



Universidad de León
Departamento de Biología Molecular
Área de Microbiología



Análisis molecular y proteómico de la bacteria fitopatógena de vid *Xylophilus ampelinus*

Silvia Sevillano Nistal
León, 2014

A mi familia

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral no es el resultado de un trabajo en solitario a lo largo de años, sino que es fruto de la colaboración y apoyo de varias personas a las que quisiera expresar mi agradecimiento.

Al Dr. Juan José Rubio Coque, por sus enseñanzas y por confiar en mí para realizar esta Tesis bajo su dirección.

A la Dra. Rebeca Cobos Román, por su dirección, su implicación y apoyo continuo, pero sobre todo por su paciencia y por enseñarme a creer en esta Tesis.

Al Dr. Roger W. Innes, por cedernos amablemente el plásmido pHMI.

Al Dr. Luis M. Mateos, por proporcionarnos el plásmido pK18*mobsacB*.

Al Dr. Carlos Barreiro, por el asesoramiento y resolución de cuantas dudas me surgieron sobre proteómica.

Al Dr. José Luis Acebes y a la Dra. Penélope García, por permitirme utilizar el material vegetal y las instalaciones del Área de Fisiología Vegetal.

A mis compañeros del Área de Microbiología, profesores, becarios, personal técnico y administrativo, por su ayuda y disponibilidad siempre que la necesité.

A mis compañeros del Instituto de la Viña y el Vino, por su colaboración, especialmente al laboratorio 29 por todos estos años de convivencia.

A M^a Ángeles, Etel, Nuria, Ángeles y Vanesa, por su amistad, forjada en mis inicios en la ciencia, por sus ánimos, comprensión y por tantos buenos momentos vividos.

A Bea y Alberto S., por sorprenderme con su sincera amistad.

A Alberto, por ser el mejor de los compañeros y un buen amigo, por todos esos planes para olvidarnos de un mal día. A Alma, por escucharme y ayudarme, y por todas las vivencias compartidas, no sólo en el trabajo. A Rebe y Nacho, por hacerme sentir una más de su familia, por los continuos ánimos, por su infinita paciencia y por su cariño. A Rosa, por estar tan presente, incluso en la distancia. Gracias 203v&+.

A mis amigos *da terra galega*. En especial a Pablo, por estar siempre ahí, por ser *el amigo* y una de las personas más importantes de mi vida; y a Nuria, por su amistad incondicional, su alegría, sus ánimos, por estar siempre pendiente haciendo que las distancias no existan y por compartir conmigo tantos momentos.

Y sobre todo, a mi familia. A mis padres, a quienes debo todo lo que soy, por ser mi mayor apoyo, por sus consejos, su comprensión y su cariño; y a mi hermano Rubén, por su alegría y generosidad. Gracias por estar a mi lado.

ABREVIATURAS

<p>ADN: ácido desoxirribonucleico</p> <p>ADNr: ADN ribosomal</p> <p>DNasa: desoxirribonucleasa</p> <p>ARN: ácido ribonucleico</p> <p>RNasa: ribonucleasa</p> <p>ATP: adenosina 5´-trifosfato</p> <p>BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato</p> <p>BSA: seroalbúmina bovina</p> <p>CIA: cloroformo-alcohol isoamílico</p> <p>col: colaboradores</p> <p>dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato</p> <p>DMSO: dimetilsulfóxido</p> <p>DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm de longitud de onda</p> <p>DTT: ditioneitol</p> <p>EDTA: ácido etilendiaminotetracético</p> <p>g: gramo</p> <p>°C: grado centígrado</p> <p>IPTG: 1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido</p> <p>kb: kilobase</p> <p>kDa: kilodalton</p> <p>Km: kanamicina</p>	<p>Km^r: resistente a kanamicina</p> <p>l: litro</p> <p>M: molar</p> <p>MS: espectrometría de masas</p> <p>NBT: azul de nitrotetrazolio</p> <p>nm: nanómetro</p> <p>p/v: relación peso/volumen</p> <p>PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida</p> <p>pb: pares de bases</p> <p>PCR: reacción en cadena de la polimerasa</p> <p>rpm: revoluciones por minuto</p> <p>SDS: dodecil-sulfato sódico</p> <p>TAE: tris-acetato-EDTA</p> <p>Tris: tris-hidroximetil-aminometano</p> <p>U: unidades</p> <p>ufp: unidad formadora de placas</p> <p>UV: ultravioleta</p> <p>v/v: relación volumen/volumen</p> <p>V: voltio</p> <p>WT: cepa silvestre, del inglés “wild type”</p> <p>X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil D-galactopiranosido</p>
--	--

Abreviaturas para aminoácidos		
Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

I. Introducción **1**

I.1. Orígenes del cultivo de la vid.....	3
I.1.1. Historia de la vid en España.....	3
I.2. La vid y el sector vitivinícola	5
I.2.1. Importancia en España	5
I.2.2. El sector vitivinícola en Castilla y León	6
I.3. Patologías bacterianas de la vid.....	7
I.3.1. Agallas de corona de la vid	7
I.3.2. Enfermedad de Pierce	8
I.3.3. Podredumbre ácida del racimo	9
I.3.4. Flavescencia dorada	10
I.3.5. Necrosis bacteriana	11
I.4. La necrosis bacteriana de la vid	11
I.4.1. Distribución geográfica.....	12
I.4.2. La necrosis bacteriana en España.....	12
I.4.3. Epidemiología	13
I.4.4. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad.....	13
I.4.5. Síntomas y daños.....	14
I.4.6. Protección y control de la enfermedad	16
I.5. <i>Xylophilus ampelinus</i>	17
I.5.1. Taxonomía	17
I.5.2. Caracterización de <i>X. ampelinus</i>	18
I.5.3. Detección.....	19
I.6. Objetivos	20

II. Materiales y Métodos **21**

II.1. Microorganismos utilizados.....	23
II.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	23
II.1.2 Cepas de <i>Xylophilus ampelinus</i>	24
II.2. Medios de cultivo.....	24
II.2.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	24
II.2.2. Medios de cultivo para <i>Xylophilus ampelinus</i>	25
II.2.3. Suplementos de los medios.....	25

II.2.3.1. Antibióticos	26
II.2.3.2. Otros aditivos	26
II.3. Vectores fágicos y plasmídicos.....	27
II.3.1. Vectores plasmídicos	27
II.3.2. Vectores fágicos.....	28
II.4. Mantenimiento y cultivo de microorganismos.....	28
II.4.1. Crecimiento de cepas de <i>E. coli</i>	28
II.4.2. Crecimiento de cepas de <i>X. ampelinus</i>	28
II.4.3. Mantenimiento de microorganismos	28
II.4.4. Estimación del crecimiento de los cultivos líquidos bacterianos	29
II.5. Métodos de extracción y análisis de ADN	29
II.5.1. Extracción de ADN	29
II.5.1.1. Limpieza y precipitación del ADN de una solución	29
II.5.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	30
II.5.1.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (Minipreps)	30
II.5.1.2.2. Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (Lisis alcalina)	30
II.5.1.3. Aislamiento de ADN total de <i>Xylophilus ampelinus</i>	31
II.5.2. Evaluación de la concentración y pureza del ADN	32
II.5.3. Tratamiento enzimático del ADN	32
II.5.3.1. Eliminación enzimática de ácidos nucleicos	32
II.5.3.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción	32
II.5.3.3. Ligación de fragmentos de ADN.....	33
II.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
II.5.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	36
II.5.5.1. Recuperación de fragmentos de ADN separados por electroforesis.....	36
II.5.5.1.1. Método de congelación rápida (<i>Freeze-squeeze</i>)	36
II.5.5.1.2. Método de purificación en columnas GFX.....	37
II.5.6. Hibridación de ADN (<i>Southern blotting</i>).....	37
II.5.6.1. Transferencia del ADN a una membrana.....	37
II.5.6.2. Marcaje de sondas de ADN.....	38
II.5.6.3. Cuantificación del marcaje.....	39
II.5.6.4. Hibridación de ADN.....	40
II.5.7. Secuenciación de ADN	41
II.5.8. Análisis informático	41
II.6. Transformación genética de microorganismos	42
II.6.1. Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	42
II.6.1.1. Inducción del estado de competencia	42

II.6.1.2. Proceso de transformación de <i>E. coli</i>	43
II.6.2. Transformación por electroporación.....	43
II.6.2.1. Inducción del estado de electrocompetencia.....	44
II.6.2.2. Proceso de electroporación	45
II.6.2.2.1. Electroporación de <i>E.coli</i>	45
II.6.2.2.2. Electroporación de <i>X. ampelinus</i>	45
II.7. Manipulación de genotecas en vectores fágicos.....	45
II.7.1. Construcción de genotecas.....	45
II.7.2. Amplificación de la genoteca.....	49
II.7.3. Rastreo de genotecas construidas en vectores fágicos.....	49
II.7.3.1. Marcaje de la sonda y cuantificación del marcaje	49
II.7.3.2. Infección en medio sólido	50
II.7.3.3. Transferencia a membranas de nailon.....	50
II.7.3.4. Hibridación del ADN con la sonda.....	50
II.7.3.5. Selección y aislamiento de fagos	50
II.7.3.6. Amplificación de los fagos aislados.....	51
II.7.3.7. Infección en medio líquido.....	51
II.7.3.8. Extracción de ADN fágico.....	52
II.7.3.9. Digestión con enzimas de restricción del ADN fágico.....	52
II.8. Técnicas de mutagénesis de <i>X. ampelinus</i>	53
II.8.1. Mutagénesis mediante inserción del transposón EZ-Tn5™.....	53
II.8.2. Mutagénesis dirigida por doble recombinación.....	54
II.9. Métodos de extracción y análisis de proteínas	56
II.9.1. Extracción de proteínas para análisis proteómico	56
II.9.1.1. Extracción de proteínas citoplasmáticas.....	57
II.9.1.2. Extracción de proteínas extracelulares.....	57
II.9.2. Cuantificación de proteínas.....	58
II.9.3. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	58
II.9.4. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	60
II.9.5. Expresión de proteínas en el sistema de expresión pET SUMO	60
II.10. Ensayos sobre hojas de vid.....	63
II.10.1. Obtención de microtallos de vid para cultivo <i>in vitro</i>	63
II.10.2. Inoculación sobre heridas en hojas de vid	63
II.10.3. Determinación de la necrosis foliar.....	64
II.11. Ensayo de sensibilidad a cationes	64
II.12. Determinación de niveles intracelulares de cationes.....	65
II.13. Ensayo de mortalidad por peróxido de hidrógeno	65

II.14. Ensayo de medida de actividad catalasa y superóxido dismutasa	66
II.14.1. Obtención de extractos celulares	66
II.14.2. Determinación de la actividad catalasa	66
II.14.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa	67

III. Resultados y Discusión **69**

III.1. Estudios preliminares de <i>Xylophilus ampelinus</i>	71
III.1.1. Selección de medio y condiciones de cultivo	71
III.1.2. Identificación de <i>X. ampelinus</i> mediante secuenciación del ARNr 16S y PCR anidada.....	71
III.1.3. Curva de crecimiento.....	73
III.1.4. Relación entre la densidad óptica de un cultivo y el número de células	74
III.1.5. Optimización de las condiciones de electroporación de <i>X. ampelinus</i>	74
III.1.6. Sensibilidad a antibióticos	76
III.2. Análisis proteómico de <i>X. ampelinus</i>	77
III.2.1. Análisis del proteoma intracelular. Posibles factores de patogenicidad.....	77
III.2.2. Análisis del proteoma extracelular. Posibles factores de patogenicidad	84
III.3. Clonación y caracterización del gen <i>tolB</i>	88
III.3.1. TolB y el complejo Tol-Pal	88
III.3.2. Construcción de una genoteca de <i>X. ampelinus</i>	89
III.3.2.1. Digestión parcial del ADN genómico de <i>X. ampelinus</i> y ligación al vector λ -DASH II/BamHI	90
III.3.2.2. Titulación de la genoteca mediante infección en medio sólido de <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue MRA (P2)	91
III.3.3. Amplificación de un fragmento interno del gen <i>tolB</i> por PCR	92
III.3.4. Rastreo de la genoteca de <i>X. ampelinus</i> con una sonda de <i>tolB</i>	94
III.3.5. Clonación y secuenciación de la región del genoma de <i>X. ampelinus</i> en la que se localiza el gen <i>tolB</i>	96
III.3.5.1. Determinación y análisis de la secuencia nucleotídica.....	98
III.3.6. Análisis del número de copias del gen <i>tolB</i> en el genoma de <i>X. ampelinus</i>	102
III.3.7. Análisis de la secuencia aminoacídica de TolB deducida de la secuencia de su gen..	103
III.3.7.1. Comparativa de la secuencia de TolB con otras especies.....	103
III.3.7.2. Caracterización de la estructura primaria.....	104
III.3.7.3. Caracterización de la estructura secundaria.....	105
III.3.7.4. Caracterización de la estructura tridimensional.....	105
III.3.8. Interrupción génica de <i>tolB</i> por doble recombinación.....	106
III.3.8.1. Construcción del plásmido pK18 <i>mobsacB</i> - Δ <i>tolB</i>	106

III.3.8.2. Transformación por electroporación y selección de transformantes	107
III.4. Obtención de mutantes avirulentos e hipervirulentos de <i>X. ampelinus</i> mediante mutagénesis con una transposasa	110
III.4.1. Mutagénesis mediante transposasa. Rendimiento de obtención de mutantes	110
III.4.2. Análisis del carácter virulento de los mutantes obtenidos: ensayos con hojas de plántulas de vid desarrolladas <i>in vitro</i>	111
III.4.3. Identificación de los genes interrumpidos en mutantes avirulentos e hipervirulentos seleccionados.....	112
III.4.4. Análisis del mutante avirulento Av23: caracterización del gen <i>mntH</i>	114
III.4.4.1. Análisis de la región del genoma de <i>X. ampelinus</i> que contiene el gen <i>mntH</i>	115
III.4.4.2. Amplificación del gen <i>mntH</i> por PCR	119
III.4.4.3. Análisis del número de copias del gen <i>mntH</i> en el genoma de <i>X. ampelinus</i>	119
III.4.4.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de MntH deducida a partir de la secuencia del gen.....	120
III.4.4.4.1. Comparativa de la secuencia de MntH con otras especies.....	120
III.4.4.4.2. Caracterización de la estructura primaria	121
III.4.4.4.3. Caracterización de la estructura secundaria.....	122
III.4.4.4.4. Caracterización de la estructura tridimensional.....	123
III.4.4.5. Interrupción génica de <i>mntH</i>	123
III.4.4.5.1. Construcción del plásmido pK18 <i>mobsacB-delmntH</i>	124
III.4.4.5.2. Transformación por electroporación y selección de transformantes.....	125
III.4.4.6. Estudio de la expresión de MntH en el sistema de expresión pET SUMO.....	126
III.4.4.7. Análisis de la función biológica de MntH y su papel en patogenicidad.....	128
III.4.4.7.1. Introducción del gen <i>mntH</i> en el mutante avirulento Av23.	128
III.4.4.7.2. Análisis por PCR de las diferentes cepas obtenidas de <i>X. ampelinus</i>	129
III.4.4.7.3. Ensayo de inoculación sobre hojas de vid. Determinación del nivel de virulencia en función del grado de necrosis foliar	130
III.4.4.7.4. Ensayo de sensibilidad a cationes.....	132
III.4.4.7.5. Determinación de los niveles intracelulares de Mn, Fe y Cu	133
III.4.4.7.6. Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno	134
III.4.4.7.7. Ensayo de medida de actividad catalasa y superóxido dismutasa.....	136
IV. Discusión general	139
• <u>Perspectivas futuras</u>	146
V. Conclusiones	149
VI. Bibliografía	153



Introducción

I.1. Orígenes del cultivo de la vid

La vid pertenece al género *Vitis*, cuyo origen se remonta a la Era Terciaria. El cultivo de la especie *Vitis vinifera*, de la cual derivaron la mayoría de las variedades cultivadas, es uno de los más antiguos que existen. Se cultivó por primera vez en el suroeste de Asia, en la región del Cáucaso hacia el 6.000 a.C. En la Biblia se cita la vid asociándola siempre a la tierra fértil. El Antiguo Testamento relata que Noé plantó viñedos al salir del arca, tras el diluvio. También cuenta que Moisés envió a doce espías a la tierra de Canaán y que volvieron con un racimo de uvas que era necesario portarlo entre dos hombres por su tremendo peso.

