de la actividad toxigénica en cultivos de *P. syringae* S5 en el medio MET con diferentes fuentes de nitrógeno.

Tiempo de cultivo: 48 horas

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,97	0,96	6,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,39	1	0,39	125,57	0,00
Columnal	0,39	1	0,39	125,57	0,00
Error	0,01	4	0,00		
Total	0,40	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,12554

Error: 0,0031 gl: 4

Columnal	Medias	n	
sac/NH4	0,65	3	A
sac/col	1,16	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

Tiempo de cultivo: 72 horas

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna3	6	0,95	0,94	6,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,37	1	0,37	75,01	0,00
Columnal	0,37	1	0,37	75,01	0,00
Error	0,02	4	0,00		
Total	0,38	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,15815

Error: 0,0049 gl: 4

Columnal	Medias	n	
sac/NH4	0,86	3	A
sac/col	1,35	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

.-Análisis estadístico de la cuantificación de la actividad proteasa en cultivos de *P. syringae* S5 en presencia de las fuentes de carbono indicadas.

Tiempo de cultivo: 48 hs

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	9	0,87	0,82	9,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,10	2	0,05	19,61	0,00
Columna1	0,10	2	0,05	19,61	0,00
Error	0,02	6	0,00		
Total	0,12	8			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,10317

Error: 0,0027 gl: 6

Columna1	Medias	n	
sac/NH4	0,40	3	A
Gli/NH4	0,57	3	B
Fru/NH4	0,66	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

Tiempo de cultivo: 72 hs

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna3	9	0,35	0,14	11,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,01	2	0,01	1,64	0,27
Columna1	0,01	2	0,01	1,64	0,27
Error	0,02	6	0,00		
Total	0,03	8			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,11321

Error: 0,0032 gl: 6

Columna1	Medias	n	
sac/NH4	0,45	3	A
Gli/NH4	0,50	3	A
Fru/NH4	0,53	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

.-Análisis estadístico de la cuantificación de la actividad proteasa en cultivos de *P. syringae* S5 en presencia de las fuentes de carbono indicadas.

Tiempo de cultivo: 48 hs

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
----------	---	----------------	-------------------	----

Columna2 6 0,98 0,97 15,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,19	1	0,19	176,73	0,00
Columna1	0,19	1	0,19	176,73	0,00
Error	0,00	4	0,00		
Total	0,20	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,07519

Error: 0,0011 gl: 4

Columna1	Medias	n	
sac/col	0,04	3	A
sac/NH4	0,40	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)

Tiempo de cultivo: 72 horas

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna3	6	0,95	0,94	19,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	0,21	1	0,21	82,92	0,00
Columna1	0,21	1	0,21	82,92	0,00
Error	0,01	4	0,00		
Total	0,22	5			

Test : LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,11485

Error: 0,0026 gl: 4

Columna1	Medias	n	
sac/col	0,07	3	A
sac/NH4	0,45	3	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0,05)