El cultivo se extendió por el Mar Mediterráneo de la mano de los comerciantes fenicios llegando a Egipto. Los egipcios ya representaron la vid y el vino en jeroglíficos de 3000 años a.C. En el 2.500 a.C. aparece en China y la India. Hacia el 2.000 a.C. llegó a Grecia, para más tarde extenderse a Italia, Sicilia y el norte de África. Hay abundantes referencias sobre el vino en la *Ilíada* y la *Odisea* puesto que los griegos comerciaban con esta bebida. Los romanos adoraban el vino e incluso tenían una divinidad dedicada al mismo, el dios Baco. Fueron la principal cultura que impulsó las técnicas del cultivo de la vid: obtuvieron diferentes variedades, reconocieron las principales enfermedades, desarrollaron las técnicas de poda, la importancia del riego y la fertilización de suelos. Empezaron a utilizar toneles y botellas de vidrio para almacenar el vino, frente a las vasijas de cerámica o a los pellejos de animales que se habían utilizado hasta el momento.

Entre finales del siglo XV y el XVI se extendió por América, llegando a finales del siglo XVIII a Australia y Nueva Zelanda.

I.1.1. Historia de la vid en España

Las primeras referencias al cultivo de la vid en España datan del 520 a.C. Es durante el dominio de la civilización romana cuando el cultivo de la vid y la producción de vino se extienden por toda la Península Ibérica. Aunque se cree que su cultivo comenzase sobre el año 3000 a.C., cuando los fenicios, que fundaron la ciudad de Cádiz en el 1.100 a.C., ocupaban la península. El clima cálido de la zona favoreció la naturaleza fuerte y dulce de los vinos, lo que les permitía soportar muy bien los viajes. Esta característica, junto con el espíritu comerciante de los fenicios, supuso que los vinos españoles se convirtieran en una de las mercancías más comunes en los intercambios comerciales del Mediterráneo y norte de África. Después de los

fenicios, los cartaginenses introdujeron nuevos avances en el cultivo de la vid, hasta la llegada del dominio romano, quienes comercializaron el vino español por todo el Imperio. Las dos mayores regiones productoras de la época eran la *Tarraconensis*, en el norte, y la *Baetica*, en el sur.

Con la decadencia del Imperio, España fue invadida por tribus germánicas que destruyeron muchas plantaciones de vid. La llegada de los visigodos contrarrestó la acción de los bárbaros, concediendo una gran importancia a la viticultura.

La invasión árabe a principios del siglo VIII supuso algunas dificultades para el desarrollo de la vid y la elaboración del vino, debido a la prohibición coránica de consumir bebidas alcohólicas. A pesar de ello, el cultivo de la vid continuó y se vio mejorado. Algunos de los emires y califas tenían viñedos y bebían vino, y los más liberales permitían a los cristianos continuar con el cultivo de viñedos y la elaboración del vino, fundamentalmente en los monasterios.

Al producirse la Reconquista se volvió a abrir la posibilidad de exportar el vino. Las comunidades religiosas que se fueron restableciendo jugaron un importante papel, ya que se encargaron de recuperar la tradición vinícola al ser el vino un elemento necesario e imprescindible para los ritos religiosos. Las viñas comenzaron de nuevo a florecer alrededor de monasterios y abadías para extenderse a otros terrenos. En los siglos siguientes se produjo un desarrollo de los flujos comerciales lo que potenció el nacimiento de las distintas zonas vinícolas y el trasiego de regiones que se turnaron para el abastecimiento de vino a la Corte.

El siglo XIX marca el devenir de la industria vinícola española. Comienzan a implantarse algunas reformas con la finalidad de mejorar la calidad del vino, y algunos de los métodos tradicionales en la elaboración del vino son sustituidos por nuevas técnicas industriales. Por otro lado, la llegada de la filoxera al norte de Europa, que devastó progresivamente los viñedos a mediados de siglo, contribuyó a consolidar la viticultura en España. Muchos viticultores franceses se establecieron en España para continuar con su medio de vida y trajeron consigo variedades de uva, maquinaria y métodos, entre los que destacaban la disposición de las cepas, el control de la fermentación o el sulfitado. Algunas de las plantaciones de Cabernet-Sauvignon y Merlot existentes en la actualidad en La Rioja y Ribera de Duero proceden de este tiempo. Sin embargo, a finales de siglo, la plaga afectó también a la Península, aunque resultó menos traumática que en otros países europeos, ya que se conocían soluciones para la recuperación de las viñas.

En el siglo XX, la Guerra Civil condenó a la viña al abandono, y la Segunda Guerra Mundial supuso la paralización del mercado europeo del vino. Ambos sucesos supusieron un duro golpe para el sector, empezando a recuperarse a partir de mediados de siglo. Desde entonces, las reestructuraciones de viñedos y la renovación y modernización de los procedimientos de elaboración y bodegas han caracterizado la evolución de la viticultura, transformando la imagen y calidad de los vinos españoles, que están en lo más alto del mercado mundial.

I.2. La vid y el sector vitivinícola

La vid es el cultivo frutícola de mayor extensión mundial, con unos 7 millones de hectáreas cultivadas en distintos continentes. La mayor parte del cultivo se encuentra concentrado en las regiones templadas de clima mediterráneo y, en concreto, en la cuenca mediterránea europea.

En la Unión Europea, la superficie total de viñedo es de unos 3.492.000 ha (año 2012¹), aunque se ha visto reducida últimamente. Este proceso es consecuencia de la combinación de factores como la reestructuración del viñedo y el impacto de la crisis vitícola, que se ha dejado sentir de forma distinta por zonas y tipos de vino.

I.2.1. Importancia en España

En España, el sector vitivinícola tiene una gran importancia, tanto por el valor económico que genera, como por la población que ocupa y por el papel que desempeña en la conservación medioambiental. La situación geográfica, las diferencias climáticas y la variedad de suelos, hace de la Península un lugar privilegiado para que se produzcan vinos de características muy distintas.

La relevancia de la viticultura en el conjunto de la economía agraria española es fundamental, siendo el país con la mayor superficie cultivada del mundo y el tercero europeo en producción de vino por detrás de Italia y Francia, según el informe de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (datos 2012¹). El viñedo en España ocupa una extensión total de 1.018.000 ha, y es el cultivo que mayor superficie presenta tras los cereales de grano, el olivar y el girasol, según datos del año 2013 del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y

¹ <http://www.winesfromspain.com>

Marino. La superficie ocupada es mayoritariamente de secano, repartiéndose en cultivos, en orden creciente en cuanto a extensión, de vivero (0,04%), de uva para pasificación (0,25%), uva de mesa (2%) y uva de vinificación (97,75%). La producción de vino se ha mantenido estable en las últimas campañas cerca de los 40 millones de hectolitros. Castilla-La Mancha es la principal región productora con un 53% del total.

La producción de vinos de calidad supone el 60% del volumen total. España cuenta con 86 zonas de producción de vinos de calidad con Denominación de Origen Protegida (DOP), de ellas 73 son con **Denominación de Origen**, 2 con **Denominación de Origen Calificada** y 11 son **Vinos de Pago**, las cuales, siguiendo el modelo europeo de producción, mantienen un estricto control sobre la cantidad producida, las prácticas enológicas y la calidad de los vinos que se producen en cada zona.

Las exportaciones mundiales están encabezadas por Italia con 21,2 millones de hectolitros vendidos en el año 2012. España ocupa la segunda posición con 19,5 millones de hectolitros, seguida por Francia con 15 millones. De los tres países, España es el que más ha visto incrementar su exportación desde la década de los 80, pasando de representar un 12% a un 20% del comercio mundial.

I.2.2. El sector vitivinícola en Castilla y León

La vitivinicultura en Castilla y León tiene un papel de gran relevancia que va más allá de su importancia económica, puesto que el sector tiene una importante función social al permitir el mantenimiento de población en las zonas rurales, promoviendo el desarrollo de áreas industriales, constituyendo una base para el desarrollo rural e incluso convirtiéndose en un atractivo turístico, sin dejar de lado la importante función medioambiental de conservación del medio rural.

En esta Comunidad, el cultivo de la vid y la producción vinícola están plenamente consolidadas y tienen un arraigo histórico. Desde la Edad Media se encuentran referencias sobre las cualidades de los vinos del Duero. Las particulares condiciones del suelo y las características climáticas favorecen el cultivo de la vid en numerosas comarcas.

Castilla y León es la cuarta Comunidad Autónoma en hectáreas dedicadas al viñedo para vinificación con 74.841 ha, detrás de Castilla-La Mancha, Extremadura y la Comunidad Valenciana. La cosecha de uva para vinificación en 2013 fue de 230 millones de kilos, muy superior a los 194 millones de kilos del año anterior. La producción de vino y mosto en 2012 fue de 1,8 millones de hectolitros (Fuente: Fondo Español de Garantía Agraria, 2012).

En las últimas décadas el sector vitivinícola ha experimentado una rápida y favorable evolución. Los vinos amparados por las 9 **Denominaciones de Origen** de la Región (Ribera del Duero, Cigales, Rueda, Toro, Bierzo, Arlanza, Arribes, Tierras de León y Tierra del Vino de Zamora) las 2 Asociaciones **Vinos de Calidad** (Valles de Benavente y Valtiendas) y la figura genérica de calidad **Vino de la Tierra de Castilla y León**, que acoge cerca de 300 bodegas embotelladoras y más de 30.000 ha de viñedo, constituyen uno de los emblemas de la región y una muy buena promoción de la industria de Castilla y León, no sólo en España, sino también en los mercados extranjeros a los que se dirige una buena parte de la producción.

I.3. Patologías bacterianas de la vid

La vid se halla expuesta a las distintas condiciones ambientales del entorno que la rodea, viéndose afectada tanto por factores bióticos como abióticos que influyen en su desarrollo. Algunas de las interacciones con el medio biótico pueden provocar enfermedades en la planta, varias de ellas de grave impacto. Principalmente se deben a insectos, ácaros, hongos, bacterias y virus.

Dentro de las enfermedades producidas por bacterias destacan la agalla de corona de la vid, la enfermedad de Pierce, la podredumbre ácida del racimo, la flavescencia dorada y la necrosis bacteriana.

I.3.1. Agallas de corona de la vid

Las bacterias del género *Agrobacterium* pueden provocar la aparición de tumores, llamados agallas, en cuello y raíces de diferentes plantas cultivadas y silvestres, incluyendo numerosas especies de árboles frutales y el rosal.

La especie más frecuentemente implicada es *A. tumefaciens*, que tras ponerse en contacto con la célula vegetal, le transfiere determinados genes y la transforma en célula tumoral. La multiplicación anormal de las células y el desarrollo del tumor prosiguen sin que sea necesaria la presencia posterior de la bacteria, una vez desencadenada la inducción tumoral.

La vid es un cultivo susceptible de infección por *Agrobacterium*, aunque en este caso la especie implicada es casi específicamente *A. vitis* (Tzafira y Citovsky, 2003; Escobar y Dandekar, 2003).

La bacteria precisa de una herida o lesión para poder penetrar en la planta. Muchas veces las heridas se producen por efecto de heladas, granizo, ataques de parásitos, poda y otras técnicas culturales. *Agrobacterium* se puede detectar en la savia de la planta, desplazándose por los vasos. Puede permanecer latente durante años sin que se observen síntomas. Los tumores en cuello, raíz y sarmientos pueden tener distintos aspectos. Al principio son blandos y de color claro, y posteriormente se endurecen y oscurecen. Estas agallas impiden la circulación de la savia y la planta puede morir en 2 ó 3 años.

Los daños pueden ser muy graves en condiciones climáticas favorables, sobre todo tras fuertes heladas. El suelo donde se han cultivado plantas infectadas albergará bacterias patógenas durante un tiempo, pudiendo ser atacadas las nuevas plantaciones.

Debido a la confusión que puede haber con otras enfermedades, sólo con el análisis en laboratorio se puede confirmar la presencia de la bacteria.

La prevención es el mejor método de control, puesto que una vez que *A. tumefaciens* penetra en la planta es muy difícil de eliminar. Utilizar material vegetal sano, evitar la formación de heridas y el encharcamiento, el abonado equilibrado y desinfectar las tijeras durante la poda, son algunas de las prácticas recomendadas para prevenir la enfermedad. Las cepas con síntomas deberían ser eliminadas, si es posible, o en su caso eliminar los tumores o cortar los brazos más afectados, y desinfectar las heridas.

La incidencia en España es de escasa importancia, aunque se ha identificado en distintas zonas y son frecuentes los ataques de la enfermedad en vivero. (López, 2004).

I.3.2. Enfermedad de Pierce

Xylella fastidiosa es la bacteria causante de esta enfermedad de tipo vascular, que afecta al xilema de la planta. De hecho, a diferencia de otros patógenos bacterianos, el desarrollo de esta bacteria parece restringirse al sistema xilemático (Chatterjee y col., 2008). Aunque infecta a la vid, se sabe que no es específica de este cultivo, afectando también a cítricos, alfalfa, almendro y café, entre otros.

Los daños producidos por la enfermedad de Pierce en viñedo se consideran muy graves, puesto que en Estados Unidos ha supuesto la pérdida de miles de hectáreas de viñedos, limitando su cultivo en varias zonas vitícolas. En Europa no hay indicios de esta enfermedad, pero existe riesgo grave si se importan variedades infectadas. Además, el peligro

es mayor en los viñedos de la zona mediterránea debido a las favorables condiciones climáticas para su desarrollo.

La propagación de la enfermedad puede ser a través de material vegetal contaminado y por insectos vectores (McGaha y col, 2007). La gravedad del ataque viene condicionada por la mayor o menor virulencia de los aislados de *X. fastidiosa*.

Las hojas de las plantas afectadas presentan áreas cloróticas que toman color amarillo en las variedades blancas y rojo oscuro en las tintas. Estas hojas suelen ser de menor tamaño, irregulares y asimétricas. También se puede observar el efecto llamado “escaldado”, consistente en la desecación del parénquima foliar que toma un color pardo, y las zonas adyacentes se ponen amarillas o rojizas. Los racimos suelen producir frutos de menor tamaño, cayendo parte de los mismos e incluso secándose todo el racimo. La maduración en los sarmientos afectados se produce de forma irregular. La brotación en las plantas afectadas se retrasa, los sarmientos no se desarrollan normalmente, la cosecha disminuye, el sistema radicular decae y la planta muere. Las viñas vigorosas suelen ser las más atacadas. (Varela y col, 2001).

No existen tratamientos eficaces para las plantas afectadas, por lo que son aconsejables medidas preventivas como no utilizar material vegetal procedente de zonas en las que se ha detectado *X. fastidiosa*. Por ello suponen un peligro las importaciones clandestinas, ya que, el material importado de países donde se ha identificado la enfermedad, se debe someter a cuarentenas estrictas. En las zonas afectadas se recomienda luchar contra los insectos vectores y eliminar las plantas silvestres que pueden servir de huéspedes. (López, 2004).

I.3.3. Podredumbre ácida del racimo

Se trata de una patología que afecta principalmente al fruto de la vid. Entre los agentes capaces de provocar la podredumbre ácida se señalan las especies *Acetobacter* sp., *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyopsis vini*. Estos microorganismos se propagan por el viento, la lluvia, los pájaros y la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) (Marchetti y col., 1984).

Las condiciones climáticas influyen sobre el desarrollo de la enfermedad, siendo favorables la temperatura y humedad altas, así como las finas lluvias que hidratan las uvas, sirviendo de vía de entrada para la infección (Toledo y Albuje, 1984). Las rajadas que se producen en algunas uvas, son un tipo de herida en la que se pueden instalar las bacterias que causan la podredumbre ácida.

Los frutos afectados se descomponen interiormente y su jugo se vacía, pudiendo caer sobre granos inferiores del racimo, o incluso gotear al suelo. Es característico el olor a vinagre (ácido acético) que desprenden los racimos infectados. En las uvas en descomposición se puede observar la mosca del vinagre.

Los efectos en la uva destinada a vinificación se traducen en mostos con mayor contenido en acidez volátil y acidez total, disminución del grado alcohólico y menor cantidad de azúcar.

Como medidas preventivas se pueden señalar las siguientes: evitar viñas excesivamente vigorosas, orientar las espalderas y podas para favorecer la ventilación de los racimos, tratar de producir racimos de tamaño medio y que sean más alargados y sueltos, y un buen estado fitosanitario. En caso de que ya exista infección en la planta, habría que limpiar los racimos afectados.

Esta enfermedad se ha observado en cultivos de vid de la zona mediterránea, así como en zonas del interior de España como La Rioja. (Toledo, 2004).

I.3.4. Flavescencia dorada

El agente patógeno es un micoplasma transmitido por un cicadélido, *Scaphoideus titanus* Ball, que vive únicamente en la vid, y que puede provocar una drástica disminución de la producción y la muerte de las cepas. Los daños vienen derivados de las alteraciones que el fitoplasma produce en los vasos conductores de savia (Batlle y col., 1997).

Las cepas enfermas presentan en algunas variedades un porte llorón. Los sarmientos no se endurecen, permaneciendo flexibles, y el color evoluciona a marrón rojizo, ennegreciéndose a lo largo del invierno. Normalmente las hojas se vuelven duras, quebradizas y se enrollan hacia el envés, adquiriendo una coloración amarilla en las variedades blancas o roja en las variedades tintas. Los racimos se desecan y marchitan, las uvas aparecen arrugadas y no terminan de madurar, teniendo una acidez muy acentuada y menor contenido en azúcares¹. Los síntomas suelen aparecer en primavera y verano.

Para el control de la flavescencia dorada se recurre a la lucha preventiva. Se debe evitar introducir plantas atacadas o portadoras de huevos del insecto, eliminar las plantas afectadas y utilizar tratamientos químicos contra el vector (Steffek y col., 2007).

¹Fuente: Boletín fitosanitario 2011, Junta de Castilla y León.

I.3.5. Necrosis bacteriana

La necrosis bacteriana es una enfermedad crónica y destructiva del sistema vascular de la vid, causada por la bacteria *Xylophilus ampelinus*, y que afecta a muchos cultivos de la región mediterránea y de Sudáfrica, principalmente.

El microorganismo se introduce en la planta a través de las heridas provocadas por la poda, laboreo del suelo o injertos. Las yemas y los brotes jóvenes contaminados se desecan y mueren. Normalmente los brotes afectados presentan un oscurecimiento parcial y una ligera hinchazón de los tejidos, que se agrietan y después se necrosan. Las hojas pueden presentar partes secas en el peciolo y pequeñas manchas de aspecto aceitoso dispersas en el limbo. Los brotes florales se ennegrecen y se secan.

En el apartado I.4 de esta introducción se hablará de forma más detallada de esta enfermedad, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

I.4. La necrosis bacteriana de la vid

La necrosis bacteriana es una patología conocida desde finales del siglo XIX. En distintos países del sur de Europa y en Sudáfrica se describieron una serie de enfermedades de la vid muy similares, pero a las que se las denominó de diferente forma puesto que se desconocía su etiología. En Francia se observaron síntomas en viñedos de la isla de Oléron, por lo que la enfermedad se conocía como “maladie d’Oléron” (Ravaz, 1895). Más adelante pasó a llamarse “nécrose bactérienne” en toda Francia. En Grecia se denominó “tsilik marasi”, en Sudáfrica “vlamsiekte” y “bacterial blight”, en Italia “mal nero”, y “necrosis bacteriana” en España.

Durante años se intentó identificar el agente causante, sin éxito alguno. En un principio se consideró que era *Erwinia vitivora*, hasta que en 1969 Panagopoulos aisló e identificó en Creta (Grecia) el microorganismo causante de la enfermedad, la bacteria que denominó *Xanthomonas ampelina* (Panagopoulos, 1969). Posteriormente, se logró aislar esta bacteria en otros países, confirmando así que las enfermedades descritas en Francia (Prunier y col., 1970), Sudáfrica (Matthee y col., 1970) e Italia (Grasso y col., 1979), eran las mismas y tenían una causa común.

Estudios más recientes, basados en el análisis de la secuencia de ADN y ARN, han situado a esta bacteria en una rama filogenética separada, formando un nuevo género

denominado *Xylophilus*, integrado por una única especie llamada *Xylophilus ampelinus* (Willems y col., 1987 a y b).

La necrosis bacteriana de la vid, a pesar de su larga historia, está poco estudiada y no hay mucha información disponible. La mayor parte de los datos bibliográficos existentes proceden de Francia, España y, en menor medida, de Grecia. El impacto económico de la enfermedad puede ser importante, ya que una infección severa en cultivos sensibles puede conllevar grandes pérdidas en la cosecha, como ha sucedido en Sudáfrica y Francia (Grall y col., 2005)

I.4.1. Distribución geográfica

La distribución de *Xylophilus ampelinus* no está bien documentada en la mayoría de los países. La enfermedad está en expansión en muchos de ellos y los datos existentes, excepto los de Francia, no son recientes. Aunque predomina la distribución por la región mediterránea, también se han dado casos de necrosis bacteriana en Sudáfrica y áreas de Asia y Sudamérica.

Se ha aislado e identificado *X. ampelinus* en Grecia, Francia, Italia, España, Moldavia, Sudáfrica (EPPO, 2009) y Eslovenia (Dreo y col., 2005). También se han incluido Portugal y Turquía en las listas EPPO/CABI (1997), aunque no está confirmada su identificación. Estas mismas listas citan a Bulgaria, Suiza, Túnez, Yugoslavia y Argentina como países donde se han observado alguna vez síntomas atribuidos a *Erwinia vitivora*, pero en los que no se ha aislado por el momento *X. ampelinus*. La enfermedad sigue aún activa en Francia (Manceau y col., 2005), Sudáfrica, Moldavia, Eslovenia, Italia y Grecia (<http://www.cabi.org>).

I.4.2. La necrosis bacteriana en España

La detección de *X. ampelinus* en España data de 1978 (López y col., 1978; López y col., 1980), en Zaragoza, denominándose la enfermedad como “necrosis bacteriana de la vid”.

Posteriormente se encontraron nuevos focos en La Rioja, Orense, Navarra y Pontevedra. Los síntomas fueron confundidos en muchas zonas con otros problemas fitopatológicos como la excoriosis. Pero ante la ineficacia de los tratamientos químicos y la importancia de los daños, se analizaron muestras en laboratorio identificando la bacteria causante.

En la Denominación de Origen de Somontano (Huesca) tan sólo hay constancia de la detección de *X. ampelinus* en un caso del año 1983. En Teruel se localizó un foco en 1985. En la

D.O. Rioja, la bacteria fue detectada en 1979 en Manjarrés. Zaragoza es la provincia más afectada, con unas 10.000 ha. En La Rioja y Navarra los daños hasta el momento han sido de escasa importancia (López y col., 1987), y la incidencia en Galicia está todavía en estudio (Gracia y col., 2004). Síntomas similares a los de la necrosis bacteriana se han observado en las Islas Canarias, pero no está confirmado su diagnóstico (Willems y col., 2006). Es probable que haya más zonas vitícolas que presenten infección por *X. ampelinus*.

I.4.3. Epidemiología

El único huésped conocido de *X. ampelinus* es la vid. La bacteria vive principalmente en el sistema vascular de la planta, donde puede permanecer mucho tiempo sin causar daños.

La penetración en el huésped tiene lugar principalmente por las heridas de poda, aunque también pueden producirse contaminaciones externas de las yemas por el depósito de bacterias procedentes de los “lloros”. Durante el invierno permanecen en el interior de la vid, pudiendo multiplicarse durante este periodo. En primavera y verano, las bacterias pueden ser llevadas de una planta a otra por el viento y la lluvia. La infección a través de las raíces es menos frecuente, puesto que la supervivencia de la bacteria en el suelo es pequeña (Grall y col., 2005).

La propagación de la enfermedad no está asociada a insectos vectores, sino que se produce a partir de plantas enfermas. A largas distancias se produce por el traslado de material vegetal contaminado, pudiendo ser el origen de la aparición de la patología en nuevas zonas. La transmisión a corta distancia tiene lugar, además de por el material vegetal, por las herramientas de poda no desinfectadas, y por el transporte a través del viento y de la lluvia de las bacterias que salen al exterior en los “lloros”, en las lesiones foliares y en los chancros. Las podas realizadas en verde y la vendimia son operaciones que producen heridas en las plantas y pueden contribuir a la diseminación de la bacteria. Una vez producida la infección, se extiende por la planta por vía vascular, siendo los brotes cercanos a los cortes de poda los más afectados por lo general (Grall y Manceau, 2003).

I.4.4. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad

Las diferentes descripciones realizadas a lo largo del tiempo sobre la necrosis bacteriana coinciden en señalar que se trata de una enfermedad cíclica, mostrando periodos de abundantes síntomas, desapareciendo aparentemente en otros (Héritier, 1983).

Uno de los factores más importantes es el clima. Durante los periodos de sequía, la enfermedad puede permanecer latente largo tiempo sin presentar síntomas. Sin embargo, las primaveras con temperaturas relativamente bajas, vientos frescos y frecuentes lluvias, favorecen el desarrollo de la enfermedad, produciéndose infecciones foliares. Si el otoño es lluvioso y con temperaturas suaves, favorecerá las infecciones durante la vendimia.

El incremento de heridas debido a heladas, granizo, ataques parasitarios u otras causas, favorece el ataque de la bacteria.

La poda fuera del periodo de reposo vegetativo, el enterrado de los sarmientos de poda, el exceso de abonos orgánicos y nitrogenados, y la inundación de las parcelas, aumentan los daños de *X. ampelinus*.

Existen además, variedades de vid más sensibles a la enfermedad que otras. En una escala de sensibilidad de las variedades cultivadas en España, serían muy sensibles: Airen, Bobal, Garnacha tintorera, Juan Ibáñez y Vidadillo; medianamente sensibles: Garnacha basta, Garnacha peluda, Garnacha rosada, Graciano, Granegro, Macicillo, Malvasia, Miguel de Arcos, Palomino, Quebratinajas, Rosetti, Tempranillo, Tinto del país, Tinto de Toro y Sumoll; y poco sensibles: Cardinal, Garnacha negra, Macabeo, Mazuela, Merseguera, Monastrell, Pedro Ximénez, Tinto de Madrid y Trepát. (López y col., 1987; López, 2004).

I.4.5. Síntomas y daños

Los diferentes síntomas que presentan las cepas afectadas son muy característicos, pudiendo haber diferencias según las características de las variedades cultivadas.

Las yemas afectadas pueden no brotar o hacerlo con dificultad, retrasándose el inicio de la vegetación. Los brotes pueden crecer raquíticos y en muchos casos se secan.

Durante el crecimiento, los sarmientos muestran necrosis sobretodo en la parte basal. Aparecen unas manchas alargadas de color pardo oscuro o negro, con un margen aceitoso, y que se agrietan longitudinalmente (Figura I.1), liberando grandes cantidades de bacterias. A medida que la bacteria va profundizando en los tejidos, se forman chancros de varios centímetros de largo que pueden afectar al leño. Los sarmientos se debilitan, arqueándose hacia el suelo y pudiendo romperse con facilidad. En un corte a nivel del xilema, se puede ver una línea oscura o una zona con necrosis sectorial que afecta al floema, al xilema e incluso a la médula.



Figura I.1. Detalle de sarmiento con grietas causadas por la infección.

Las hojas, sobre todo las más viejas situadas en la base del sarmiento, pueden presentar manchas en el limbo de color rojizo u oscuro, de aspecto aceitoso, rodeadas de un halo amarillento. Este síntoma suele observarse tras lluvias y vientos, debido a la entrada de *X. ampelinus* por los estomas. También se puede producir un desecamiento marginal de las hojas, llegando a decolorarse y desprenderse (Figuras I.2 y I.3).



Figura I.2. Hoja afectada por necrosis bacteriana.

En los racimos aparecen necrosis y chancros, de aspecto similar a los de los sarmientos, en el pedúnculo y raquis. Las flores suelen adquirir una coloración rojiza y endurecer su consistencia. La producción de uva disminuye notablemente e incluso puede llegar a ser nula.

La infección de *X. ampelinus* en condiciones climáticas favorables para su desarrollo puede ocasionar la muerte de la planta en pocos años.

I.4.6. Protección y control de la enfermedad

El control de la necrosis bacteriana se ve dificultado por las características epidemiológicas de la enfermedad, los síntomas que pueden confundirse con relativa facilidad con otras enfermedades como la excoriosis y la eutipiosis, y por la escasez de productos fitosanitarios efectivos que se pueden utilizar en agricultura contra enfermedades bacterianas.

El diagnóstico visual no ofrece garantías suficientes, pudiendo no ser correcto y aconsejando tratamientos que no serán eficaces. Es necesario analizar las muestras para poder detectar la bacteria. La legislación española vigente (RD 2071/1993) prohíbe la comercialización de plantas infectadas con *X. ampelinus*, aunque no existe ningún requisito oficial que exija la realización de análisis en zonas libres de la enfermedad.



Figura I.3. Detalle de hoja con síntomas de la enfermedad.

La prevención es la mejor forma de combatir los ataques de *X. ampelinus*, evitando introducir la enfermedad en plantaciones y regiones no afectadas. Por ello, se debe elegir material sano, procedente de zonas libres de la enfermedad, para realizar nuevas plantaciones o para reponer cepas. Además, de entre las variedades más adecuadas para la zona, se deben elegir las menos sensibles a la bacteria.

En zonas en las que ya existe la enfermedad, se deben tener una serie de precauciones como eliminar las plantas enfermas y quemarlas, realizar la poda en periodo de reposo vegetativo de las cepas comenzando por las de aspecto sano, desinfectar las tijeras de poda cada cierto tiempo, quemar los restos vegetales y no inundar las parcelas afectadas.

Además de las prácticas culturales, el tratamiento con agua caliente de los sarmientos es una forma eficiente de prevenir la propagación, mediante la eliminación de *X. ampelinus* del material vegetal (Manceau, 2006).

En cuanto a los productos químicos más habitualmente utilizados, destacan los compuestos con contenido en cobre. Entre las distintas formulaciones, el cardo bordelés

(mezcla de sulfato cúprico y cal hidratada) es el que posee las características físico-químicas más adecuadas. Sin embargo, la necrosis bacteriana es una enfermedad fundamentalmente vascular, y el poder de penetración del cobre es débil y sólo permite el control de la fase externa de la enfermedad (Marcelin y Novoa, 1983), por lo que se trata de una solución preventiva. Por otro lado, el cobre es evitado cada vez más por los viticultores, ya que puede producir alteraciones del aroma y sabor, causar olores no deseables, acumularse en los suelos y producir fitotoxicidad (Jackson, 2008; Darriet y col., 2001; Rathore y col., 2001).

Recientemente, se ha demostrado la eficacia del péptido antimicrobiano D4E1 contra la infección de la planta de vid por parte de *Xylophilus ampelinus*. El título bacteriano de este patógeno, tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos en plantas, disminuye significativamente tras la aplicación de este péptido (Visser y col., 2012).

Xylophilus ampelinus

Xylophilus ampelinus es un microorganismo fitopatógeno causante de la necrosis bacteriana de la vid (*Vitis vinifera*), que infecta exclusivamente a esta planta, y que está incluida en la lista EPPO A2 de organismos de cuarentena (EPPO/CABI, 1997), y en el Anexo II/A2 de la Directiva 2000/29/CE de organismos nocivos para los vegetales cuya introducción y propagación debe prohibirse en toda la UE. Su poder patógeno es variable, siendo algunas cepas totalmente avirulentas y otras muestran distinta agresividad según las variedades de vid.

I.5.1. Taxonomía

X. ampelinus es una bacteria perteneciente a la familia *Comamonadaceae* de la subclase *Beta-proteobacteria*. Fue inicialmente clasificado en el género *Xanthomonas*, ya que es un organismo Gram negativo, aerobio, no formador de endosporas, que posee un flagelo polar, produce un pigmento amarillo y metaboliza los hidratos de carbono oxidativamente. Se consideró que era una especie atípica del género *Xanthomonas* no descrita antes, por lo que se la denominó *X. ampelina* sp. nov. (Panagopoulos, 1969). Posteriormente, varios estudios de análisis de pigmentos (Starr y col., 1977), estudios comparativos de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Whitaker y col., 1981; Byng y col., 1983) y estudios de hibridación ADN-ARNr (De Vos and De Ley, 1983), evidenciaron diferencias con el resto de especies del género. Como resultado de un estudio de más de 30 cepas de diferentes orígenes geográficos mediante

electroforesis de proteínas (geles SDS de poliacrilamida), varias pruebas enzimáticas, e hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARNr, se creó un nuevo género al que se llamó *Xylophilus* (Willems y col., 1987), miembro de la familia *Comamonadaceae* (previamente llamado “complejo acidovorans ARNr”).

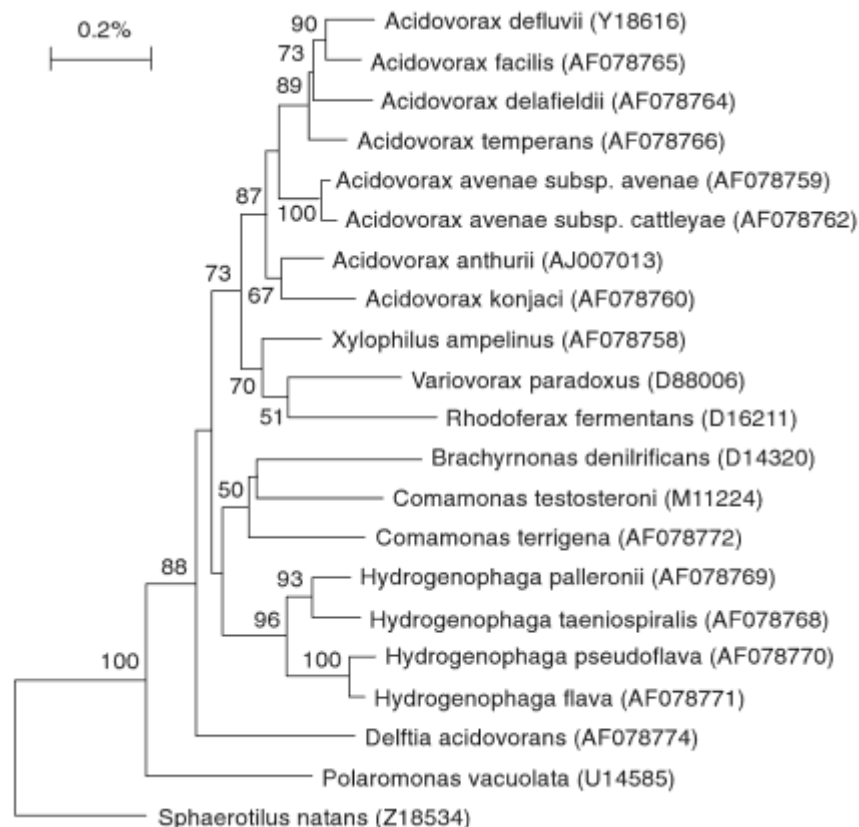


Figura I.4. Dendrograma representativo de la similitud de la secuencia del ADNr 16S, mostrando la posición de *X. ampelinus* respecto a otros miembros de la familia *Comamonadaceae*. (Willems y Gillis, 2006)

Más recientemente, la secuenciación del ADNr 16S de *Xylophilus ampelinus* y otros miembros de *Comamonadaceae*, reveló la estrecha relación entre *Xylophilus ampelinus* y *Variovorax paradoxus* (Wen y col., 1999), aunque diferencias en las características metabólicas de cada bacteria hacen que se mantengan en géneros separados (Figura I.4).

I.5.2. Caracterización de *X. ampelinus*

Es una bacteria Gram negativa, no formadora de endosporas, móvil con un flagelo polar, oxidasa negativa, catalasa positiva, que utiliza lentamente la glucosa en aerobiosis. Crece sobre L-glutamina pero no sobre lactato de calcio, en contraste con las cepas de *Xanthomonas*. La temperatura máxima de crecimiento es de 30 °C y la mínima de 6 °C. El contenido en G+C del ADN es del 68 %.

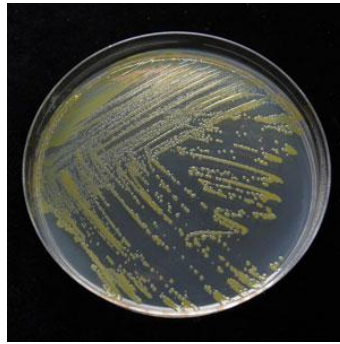


Figura I.5. Crecimiento de *X. ampelinus* en medio NA.

Las colonias de *X. ampelinus*, atendiendo a los caracteres que presentan en agar nutritivo (NA) (Panagopoulos, 1969) y en extracto de levadura-peptona-glucosa-agar (LPGA) (Ridé y col., 1983), muestran un crecimiento muy lento, lo cual las diferencia de otras especies de pigmento amarillo de la familia *Comamonadaceae*. A la temperatura óptima de crecimiento, 24 °C, en NA, las colonias son redondas, enteras, brillantes, translúcidas, de color amarillo pálido (Figura I.5.). En LPGA, las colonias aparecen a los 5-10 días, ligeramente pigmentadas de amarillo (Figura I.6), adquiriendo un color más oscuro con el tiempo. Este pigmento puede difundirse en el medio LPGA, coloreándolo de marrón.

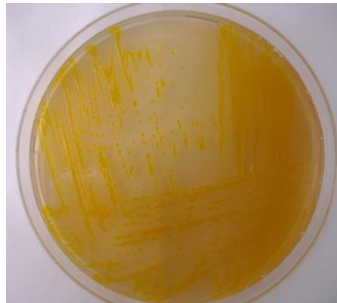


Figura I.6. Crecimiento de *X. ampelinus* en medio LPGA.

I.5.3. Detección

Los métodos de identificación incluyen tanto visualización de caracteres morfológicos, como análisis de aspectos biológicos a través de test bioquímicos y técnicas serológicas (inmunofluorescencia, ELISA). La diferenciación de *X. ampelinus* de otros microorganismos de crecimiento lento es posible mediante reacción Gram, test de catalasa y oxidasa, producción de ureasa y lipólisis de Tween 80 (Serfontein y col., 1997). Para una rápida identificación del patógeno se utilizan test serológicos con anticuerpos específicos (Erasmus y col., 1974).

En los últimos años, la identificación ha ido evolucionando hacia una aproximación más molecular, mediante ensayos de PCR anidada para la detección de *X. ampelinus* en plantas de vid (Botha y col., 2001). Este método se basa en la amplificación de parte de la región espaciadora intergénica del ADNr 16S-23S, y presenta como principales ventajas su sensibilidad, precisión y rapidez. Más recientemente, se ha diseñado un protocolo de PCR en tiempo real para una detección fiable de este patógeno (Dreo y col., 2007). Este método ha sido desarrollado para evitar los riesgos asociados a la manipulación de los productos de PCR, tales como contaminación cruzada entre muestras, ya que no es necesario un procesamiento posterior.

I.6. Objetivos

La necrosis bacteriana es una enfermedad que puede extenderse con facilidad y llegar a provocar grandes pérdidas económicas en viñedos de todo el mundo. El estudio de la bacteria que provoca esta patología, *Xylophilus ampelinus*, es fundamental. Por ello, los objetivos que se plantearon al inicio de este trabajo fueron los siguientes:

1. Desarrollo de una metodología para la valoración de la virulencia de *X. ampelinus*.
2. Aislamiento de mutantes avirulentos o con virulencia atenuada de *X. ampelinus*.
3. Análisis proteómico de *X. ampelinus*.
4. Identificación de factores de patogenicidad de *X. ampelinus*.



Materiales y Métodos

II.1. Microorganismos utilizados

II.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

***Escherichia coli* DH5 α** (Hanahan, 1983). Cepa utilizada habitualmente para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN) y baja tasa de recombinación. Presenta una delección en el gen *lacZ* del operón *lac*, susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación. Esta α -complementación produce una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la α -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), previamente añadido al medio de cultivo. Genotipo: F⁻ (ϕ 80d *lacZ* Δ M15) Δ (*lacZYA-argF*)U169 *thi-1 recA1 relA1 endA1 hsdR17* (*r_K⁻, m_K⁺*) *gyrA96 supE44* λ ⁻.

***Escherichia coli* LE392** (Maniatis y col., 1982). Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago λ y sus derivados, provocando lisis celular. Se utilizó en infecciones en medio líquido para el aislamiento de ADN de bacteriófagos de interés. Genotipo: e14⁻ (*McrA*-) *hsdR514 supE44 supF58 lacY1 galK2 galT22 metB1 trp55*.

***Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2**. Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago λ y sus derivados, provocando lisis celular. Se trata de una cepa lisogénica para el fago P2 y, por tanto, capaz de inhibir la capacidad infectiva de los bacteriófagos λ con genes *red* y *gam* activos. Se utilizó para la selección específica de fagos recombinantes en la construcción de una genoteca de ADN genómico en el vector λ -DASH II y para infecciones en medio sólido. Genotipo: Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac*.

***Escherichia coli* TransforMaxTM EC100DTM pir-116 (Epicentre)**. Cepa comercial utilizada para electroporación con vectores que contienen el origen de replicación R6K γ . Contiene el gen *pir-116* unido a un marcador de una hidrofolato reductasa (DHFR). Presenta una alta eficiencia de transformación (hasta 5×10^9 transformantes/ μg de ADN). Genotipo: F⁻ *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80d*lacZ* M15 *lacX74 recA1 endA1 araD139* (*ara, leu*)7697 *galU galK rpsL nupG pir-116*(DHFR).

***Escherichia coli* One Shot[®] Mach1TM-T1^R (Invitrogen)**. Cepa comercial utilizada para experimentos de transformación con el vector pET SUMO. Posee una elevada eficiencia de

transformación ($\geq 1 \times 10^9$ transformantes/ μg ADN). Genotipo: $F^- \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(r_{-k}, m_{-k}^+) recA1398 endA1 tonA$.

***Escherichia coli* BL-21(DE3)** (Studier y Moffat, 1986). Cepa utilizada para la expresión de genes regulados por el promotor T7. La designación DE3 indica que esta cepa es un lisógeno DE3 lambda, el cual contiene el gen para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. La expresión de la T7 ARN polimerasa se induce mediante IPTG. Su eficiencia de transformación es alta ($\geq 1 \times 10^8$ transformantes/ μg ADN). Genotipo: $F^- ompT hsdS_B (r_{-B}, m_{-B}^-) gal dcm$ (DE3).

***Escherichia coli* BL-21(DE3)pLysS**. Cepa utilizada para la expresión de genes tóxicos. La cepa BL-21(DE3)pLysS contiene el plásmido pLysS, que produce lisozima T7, la cual se une a la T7 ARN polimerasa e inhibe la transcripción. El resultado es una reducción de los niveles basales de polimerasa. Esta cepa presenta resistencia a cloranfenicol.

II.1.2 Cepas de *Xylophilus ampelinus*

***Xylophilus ampelinus* CFBP2098**. Cepa silvestre procedente del INRA (Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France), aislada en 1979 por Ridé M.

II.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave, a 121 °C durante 20 minutos. Para la obtención de medios sólidos, salvo excepciones indicadas, se añade 2% (p/v) de agar a la composición de cada medio.

II.2.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Medio LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972): Bacto-triptona, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 10 g/l. Se ajusta el pH a 7,5.

Medio NZY (Miller, 1972): NZ amina tipo A, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 5 g/l; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l. Se ajusta el pH a 7,5. Para medio sólido se añade agar al 2%, salvo cuando se utilice como cobertera, en cuyo caso se añade agar al 0,7%.

Medio SOB (Hanahan, 1983): Bacto-triptona, 20 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 0,5 g/l; KCl, 0,186 g/l. Se ajusta el pH a 7. Se utiliza agua Milli-Q. Antes de utilizar el medio se le añade 1 ml de una solución de MgSO_4 1 M y 1 ml de MgCl_2 1 M, ambas previamente esterilizadas. Este medio se utiliza para obtener células competentes.

Medio SOC. Para preparar este medio se parte de medio SOB, al que se añade glucosa 20 mM.

Medio GYT (Tung y Chow, 1995): Triptona, 25 g/l; extracto de levadura, 12,5 g/l; 10% glicerol (p/v). Este medio se utiliza en la preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.

Medio TB (Terrific-Broth) (Tartof y Hobbs, 1987): Bacto-triptona, 12 g; extracto de levadura, 24 g; glicerol, 4 ml. Se añade agua hasta 900 ml. Una vez esterilizado se añaden 100 ml de la siguiente solución de sales: KH_2PO_4 0,17 M; K_2HPO_4 0,72 M. Este medio está formulado especialmente para incrementar el rendimiento de ADN plasmídico obtenido a partir de clones transformantes.

II.2.2. Medios de cultivo para *Xylophilus ampelinus*

Medio LPGA (Ridé y col., 1983): Bacto-peptona, 7 g/l; extracto de levadura, 7 g/l; glucosa, 7 g/l. Para medio sólido se añade agar al 1,5%.

Medio GYCA (Willems y col., 1987b): Extracto de levadura, 5 g/l; glucosa, 1 g/l; CaCO_3 , 30 g/l; agar, 20 g/l. El agar y el CaCO_3 se preparan y esterilizan por separado del resto de componentes.

Medio YGC (Panagopoulos, 1969): Extracto de levadura, 10 g/l; galactosa, 20 g/l; CaCO_3 , 20 g/l; agar, 20 g/l. El agar y el CaCO_3 se preparan y esterilizan por separado del resto de componentes.

Medio NB (Nutrient Broth): 8 g/l de un preparado formado por peptona de carne 5 g/l y extracto de carne 3 g/l. En el caso de medio sólido NA (Nutrient Agar) se añadió agar al 1,5%.

Medio TSB (Sambrook y Russell, 2001): Tripticaseína de soja, 30 g/l. Se ajusta el pH a 7,2.

II.2.3. Suplementos de los medios

En determinados casos fue necesario añadir a los medios de cultivo algún tipo de suplemento. Todos estos componentes se esterilizaron por filtración, a excepción de los que van disueltos en solventes orgánicos, que no fueron esterilizados. Todos se conservaron en forma de solución y a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadieron al medio estéril a partir de la solución concentrada.

II.2.3.1. Antibióticos

Ácido nalidíxico. Utilizado para evitar el crecimiento de *E. coli*, se preparó a una concentración 100 mg/ml en NaOH 0,15 M y agua Milli-Q.

Ampicilina. Preparada en solución acuosa a una concentración de 200 mg/ml. Para la selección de transformantes se empleó a una concentración final de 100 µg/ml.

Apramicina. Utilizada para ensayos de resistencia a antibióticos. Se preparó en solución acuosa de sulfato de apramicina a una concentración de 100 mg/ml.

Cefalexina. Antibiótico del grupo de las cefalosporinas, utilizado para ensayos de resistencia a antibióticos. Se preparó en solución acuosa a una concentración de 100 mg/ml.

Cloranfenicol. Utilizado para ensayos de resistencia a antibióticos. Se preparó en etanol al 70% a una concentración de 50 mg/ml.

D-Cicloserina. Utilizada para ensayos de resistencia a antibióticos. Preparada en solución acuosa a una concentración de 2 mg/ml en agua Milli-Q.

Espectinomicina. Antibiótico bacteriostático, utilizado para ensayos de resistencia a antibióticos. Se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) al 50% (v/v) a una concentración de 100 mg/ml.

Estreptomicina. Antibiótico bactericida, preparado en solución acuosa a una concentración de 100 mg/ml. Se utilizó para ensayos de resistencia a antibióticos.

Higromicina. Utilizada para ensayos de resistencia a antibióticos. Se preparó en solución acuosa a una concentración de 100 mg/ml.

Kanamicina. Antibiótico bactericida de amplio espectro de acción, preparado en solución acuosa a una concentración de 100 mg/ml.

Trimetoprima. Antibiótico bacteriostático, preparado en solución en DMSO a una concentración de 2 mg/ml. Se utilizó para ensayos de resistencia a antibióticos.

II.2.3.2. Otros aditivos

IPTG (1-isopropil-β-D-galactopiranosido). Se preparó a una concentración de 200 mg/ml en agua. Para la selección de transformantes se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Se preparó a una concentración de 20 mg/ml en dimetilformamida. Se utilizó a una concentración final de 50 μ g/ml. Se conservó protegido de la luz a -20 °C.

II.3. Vectores fágicos y plasmídicos

II.3.1. Vectores plasmídicos

pBluescript II KS (+). Fagémido multicopia de *E. coli* de 2,9 kb, derivado del plásmido pUC19 (ambos comercializados por Stratagene), presentando un mayor número de dianas de restricción para la inserción de fragmentos exógenos de ADN. El policonector de clonación se halla flanqueado por los promotores de los fagos T3 y T7, lo cual permite la transcripción de ADN exógeno en determinadas condiciones.

Incluye un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α de la β -galactosidasa) capaz de complementar la mutación presente en la β -galactosidasa de algunas cepas de *Escherchia coli* portadoras de la delección *lacZ* Δ 15. Esta α -complementación permite la aparición de color azul en presencia de IPTG (inductor del gen *lacZ*) y de X-gal (análogo estructural de la galactosa y responsable de la aparición del color azul).

La inserción de un fragmento de ADN foráneo dentro del sitio de clonación provoca la interrupción del gen *lacZ*. Además posee un gen de resistencia al antibiótico β -lactámico ampicilina (β -lactamasa codificada por el gen *bla*), que permite la selección de transformantes.

La designación KS indica la orientación del sitio de clonación múltiple (5'-*KpnI*....*SacI*-3') respecto al extremo 5' del gen *lacZ*, mientras que SK denotaría la orientación contraria. Para conseguir la obtención de ADN de cadena sencilla, estos vectores poseen el origen de replicación monocatenario del fago f1. El símbolo (+) indica que la cadena rescatada al obtener ADN monocatenario es la codificante para el fragmento del gen *lacZ* y el símbolo (-) significaría que la cadena de ADN es la complementaria.

pHMI. Plásmido de 12,8 kb derivado del plásmido pRI40 (Innes y col., 1988). Presenta resistencia a espectinomicina y estreptomycin. Incluye el gen *mob*, necesario para la transferencia de ADN desde una cepa hospedadora mediante conjugación.

pK18*mobsacB* (Schäfer y col., 1994). Plásmido de 5,66 kb, que contiene una copia del gen *sacB*, que codifica para una enzima que convierte la sacarosa en levansacarosa, que es tóxico para la célula. Incluye un fragmento del gen *lacZ* y el gen de resistencia a kanamicina.

pET SUMO. Plásmido, comercializado por Invitrogen, utilizado para la expresión de proteínas de fusión recombinantes. Tiene un tamaño de 5,64 kb. La proteína obtenida contiene una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal. El sitio de clonaje es de tipo TA, con un residuo de timina en sus extremos, e incluye el promotor *T7lac*. Contiene el gen de resistencia a kanamicina.

II.3.2. Vectores fágicos

λ-DASH II. Vector comercial de Stratagene. Es un vector fágico de reemplazamiento que se usa para clonar fragmentos grandes de ADN (de 15 a 23 kb). Los bacteriófagos lambda intactos presentan en su región central los genes activos *red* y *gam*, y no son capaces de infectar cepas bacterianas lisogenizadas por el fago P2, como es el caso de XL-1 Blue MRA P2. En cambio, los fagos en los que ha habido un reemplazamiento de la zona central por el inserto que queremos clonar, pueden propagarse utilizando estas cepas hospedadoras.

II.4. Mantenimiento y cultivo de microorganismos

II.4.1. Crecimiento de cepas de *E. coli*

El cultivo de *E. coli* se llevó a cabo en medio LB o TB, en matraz para cultivo líquido, o en placa para cultivo en medio sólido. La temperatura de incubación fue 37 °C, y la agitación 220 rpm (en el caso de cultivo líquido). Cuando el experimento así lo requería, los medios de cultivo fueron suplementados con diversas soluciones y/o antibióticos.

II.4.2. Crecimiento de cepas de *X. ampelinus*

El cultivo líquido de *X. ampelinus* se hizo en medio TSB o LPG, en matraz, incubándolo a 24 °C y 220 rpm. Para crecimiento en medio sólido, se utilizaron placas con medio LPGA, incubándolas a 24 °C de 5 a 7 días. En algunos casos fue necesario suplementar el medio con soluciones y/o antibióticos.

II.4.3. Mantenimiento de microorganismos

La conservación de cepas bacterianas se realizó de diferente manera según el tiempo de almacenamiento requerido. Para periodos de 2 a 4 meses, se mantuvieron en placas petri selladas con Parafilm® a 4 °C. Para la conservación durante periodos de tiempo más prolongados se realizaron suspensiones en glicerol al 40% y se conservaron a -20 °C o a -80 °C.

II.4.4. Estimación del crecimiento de los cultivos líquidos bacterianos

Cuando fue necesario, el crecimiento de los cultivos líquidos fue estimado basándose en la absorbancia de los mismos frente a una longitud de onda de 600 nm, determinada con la ayuda de un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

II.5. Métodos de extracción y análisis de ADN

II.5.1. Extracción de ADN

II.5.1.1. Limpieza y precipitación del ADN de una solución

La eliminación de proteínas y otras impurezas de las soluciones de ADN, se realizó mediante un proceso de extracción con fenol y cloroformo:

- ✓ Añadir a la solución de ADN 1 volumen de fenol-CIA¹ y agitar bien.
- ✓ Centrifugar la mezcla 6 minutos a 10000 rpm.
- ✓ Pasar la fase acuosa a otro tubo. Repetir el proceso hasta que la solución de ADN presente la interfase libre de impurezas.
- ✓ Añadir 1 volumen de CIA a la fase acuosa, para eliminar los restos de fenol.
- ✓ Agitar y centrifugar la mezcla durante 5 minutos a 10000 rpm. Recuperar la fase acuosa.

Para la precipitación, se induce la pérdida de solubilidad en agua del ADN mediante la adición de sales y un alcohol:

- ✓ Añadir a la solución de ADN 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (mantenido a -20 °C). Como alternativa al etanol, se puede utilizar 0,6 volúmenes de isopropanol (2-propanol) a temperatura ambiente.
- ✓ Mantener la mezcla al menos durante 2 horas a -20 °C o 30 minutos a -80 °C. centrifugar a 10000 rpm durante 30 minutos y a 4 °C.
- ✓ Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 volumen de etanol 70%, y centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
- ✓ Resuspender en agua o en tampón TE². Conservar a 4 °C o a -20 °C durante largos periodos de tiempo.

¹ **Fenol-CIA:** ½ volumen de fenol neutro pH 7,4 y ½ volumen de CIA. CIA (Cloroformo-alcohol isoamílico): mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.

² **TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0; en agua Milli-Q.

II.5.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

II.5.1.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (Minipreps)

Este método es una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981). Se utiliza para el análisis de un elevado número de muestras. Con esta técnica se obtienen cantidades de ADN suficientes para el análisis de plásmidos recombinantes aislados de transformantes de *E. coli*.

Procedimiento:

- ✓ Inocular 1 ml de TB, suplementado con el antibiótico adecuado, con una colonia de *E. coli* con el plásmido deseado. Incubar 12-14 horas a 37 °C con agitación orbital.
- ✓ Recoger las células por centrifugación a 13200 rpm durante 5 minutos.
- ✓ Resuspender las células en 200 µl de STET¹ y añadir 20 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml).
- ✓ Hervir durante 40 segundos.
- ✓ Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Eliminar el precipitado de restos celulares y proteínas con la ayuda de un palillo estéril.
- ✓ Precipitar el ADN añadiendo al sobrenadante 250 µl de isopropanol y 20 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- ✓ Centrifugar a 13200 rpm durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70% (v/v). Descartar el sobrenadante y dejar evaporar por completo el etanol.
- ✓ Resuspender el ADN en 20 µl de TE o agua Milli-Q.

II.5.1.2.2. Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (Lisis alcalina)

Este procedimiento se basa en el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979).

Procedimiento:

- ✓ Inocular la cepa de *E. coli* de interés en 100 ml de medio TB, suplementado con el antibiótico que proporciona la presión selectiva para el mantenimiento del plásmido. Incubar 12–14 horas a 37 °C con agitación orbital.
- ✓ Recoger las células por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y resuspender en 4 ml de solución TEG² suplementada con lisozima (5 mg/ml). Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

¹ STET: 8% sacarosa (p/v); 10 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA; 0,5% Triton X-100 (v/v); pH 8,0.

² Solución TEG: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0); 50 mM, glucosa.

- ✓ Añadir 8 ml de solución alcalina¹ y mezclar suavemente. Incubar en hielo 10 minutos.
- ✓ Añadir 6 ml de una solución de acetato potásico² y agitar. Mantener en hielo 10 minutos.
- ✓ Centrifugar a 10000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Recoger el sobrenadante y precipitar con 0,6 volúmenes de isopropanol. Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos.
- ✓ Centrifugar a 5000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Lavar el precipitado con etanol 70%, secar y resuspender en 1 ml de TE.
- ✓ Añadir RNasa A (40 µg/ml) e incubar 30 minutos a 37 °C.
- ✓ Realizar los procesos de limpieza y precipitación descritos en el apartado II.5.1.1.
- ✓ Resuspender en 100 µl de TE o agua Milli-Q.

II.5.1.3. Aislamiento de ADN total de *Xylophilus ampelinus*

El método empleado para el aislamiento de ADN total de *X. ampelinus* fue una modificación del descrito por Hopwood y col. (1985), que de forma habitual se utiliza para obtención de ADN total de *Streptomyces*.

Procedimiento:

- ✓ Crecer un cultivo de *X. ampelinus* en 100 ml de medio TSB, a 24 °C y 220 rpm durante 2-3 días.
- ✓ Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm, y lavar el precipitado con una solución de sacarosa 0,3 M.
- ✓ Resuspender en 3 ml de solución de lisis TES³ suplementada con lisozima 1 mg/ml. Incubar a 37 °C durante 10 minutos en un baño con agua.
- ✓ Añadir 4 ml de solución Kirby⁴ (2x) y agitar en un vórtex durante 1 minuto.
- ✓ Añadir 10 ml de fenol-CIA y 5 ml de TE. Centrifugar a 4500 rpm durante 10 minutos. Recoger la fase acuosa en otro tubo. Repetir este paso, una vez con fenol-CIA y otra sólo con CIA.
- ✓ Transferir la parte superior a otro tubo y precipitar con isopropanol y acetato sódico. Agitar suavemente hasta que se vean hebras.
- ✓ Recoger las hebras en un tubo y lavarlas con etanol 70%. Centrifugar y dejar secar el pellet.
- ✓ Resuspender en 1 ml de TE. Añadir RNasa A (40 µg/ml) e incubar a 37 °C durante 30 min.

¹ Solución alcalina: NaOH 0,2 N y SDS 1% (p/v). Preparar en el momento.

² Solución de acetato potásico: 60 ml acetato potásico 5 M; 11,5 ml ácido acético glacial; 28,5 ml agua destilada.

³ Solución TES: 75 mM NaCl; 25 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5.

⁴ Solución Kirby (2x): 2 g SDS; 12 g 4-aminosalicilato sódico; 6 ml fenol neutro; 10 ml Tris-HCl 1 M pH 8; agua destilada hasta 100 ml.

- ✓ Realizar los procesos de limpieza y precipitación descritos en el apartado II.5.1.1.
- ✓ Resuspender en 100 µl de TE o agua Milli-Q.

II.5.2. Evaluación de la concentración y pureza del ADN

Las preparaciones de ADN se cuantificaron mediante una medida espectrofotométrica con la ayuda del equipo *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). El aparato estima la concentración de la muestra basándose en su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A_{260}), teniendo en cuenta que la absorptividad específica (concentración de una sustancia que determina una unidad de absorbancia a una longitud de onda establecida) para el ADN de doble cadena es de 50 µg/ml, mientras que en el caso del ADN de cadena sencilla tiene un valor de 33 µg/ml.

Por otra parte, el cociente A_{260}/A_{280} indica la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1,8 (Sambrook y Russell, 2001). La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este coeficiente.

Otra valor indicativo de la pureza de la muestra es el cociente A_{260}/A_{230} . En el caso de ácidos nucleicos puros se encuentra entre 1,8 y 2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes no proteicos en las muestras.

II.5.3. Tratamiento enzimático del ADN

II.5.3.1. Eliminación enzimática de ácidos nucleicos

Los procesos de purificación de ADN o de ARN conllevan habitualmente la contaminación de las muestras con ARN y ADN respectivamente. Para eliminar de forma selectiva alguno de los dos tipos de ácidos nucleicos se emplearon las enzimas desoxirribonucleasa I (DNasa I) y ribonucleasa A (RNasa A), de Fermentas, procedentes de páncreas bovino. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La concentración empleada varió según el experimento.

II.5.3.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas en este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (Fermentas). Cada enzima requiere de unas condiciones particulares para su actividad óptima. Se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Añadir menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de la reacción, con objeto de diluir el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas, evitando la inhibición de la actividad enzimática.
- Si el ADN está resuspendido en TE, la reacción debe realizarse en un volumen 10 veces mayor que el volumen de ADN a digerir, para así impedir que interfiera con el tampón indicado para la digestión.
- Incubar las reacciones a la temperatura especificada por el proveedor y durante un periodo de tiempo que no exceda el de la actividad descrita para la enzima.

II.5.3.3. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de extremos de moléculas lineales de ADN se realizó mediante el enzima ADN ligasa del fago T4. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo Mg^{2+} y ATP como cofactores. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Fermentas) para su uso.

Procedimiento:

- ✓ Mezclar en un tubo los siguientes componentes y cantidades:

ADN del vector	50 ng
ADN del inserto	variable ¹
Tampón de ligación (10x)	1x
Ligasa del fago T4	2-7 unidades
Tampon 10x	1x
Agua	hasta completar 10 µl volumen final

¹ la cantidad varía según el tipo de ligación (mayor en el caso de ligaciones entre moléculas con extremos romos) entre 3 y 15 veces superior a la concentración del vector.

- ✓ Incubar la mezcla 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 15 °C (sobre todo para extremos romos).
- ✓ Transformar en la cepa apropiada de *E. coli*.

II.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*) es una técnica de amplificación de ADN descrita inicialmente por Mullis y Faloona (1987). Este método permite la obtención de un elevado número de copias de un determinado fragmento, mediante la

utilización de determinados oligonucleótidos (cebadores) y una ADN polimerasa termoestable. La amplificación se basa en la repetición de un ciclo que consta de tres etapas:

1. **Desnaturalización:** consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde (ADN que incluye la secuencia que se desea amplificar) mediante la incubación a elevada temperatura (92-96 °C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.
2. **Anillamiento de los cebadores:** consiste en la unión de dos oligonucleótidos a sus secuencias complementarias en el ADN molde. Cada uno de ellos es complementario a una de las dos cadenas de ADN y están diseñados para quedar enfrentados por sus extremos 3' tras la hibridación, flanqueando la región a amplificar, cuyo tamaño será la distancia entre los dos cebadores. La temperatura escogida para llevar a cabo este paso constituye un factor crítico en la especificidad y en la eficiencia de la PCR. De forma orientativa, suele estar unos 5 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja de la pareja de oligonucleótidos.
3. **Extensión:** consiste en la síntesis de ADN desde el extremo 3' de los cebadores por la acción de la ADN polimerasa, que emplea como molde la región situada entre la pareja de oligonucleótidos, a una temperatura próxima a los 72 °C, durante un tiempo que depende de la región a amplificar.

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden emplear para PCR, teniendo cada una de ellas unas características propias y requiriendo unas condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. Se utilizaron tres enzimas:

- ***Paq5000™ DNA polymerase*** (Stratagene). Se utilizó cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento o bien cuando se pretendía determinar la temperatura óptima de hibridación de unos nuevos oligonucleótidos. Esta enzima deja una desoxiadenina en cada extremo 3'.
- ***KAPA Taq DNA polymerase*** (Kapa Biosystems). Se utilizó cuando fue necesaria una fidelidad alta en la copia. Esta enzima deja una desoxiadenina en cada extremo 3'.

- **KAPA HiFi DNA polymerase** (Kapa Biosystems). Se utilizó en experimentos en los que la fidelidad de la copia debía ser muy elevada. No deja residuos de desoxiadenuina libres.

Los cantidades de los distintos componentes (Tabla II.1) para la realización de la reacción de amplificación por PCR varían en función de la ADN polimerasa (según las instrucciones del fabricante), el tipo de región a amplificar y otros factores. De igual forma, en algunas reacciones se hace necesario el uso de aditivos que potencian la eficiencia o especificidad de la reacción, como es el caso del DMSO, que facilita la separación de las hebras del ADN molde.

ADN molde	5-50 ng ADN genómico. 0,1-5 ng ADN plasmídico
Cebadores (18-24 pb)	0,5 μ M
ADN polimerasa	1-2 unidades
MgCl₂ (suele venir añadido en el tampón)	1,5 mM
dNTPs	100-200 μ M
Tampon 10x	1x
Agua	Hasta completar el volumen de la reacción

Tabla II.1. Componentes y cantidades normalmente utilizadas para una reacción de PCR.

Los tiempos y temperaturas empleados para llevar a cabo una reacción de PCR dependen de diversos factores, como el contenido en G+C del ADN, la secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores, la longitud del fragmento a amplificar o la velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, entre otros. De modo general, estos tiempos y temperaturas se muestran en la Tabla II.2.

Desnaturalización inicial		94-98 °C	5 min	1 ciclo
Amplificación	Desnaturalización	94-98 °C	30-60 s	25-35 ciclos
	Hibridación	Según el cebador	30-60 s	
	Extensión	72 °C	30-60 s/kb	
Extensión final		72 °C	10 min	1 ciclo

Tabla II.2. Tiempos y temperaturas generales para un programa de PCR.

Al finalizar cualquier reacción de PCR, se debe analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la ausencia de bandas de amplificación inespecíficas.

II.5.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se utilizó para la separación de moléculas de ADN en función de su peso molecular. Se realizó según las condiciones descritas por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa (Pronadisa), disuelta por calentamiento en tampón TAE¹ 1x, a porcentajes entre 0,5% y 2% (p/v) dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar. La mezcla se vierte en un molde y se deja solidificar.

Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga 6x² a una concentración final 1x. De forma general se utilizaron geles del 1% de agarosa, aplicando una diferencia de potencial entre 80 y 100 V en cubetas específicas para electroforesis *Horizon*[®] 11-14 (Whatman Inc.). La duración de la electroforesis varió según la longitud del gel empleado, así como del tamaño de los fragmentos de ADN a estudiar. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio³ durante 20 minutos. El resultado se visualizó sobre un transiluminador de luz UV (*Alphamager*[®] EC, Alpha Innotech) y se fotografió con la cámara incorporada en el mismo equipo.

El tamaño de los fragmentos de ADN separados se determinó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN cargados también en el gel. De forma rutinaria se utilizó el marcador *GeneRuler*[™] 1kb DNA Ladder Plus (Fermentas).

II.5.5.1. Recuperación de fragmentos de ADN separados por electroforesis

Para extraer ADN de geles de agarosa se utilizaron dos métodos. El primero de ellos es una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa y su posterior centrifugación a través de algodón hidrófobo. El segundo es un kit comercial utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.5.5.1.1. Método de congelación rápida (*Freeze-squeeze*)

Esta técnica, conocida como *freeze-squeeze* (Tautz y Renz, 1983), es un método rápido y sencillo, con un porcentaje de recuperación del ADN del 80%.

Procedimiento:

- ✓ Una vez visualizado el ADN separado mediante electroforesis, cortar la banda del gel, procurando que lleve la menor cantidad de agarosa posible. Introducir el fragmento en

¹ **TAE 50x:** 242 g Tris base (2 M); 57,1 ml ácido acético glacial [5,7% (v/v)]; 100 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 (50 mM); agua destilada hasta completar 1 l.

² **Tampón de carga (6x):** 0,25% (p/v) azul de bromofenol; 0,25% (p/v) xilene-cianol; 50% (v/v) glicerol; 0,1 M EDTA; 0,1% SDS; 10 mM TrisHCl; en solución acuosa.

³ **Solución de bromuro de etidio:** preparar una solución concentrada a 10 mg/ml en agua. Para su uso, añadir 200 µl de la solución concentrada a 1 l de agua.

un microtubo, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con algodón hidrófobo. Congelar la banda a -20 °C durante 10-15 minutos.

- ✓ Colocar el microtubo sobre otro microtubo intacto. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos.
- ✓ Limpiar y precipitar el ADN tal como se describe en el apartado II.5.1.1.
- ✓ Resuspender el precipitado en un volumen de agua de 10-20 µl.

II.5.5.1.2. Método de purificación en columnas GFX

Este tipo de extracción se realizó mediante el kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Este kit emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0,1-48 kb) a la matriz de la columna. Una vez que el ADN es retenido, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluído en un buffer de baja fuerza iónica o también en agua. Se obtiene un porcentaje de recuperación superior al 60%. El procedimiento seguido fue el descrito en las instrucciones del kit.

II.5.6. Hibridación de ADN (*Southern blotting*)

II.5.6.1. Transferencia del ADN a una membrana

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina *Southern blotting* (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, desnaturalización del mismo y transferencia de los fragmentos en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante radiación ultravioleta. La transferencia se realizó mediante un sistema de vacío (*VacuGene XL*, Amersham Biosciences).

Procedimiento:

- ✓ Separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis, teñir el gel y fotografiarlo.
- ✓ Cortar una membrana de nailon *Hybond™-N+* (Amersham GE Healthcare) de un tamaño 1 cm mayor por cada lado que el tamaño del gel y humedecerlo con SSC 2x¹. Depositarlo en la unidad de transferencia según las instrucciones del fabricante.
- ✓ Colocar el gel sobre la membrana, comenzando por el extremo con pocillos e ir dejándolo caer suavemente, tratando de no moverlo una vez que entre en contacto con la membrana.

¹ SSC 2x: se prepara a partir de SSC 20x, haciendo una dilución 1:10 en agua.

- ✓ Encender la bomba de vacío y ajustar la presión para que la transferencia se realice a 50 mbares.
- ✓ Cubrir toda la superficie del gel con solución despurinizante¹ durante 15-20 minutos. Esta solución hace que el ADN se despurinice parcialmente, rompiéndose las cadenas de ADN en fragmentos menores, permitiendo una transferencia más eficiente. En este tiempo el frente de migración del tampón de carga debe cambiar su color de azul a amarillo.
- ✓ Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución desnaturalizante² durante 15-20 minutos. Con esta solución la doble hebra se separa, obteniéndose fragmentos de hebra sencilla, y el tampón de carga recupera el color azul original.
- ✓ Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante³ durante 20-25 minutos. Permite mantener el ADN desnaturalizado disminuyendo el valor de pH.
- ✓ Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir el gel con SSC 20x⁴ durante 30-60 minutos.
- ✓ Eliminar todo el líquido y marcarla posición de los pocillos del gel sobre el filtro antes de retirarlo. Apagar la bomba de vacío.
- ✓ Colocar el filtro sobre papel Whatman 3MM y fijar el ADN al filtro mediante aplicación de luz ultravioleta (*UV Stratalinker 2400*, Stratagene). Lavarlo con SSC 2x para eliminar el exceso de sales y dejarlo secar.
- ✓ Estos filtros se pueden conservar a 4 °C protegidos con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

II.5.6.2. Marcaje de sondas de ADN

El fragmento de ácido nucleico utilizado como sonda en procesos de hibridación debe ser marcado de tal forma que sea posible su posterior detección. El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche (*DIG DNA Labeling*) emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de ADN. La digoxigenina está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster susceptible de ser eliminado en condiciones alcalinas, lo que facilita la posterior reutilización de los filtros ya utilizados. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

¹ Solución despurinizante: 0,25 M HCl.

² Solución desnaturalizante: 0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl

³ Solución neutralizante: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5.

⁴ SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7,0

El método se basa en la incorporación al azar en el ADN de un análogo de nucleótidos (digoxigenina-11-dUTP), gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El procedimiento está ajustado (proporción de DIG-11-dUTP frente a dTTP) para que cada 20-25 nucleótidos incorporados se introduzca una molécula de digoxigenina. Esta densidad de haptenos del ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior por anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina.

Para el marcaje de las sondas se siguieron las instrucciones indicadas en el sistema *DIG DNA Labeling*¹:

- ✓ Obtener de 10 ng a 3 µg de ADN en forma lineal del fragmento a marcar disuelto en agua.
- ✓ Desnaturalizar el ADN hirviéndolo durante 10 minutos y transferirlo rápidamente a hielo para evitar la renaturalización. Mezclar el ADN con los siguientes componentes y cantidades:
 - *Hexanucleotide Mix 10x* (Roche).....2 µl
 - *DIG DNA Labeling Mix* (Roche).....2 µl
 - *Fragment Klenow enzyme* (Fermentas).....2 µl
- ✓ Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- ✓ Incubar la mezcla a 37 °C al menos 1 hora (preferiblemente entre 16 y 24 horas).
- ✓ Detener la reacción añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M, pH 8,0 y congelar a -20 °C hasta su uso.

II.5.6.3. Cuantificación del marcaje

Un paso importante antes de utilizar la sonda marcada es comprobar su marcaje. Para ello se realizan diluciones seriadas (1:5) asumiendo que de 1µg de ADN se obtienen 0,78 µg de sonda marcada. En total se hicieron 7 diluciones.

- ✓ Aplicar 1 µl de cada dilución sobre una membrana de nailon *HybondTM-N⁺* (Amersham GE Healthcare).
- ✓ Fijar la sonda mediante luz ultravioleta (*UV-Stratalinker 2400*, Stratagene).
- ✓ Realizar la detección típica de una hibridación descrita en el apartado II.5.6.4.

¹ Según el fabricante, con este método de marcaje, partiendo de 1 µg de ADN se obtienen 0,78 µg de sonda marcada tras 20 horas.

II.5.6.4. Hibridación de ADN

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ADN y se ha marcado la sonda. Se pueden distinguir cuatro fases a lo largo del procedimiento: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

La prehibridación tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrarla con el tampón de prehibridación.

La hibridación permite la unión de la sonda marcada al ADN fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende de las condiciones utilizadas durante la hibridación: la temperatura a la que se desarrolla la hibridación, así como la concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación.

Los lavados posibilitan la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado, aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado, o aumentando la temperatura y la duración del lavado.

Por último, la detección permite visualizar la hibridación de la sonda con los fragmentos de ADN.

Procedimiento:

- ✓ Colocar la membrana en una bolsa de hibridación y añadir 20 ml de solución de prehibridación¹ por cada 100 cm² de membrana. Sellar la bolsa herméticamente e incubar a 42 °C durante 1 ó 2 horas (la incubación se realizaría a 65 °C si la solución de prehibridación no llevase formamida).
- ✓ Hervir la sonda previamente marcada durante 10 minutos, para desnaturalizar el ADN y enfriar rápidamente en hielo para evitar la renaturalización. Añadir la sonda desnaturalizada a la solución de prehibridación a una concentración de 5-25 ng/ml. Esta solución, llamada solución de hibridación, puede ser reutilizada varias veces, desnaturalizándola de la misma forma.
- ✓ Eliminar la solución de prehibridación y añadir la solución de hibridación. Incubar a 42 °C en agitación durante un mínimo de 8-10 horas. Pasado el tiempo de hibridación, recoger la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20 °C.

¹ Solución de prehibridación: 5xSSC; 1% agente bloqueante (*Blocking Reagent*, Roche); 40% formamida.; 1% sarcosil; 0,02% SDS.

- ✓ Lavar la membrana dos veces con la solución de lavado I¹ durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- ✓ Lavar la membrana dos veces con la solución de lavado II² durante 25 minutos a 42 °C en agitación.
- ✓ Equilibrar la membrana con tampón I³ durante 1 minuto en agitación.
- ✓ Bloquear la membrana con tampón II⁴ durante 30 minutos en agitación.
- ✓ Colocar la membrana en una nueva bolsa de hibridación, añadir la solución de anticuerpos⁵ e incubar al menos durante 30 minutos en agitación.
- ✓ Lavar la membrana dos veces con tampón I durante 15 minutos en agitación.
- ✓ Eliminar el tampón I e incubar a con tampón III⁶ durante 2 minutos en agitación.
- ✓ Colocar la membrana en una bolsa de hibridación, mezclar 45 µl de solución NBT⁷ y 35 µl de solución X-fosfato⁸ con 10 ml de tampón III. Añadir esta solución de color a la bolsa de hibridación. Sellar la bolsa, cubrirla con papel de aluminio para que esté en oscuridad, y mantener en agitación hasta que aparezca la señal de hibridación.
- ✓ Retirar la solución de color y detener la reacción mediante lavado con TE o agua destilada.

II.5.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Para la reacción de secuenciación se utilizó DYEnamic ET Dye Terminator kit (MegaBACE, Amersham). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-200. Los fragmentos de ADN se analizaron en un secuenciador MegaBACE 500 (Amersham).

II.5.8. Análisis informático

El análisis y comparación de secuencias nucleotídicas y proteicas se realizó con los siguientes programas:

DNASTar (Comprehensive Microcomputer Systems for Molecular Biology; DNASTar Inc., Madison, WI EE.UU).

Chromas. Version 2.3 (Technelysium).

¹ Solución de lavado I: 2xSSC; 0,1% SDS.

² Solución de lavado II: 0,1xSSC; 0,1% SDS.

³ Tampón I: 100 mM ácido maleico; 150 mM NaCl; pH 7,5; 0,3% Tween 20 (v/v).

⁴ Tampón II: 1% agente bloqueante en tampón I.

⁵ Solución de anticuerpos: 15 ml de tampón II; 1,5 µl de anticuerpos (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments*, Roche).

⁶ Tampón III: mezcla de dos soluciones que se preparan por separado a una concentración 10x y se autoclavan. En el momento de uso se mezclan a una concentración 1x: 1 M Tris-HCl, pH 9,5; 1 M NaCl, 500 mM MgCl₂·6H₂O.

⁷ NBT (azul de nitrotetrazolio): concentración de uso 75 mg/ml. Soluble en agua o en dimetilformamida 70%.

⁸ X-fosfato (BCIP: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato): concentración de uso 50 mg/ml. Soluble en dimetilformamida.

A través de internet se utilizaron diferentes programas y bases de datos:

EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Alemania): www.ebi.ac.uk/.

Blast: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

ClustalW: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

SecretomeP 2.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>

SignalP 4.1 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

II.6. Transformación genética de microorganismos

La transformación es un proceso por el cual se introduce ADN en un microorganismo. Para ello debe encontrarse en “estado de competencia”, es decir, un estado en el que presenta alteraciones en su pared y membrana celular, permitiendo la entrada ADN en la célula. Existen técnicas, basadas en tratamientos químicos o físicos, que producen microporos celulares que permiten que se introduzca el material genético de modo eficiente.

II.6.1. Transformación de *E. coli* por choque térmico

La transformación mediante choque térmico fue el método general empleado para la introducción en *E. coli* de las diferentes construcciones plasmídicas. Para ello, primero fue necesario obtener células competentes de la cepa que se pretendía usar en cada caso como receptora del plásmido. Este método es el más adecuado para introducir ADN plasmídico.

II.6.1.1. Inducción del estado de competencia

Para inducir el estado de competencia en *E. coli* se siguió el método del cloruro de rubidio (Hanahan, 1983, 1985). Con este método las células alcanzan eficiencias de hasta 5×10^8 transformantes/ μg ADN. Es importante trabajar a 4°C o en baño de hielo durante todo el proceso.

Procedimiento:

- ✓ Inocular 10 ml de medio SOB líquido suplementado al 2% con una solución de Mg^1 , con una colonia aislada en medio SOB sólido, incubándolo toda la noche a 37°C y a una agitación constante de 250 rpm.

¹ Solución de Mg: 1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Esterilizar por filtración.

- ✓ Con 1 ml del cultivo anterior, inocular 100 ml de medio SOB líquido, incubándolo en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores.
- ✓ Cuando el cultivo alcanza una DO_{600} de 0,4-0,5 enfriar rápidamente en hielo manteniéndose desde este momento a 4 °C.
- ✓ Recoger las células por centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm y a 4 °C.
- ✓ Resuspender el precipitado suavemente en 30 ml de solución RF1¹. Mantener los tubos en hielo durante 30 minutos.
- ✓ Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm y a 4 °C.
- ✓ Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 8 ml de solución RF2².
- ✓ Repartir en alícuotas de 100 μ l en tubos de 1,5 ml y congelar inmediatamente en N₂ líquido. Conservar los viales de células competentes a -80 °C.

II.6.1.2. Proceso de transformación de *E. coli*

El método de transformación empleado se basó en el descrito por Hanahan (1983). Se fundamenta en someter las células competentes anteriormente obtenidas a un choque térmico.

Procedimiento:

- ✓ Descongelar las células competentes manteniéndolas en hielo.
- ✓ Añadir el ADN (hasta un volumen máximo de 10 μ l) a 100 μ l de células y mantener la mezcla en hielo durante 30 minutos.
- ✓ Someter a un choque térmico la mezcla incubándola a 42 °C durante 90 segundos.
- ✓ Mantener en hielo durante 2 minutos.
- ✓ Añadir 1 ml de LB e incubar las células durante 1 hora a 37 °C y agitación a 250 rpm.
- ✓ Sembrar alícuotas en placas de medio LB sólido suplementado con los aditivos adecuados a cada caso.

II.6.2. Transformación por electroporación

Cuando el material genético que se quiere introducir en la bacteria es una molécula lineal, la transformación mediante choque térmico no es muy efectiva. En este caso se emplea la técnica de electroporación.

La electroporación es un método de transformación de células consistente en la aplicación externa de un pulso de corriente eléctrica, que induce la formación transitoria de poros en las membranas celulares por los cuales penetrarán las moléculas de ADN. Este

¹ **Solución RF1:** 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM acetato potásico; 10 mM CaCl₂; 15% glicerol; pH 5,8 ajustado con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración

² **Solución RF2:** 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15% glicerol; pH 6,8 ajustado con NaOH. Esterilizar por filtración.

proceso se llevó a cabo en un electroporador (*GenePulser Xcell*, Bio-Rad), que es el que genera el campo eléctrico, y se utilizaron cubetas para electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad).

II.6.2.1. Inducción del estado de electrocompetencia

Las células electrocompetentes son células en suspensión en una solución libre de iones, que pueden incorporar material genético mediante electroporación.

➤ Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* (Sambrook y col., 2001):

- ✓ Inocular 50 ml de LB con una colonia aislada de *E. coli*. Incubar a 37 °C y 220 rpm hasta el día siguiente.
- ✓ Preparar 4 matraces conteniendo 250 ml de medio LB, e inocular con el cultivo puesto el día anterior (12,5 ml por matraz). Incubar a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4.
- ✓ Mantener en hielo 15-20 minutos.
- ✓ Recoger las células por centrifugación y resuspender en 120 ml totales de agua Milli-Q fría. Centrifugar de nuevo y resuspender en 120 ml de glicerol 10 % frío preparado en agua Milli-Q.
- ✓ Resuspender el pellet en 10 ml de glicerol 10 % frío.
- ✓ Centrifugar y resuspender el pellet final en 1 ml de medio GYT¹ frío.
- ✓ Preparar alícuotas de 50 µl congelando inmediatamente en N₂ líquido. Guardar a -80 °C.

➤ Preparación de células electrocompetentes de *X. ampelinus* (Do Amaral y col., 2005):

- ✓ Inocular 500 ml de medio TSB con una colonia aislada de *X. ampelinus*. Incubar a 24 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5-0,6.
- ✓ Mantener en hielo durante 1 hora aproximadamente.
- ✓ Recoger las células por centrifugación y resuspender en 10 ml de glicerol 10%. Repetir tres veces.
- ✓ Centrifugar y resuspender en 2 ml de agua. Hacer tres lavados.
- ✓ Centrifugar y resuspender el pellet final en 1 ml de glicerol 10%.
- ✓ Preparar alícuotas de 50 µl congelando inmediatamente en N₂ líquido. Guardar a -80 °C.

¹ Medio GYT: 10% glicerol (v/v); 0,125% extracto de levadura (p/v); 0,25% triptona (p/v).

II.6.2.2. Proceso de electroporación

II.6.2.2.1. Electroporación de *E.coli*

Procedimiento:

- ✓ Descongelar en hielo una alícuota de 50 μ l de células electrocompetentes y, a continuación, añadir 100-200 ng del ADN que se quiere introducir.
- ✓ Siempre en hielo, transferir todo el volumen a una cubeta de electroporación.
- ✓ Colocar la cubeta en el electroporador y dar un pulso eléctrico. Los parámetros eléctricos (voltaje, capacitancia y resistencia) deben ser seleccionados previamente. En esta transformación, las condiciones fueron 2,5 kV, 25 μ F y 200 Ω .
- ✓ Una vez dado el pulso, rápidamente añadir 1 ml de SOC frío.
- ✓ Incubar a 37 °C y 200 rpm durante 1 hora.
- ✓ Sembrar en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado. Incubar a 37 °C hasta el día siguiente.

II.6.2.2.2. Electroporación de *X. ampelinus*

Procedimiento:

- ✓ Descongelar en hielo una alícuota de 50 μ l de células electrocompetentes y, a continuación, añadir 200 ng del ADN que se quiere introducir.
- ✓ Siempre en hielo, transferir todo el volumen a una cubeta de electroporación.
- ✓ Colocar la cubeta en el electroporador y dar un pulso eléctrico. En esta transformación, las condiciones fueron 2,0 kV, 25 μ F y 200 Ω .
- ✓ Una vez dado el pulso, rápidamente añadir 1 ml de TSB frío con glucosa 20 mM.
- ✓ Poner en agitación a 24 °C y 200 rpm durante 8 horas.
- ✓ Sembrar en medio LPGA suplementado con el antibiótico adecuado. Incubar a 24 °C hasta la aparición de transformantes.

II.7. Manipulación de genotecas en vectores fágicos

II.7.1. Construcción de genotecas

La biblioteca genómica se construyó en un vector fágico comercial, el vector λ -DASH II/BamHI (Stratagene), en el que se clonó el ADN de *X. ampelinus*. Este vector se eligió por su capacidad para aceptar fragmentos de ADN exógeno de gran tamaño (20-23 kb), porque posibilita la ligación de digestiones parciales de ADN exógeno con Sau3AI en el sitio BamHI (ya que ambas enzimas generan extremos cohesivos y complementarios entre sí), y por la facilidad para conservar los fagos recombinantes funcionales durante largo tiempo a 4 °C en tampón

SM-cloroformo sin necesidad de amplificar la genoteca. El procedimiento a seguir se describe a continuación.

Paso I. Extracción de ADN genómico de *X. ampelinus* y digestión parcial para la obtención de fragmentos (20-30 kb) de dicho material genético.

- ✓ Obtener ADN genómico de *X. ampelinus* mediante el método descrito en el apartado II.5.1.3.
- ✓ Comprobar su integridad y calidad en un gel de agarosa al 0,5%.
- ✓ Preparar una digestión parcial con la enzima de restricción Sau3AI:
 1. Preparar en hielo la mezcla para 11 tubos:
 - 13 µl tampón 10X Sau3AI
 - 10 µg ADN
 - agua hasta 130 µl
 2. Mezclar bien y repartir:
 - 20 µl en tubo nº 1
 - 10 µl en tubos nº 2-11
 3. Añadir 0,5 µl de enzima al tubo nº 1. La concentración de la enzima en este tubo es 0,25 U/µl.
 4. Retirar 10 µl de la dilución anterior y añadir al tubo nº 2. Se repite este paso hasta el tubo nº 10. El tubo nº 11 es el control de ADN sin digerir.
 5. Incubar a 37 °C durante 20 min. Es importante controlar el tiempo de incubación.
 6. Detener la reacción con 1 µl de EDTA 0,5 M pH 8.
 7. Analizar las digestiones en un gel de agarosa al 0,5%. Incluir 1 µg de los marcadores λ/HindIII, λ/PstI y el marcador comercial GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus (Fermentas).
- ✓ Una vez conocida la concentración óptima de enzima Sau3AI necesaria para obtener fragmentos de ADN de 20-25 kb, escalar la reacción para un volumen mayor de digestión (digestión parcial a gran escala), y así conseguir una buena cantidad de ADN del tamaño requerido.

Paso II. Separación en gradiente de sacarosa de los fragmentos obtenidos a partir de la digestión parcial con la enzima Sau3AI.

- ✓ Preparar 2 tubos de ultracentrífuga (Ultracentrífuga Beckman Optima™ Max, rotor SW-55Ti) de 5 ml, y añadir 2,5 ml de una solución de sacarosa al 40%¹ (p/v) y 2,5 ml de sacarosa al 10%² (p/v).
- ✓ Tapar con Parafilm® cada tubo y dejarlos reposar en horizontal durante al menos 5 horas para que se establezca el gradiente de sacarosa.
- ✓ Añadir suavemente 200 µl del ADN digerido parcialmente a cada tubo con sacarosa.

¹ Solución de sacarosa 40%: 10 mM Tris-HCl pH8; 1 mM EDTA; 1 mM NaCl; 40 ml de sacarosa 50%.

² Solución de sacarosa 10%: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 1 mM NaCl; 10 ml de sacarosa 50%; agua Milli-Q hasta 50 ml.

- ✓ Centrifugar durante 18 horas a 4 °C y 30000 rpm.
- ✓ Con la ayuda de un capilar que se introduce hasta el fondo del tubo y de una bomba peristáltica, recoger el gradiente en fracciones de 250 µl aproximadamente.
- ✓ Correr un alícuota (10 µl) de cada fracción en un gel de agarosa 0,5%. Se precipitará el ADN de las fracciones que hayan dado una sola banda de unas 20-25 kb.
- ✓ Resuspender el ADN en 20 µl de agua Milli-Q.

Paso III. Ligación de los fragmentos de ADN genómico digeridos con Sau3AI a los brazos del vector λ-DASH digeridos con BamHI.

- ✓ Realizar la ligación siguiendo el protocolo descrito en 5.3.3.
- ✓ Precipitar el ADN y resuspender en 4 µl de agua Milli-Q.

Paso IV. Encapsidación del ADN recombinante.

La encapsidación del ADN fágico recombinante originado tras la ligación se realizó con los extractos de empaquetamiento *in vitro* Gigapack® III XL Packaging extract (Stratagene), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Según dicho protocolo, la eficiencia de la reacción de empaquetamiento depende de factores como la cantidad de ADN recombinante (la eficiencia más alta se obtiene con unos 0,5 µg de ADN), el volumen y tipo de tampón en el que se añade el ADN (hasta 10 µl y tampón TE), el tiempo de reacción (al menos 2 horas) y el tamaño del ADN a empaquetar (45-48 kb).

- ✓ Añadir a la solución de encapsidación los 4 µl de la ligación con el vector λ-DASH.
- ✓ Incubar a 22 °C durante 2 horas.
- ✓ Añadir 500 µl de tampón SM¹ y 20 µl de cloroformo. Mezclar suavemente.
- ✓ Conservar a 4 °C (hasta 1 mes).

Paso V. Titulación de la genoteca mediante infección en medio sólido de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA (P2).

Previamente a la infección en medio sólido, se preparan las células de *E. coli* XL-1 Blue MRA (P2).

Procedimiento para la preparación de células:

- ✓ Sembrar la cepa *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA (P2) en medio LB sólido e incubar 12-18 horas a 37 °C.
- ✓ Tomar una colonia aislada e inocular 100 ml de medio LB suplementado con maltosa² al 0,2% y MgSO₄ 10 mM.

¹ **Tampón SM:** 5.8 g NaCl; 2 g MgSO₄·7H₂O; 50 ml Tris HCl 1M pH 7.5; 5 ml gelatina 2% (p/v). Añadir agua hasta 1 L y autoclavar.

² La maltosa es necesaria debido a que la proteína que actúa como receptora del bacteriófago está codificada por el gen *lamB*, que se encuentra integrado en el operón que contiene los genes para el aprovechamiento del mencionado disacárido.

- ✓ Incubar a 37 °C con agitación orbital hasta que la densidad óptica a 600 nm sea de 0,5-0,8 (lo cual equivale a 4-6x10⁸ células/ml).
- ✓ Repartir los 100 ml del cultivo en alícuotas de 10 ml, y centrifugar a 3500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos.
- ✓ Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM (concentración 4x de la original) para infecciones en medio sólido, y en 1 ml (concentración 10x de la original) para infecciones en medio líquido.
Estas células pueden almacenarse a 4 °C durante 10-12 días.

Procedimiento para realizar la infección en medio sólido:

- ✓ Preparar diluciones (desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁴) en tampón SM de la solución de bacteriófagos ya encapsidados.
- ✓ En un tubo de 10 ml, añadir 20 µl de la dilución de fagos y 200 µl de células hospedadoras (concentración 4x). Incubar a 37 °C durante 20 minutos.
- ✓ Añadir 3-5 ml de medio LB con agar al 0,7% (fundido y mantenido a unos 42 °C) al tubo. Invertir el tubo un par de veces y verter todo el contenido, a modo de cobertera, sobre una placa de LB.
- ✓ Incubar las placas de cultivo a 37 °C entre 6-8 horas hasta ver los halos de lisis. Las placas se pueden almacenar a 4 °C.

Finalmente, el número de fagos recombinantes obtenidos en el empaquetamiento se calcula en función del número de halos de lisis (*ufp* o unidades formadoras de placas) aparecidos en las infecciones realizadas en cada placa de cultivo, la dilución utilizada y el volumen de solución de fagos añadido.

$$\text{Título (ufp/ml)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ halos} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen plaqueado (ml)}}$$

El cálculo del número de fagos recombinantes necesarios para construir una genoteca completa se realiza aplicando la ecuación descrita por Clarke y Carbon (1976):

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

N = número de fagos recombinantes necesarios

p = probabilidad de que un gen determinado se encuentre representado en algún clon

f = cociente entre el tamaño medio de los insertos y el tamaño real del genoma del organismo

El tamaño del genoma completo de *X. ampelinus* se desconoce, por lo que se ha asumido como referencia el tamaño de una especie muy próxima filogenéticamente, *Variovorax paradoxus*, de aproximadamente 6 Mb (Han y col., 2011). El tamaño promedio considerado de los fragmentos encapsidados fue 15 kb. La probabilidad de encontrar un gen

concreto en alguno de los clones debería ser del 0,9998 (99,98%), para que la genoteca fuese suficientemente representativa.

II.7.2. Amplificación de la genoteca

Para la amplificación de la genoteca se realiza una infección en medio sólido con una cantidad de bacteriófagos y de células hospedadoras mayor que en las anteriores infecciones.

Procedimiento:

- ✓ Preparar 3 placas grandes (15 cm) con medio LB sólido.
- ✓ Realizar 10 infecciones, cada una con 50 μ l de la genoteca y 250 μ l de células hospedadoras. Incubar a 37 °C durante 25 minutos.
- ✓ Transcurrido el tiempo de incubación, añadir 3-5 ml de medio LB con agar al 0,7% al tubo. Invertir un par de veces y verter el contenido de 3 tubos, a modo de cobertera, sobre cada una de las placas de LB preparadas (sobre una de las placas verter el contenido de 4 tubos).
- ✓ Incubar a 37 °C unas 8 horas hasta la aparición de los halos de lisis.
- ✓ Añadir 20 ml de tampón SM por placa. Dejar en agitación 6-7 horas.
- ✓ Recoger los fagos en suspensión en la solución SM de las 3 placas en un tubo tipo Falcon. Lavar cada placa con 5 ml de tampón SM y añadir al tubo anterior.
- ✓ Añadir cloroformo (1%) a la solución de fagos e incubar 10 minutos a temperatura ambiente, para lisar las bacterias presentes.
- ✓ Centrifugar 10 minutos a 3500 rpm. Recoger el sobrenadante, donde estarán los fagos recombinantes.
- ✓ Añadir cloroformo a una concentración final de 0,3% (v/v), con la finalidad de conservar la genoteca a 4 °C. Si se quiere conservar parte de ella a -80 °C, añadir DMSO a una concentración final del 7% (v/v).
- ✓ Una vez hecha la amplificación de la genoteca, se vuelve a titular siguiendo el procedimiento descrito en el paso V del apartado II.7.1.

II.7.3. Rastreo de genotecas construidas en vectores fágicos

El procedimiento para rastrear una genoteca fágica consiste, generalmente, en realizar hibridaciones con una sonda específica con la finalidad de aislar un determinado clon, que contenga el gen de interés. Los pasos a seguir se detallan a continuación.

II.7.3.1. Marcaje de la sonda y cuantificación del marcaje

Se siguió el procedimiento descrito en los apartados II.5.6.2 y II.5.6.3.

II.7.3.2. Infección en medio sólido

Se realizan infecciones en placas grandes, siguiendo el procedimiento descrito en el paso V del apartado II.7.1. Para el rastreo se utilizan células de la cepa *E. coli* LE392, ya que la genoteca sólo contiene fagos recombinantes. Por cada placa se preparan dos tubos con 200 µl de células hospedadoras y un volumen de la dilución de fagos equivalente a 10.000-15.000 fagos en placa.

Una vez hecha la incubación, se elige la placa que presente los halos de lisis bien separados, y se transfiere a membranas de nailon.

II.7.3.3. Transferencia a membranas de nailon

Procedimiento:

- ✓ Cada placa se transfiere a 2 membranas de nailon *HybondTM-N⁺* (Amersham GE Healthcare). Realizar 3 marcas asimétricas tanto en las placas como en las membranas, y marcar también la cara que se va a poner en contacto con el ADN. La primera membrana se mantiene 1 minuto en contacto con la placa, y la segunda 2 minutos.
- ✓ Preparar 3 bandejas con papel Whatman 3MM empapado en cada una de las siguientes soluciones:
 - Solución desnaturalizante
 - Solución neutralizante
 - Solución SSC 2x
- ✓ Colocar las membranas sobre el papel empapado con la primera solución, de forma que la cara que contiene el ADN quede hacia arriba.
- ✓ Pasar las membranas de una solución a otra, incubando durante 5 minutos en cada una. Antes de pasar a la siguiente solución, escurrir las membranas contra la pared de la bandeja por el lado que no tiene ADN.
- ✓ Dejar las membranas sobre papel de filtro y fijar el ADN con UV (2 ciclos de 12 segundos, con *UV Stratalinker[®] 2400*).

II.7.3.4. Hibridación del ADN con la sonda

Se siguió el procedimiento descrito en el apartado II.5.6.4.

II.7.3.5. Selección y aislamiento de fagos

Se seleccionan los fagos correspondientes a las señales más intensas aparecidas en ambas membranas. Una vez localizados en la placa de medio, con la ayuda de una punta de pipeta cortada en su extremo, se toma el trozo de agar que comprende la mancha seleccionada, y se pasa a un tubo con 1 ml de tampón SM y 50 µl de cloroformo. Se mantiene

en agitación a 37 °C durante 30 minutos, o a 4 °C durante un mínimo de 4 horas (recomendable).

Se realizan nuevas infecciones en placas medianas (9 cm) empleando 50 µl de las diluciones 10^{-1} a 10^{-3} en SM de los trozos de agar y 100 µl de células hospedadoras. La dilución que presente placas de lisis aisladas se transfiere a membrana y, a continuación, se hibrida con la sonda. Se seleccionan las placas de lisis que hayan dado señal en la membrana, y se pasa el correspondiente trozo de agar a un tubo con 1 ml de tampón SM y 50 µl de cloroformo, procediendo como anteriormente. Para asegurar que las placas de lisis elegidas proceden de fagos simples, se repite la infección con los nuevos fagos aislados. Tras la transferencia a membrana y la hibridación se selecciona un fago simple de cada placa y se pasa a un tubo con 1 ml de tampón SM y 50 µl de cloroformo, manteniéndolo en agitación.

II.7.3.6. Amplificación de los fagos aislados

Para la amplificación de los fagos simples aislados se realizan 5 infecciones de cada uno con 10-100 µl de la solución de fagos y 200 µl de células hospedadoras.

Se recogen los fagos de las placas que presentan lisis casi total con 5 ml de tampón SM por placa, y se deja en agitación a 4 °C durante 8 horas. Transcurrido este tiempo se recoge todo el volumen en un único tubo por fago, y se añade 1% de cloroformo.

Por último, se realizan nuevas infecciones en medio sólido para titular los fagos aislados.

II.7.3.7. Infección en medio líquido

Las infecciones en medio líquido se realizan con 10^7 ufp, por lo que según la titulación obtenida en cada fago, se harán diferentes diluciones.

Procedimiento:

- ✓ Añadir en un tubo un volumen de la suspensión fágica (máximo 300 µl) conteniendo 10^7 ufp y 2 ml de células hospedadoras (*E. coli* LE392, concentración 10x). Incubar 30 minutos a 37 °C.
- ✓ Transcurrido ese tiempo, añadir la infección a 20 ml de medio NZY suplementado con 20% de maltosa, e incubar a 37 °C y 220 rpm hasta la observación de lisis celular (aclaramiento del medio o formación de hilillos).
- ✓ Una vez producida la lisis, añadir 100 µg/ml de lisozima, 100 µg/ml de RNasa y 1 µg/ml de DNasa, y mantener en agitación a 37 °C durante 15 minutos.
- ✓ Filtrar el cultivo a través de papel de filtro a tubos Corex®.

- ✓ Añadir 1,1 g de NaCl y disolver. A continuación añadir 0,5 volúmenes de PEG 6000 y dejar toda la noche a 4 °C.
- ✓ Centrifugar el cultivo durante 30 minutos, a 8000 rpm y 4 °C. Resuspender el precipitado en 500 µl de SM.

II.7.3.8. Extracción de ADN fágico

Tras la infección en medio líquido se procede a la extracción de ADN de los fagos aislados.

Procedimiento:

- ✓ Añadir 1 volumen de CIA a la suspensión en SM y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos. Pasar a otro tubo la fase superior. Repetir este paso.
- ✓ Añadir 1 volumen de fenol neutro para descapsidar los fagos. Agitar suavemente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm. Pasar la fase acuosa a otro tubo.
- ✓ Extraer la fase acuosa con 1 volumen de fenol-CIA. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm. Repetir la extracción con 1 volumen de CIA.
- ✓ Precipitar el ADN añadiendo 1/10 volúmenes de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol frío.
- ✓ Centrifugar 30 minutos y 14000 rpm. Lavar el precipitado con etanol 70%. Resuspender en 40 µl de TE.

II.7.3.9. Digestión con enzimas de restricción del ADN fágico

El ADN de los fagos se digiere con distintas enzimas para ver sus patrones de restricción y así comprobar que se trata de fagos diferentes.

Las enzimas más adecuadas son aquellas que liberan los brazos del vector (20 y 9 kb, respectivamente), además del ADN clonado entre ambos que contiene la secuencia de interés. Esto se puede comprobar realizando una hibridación de *Southern*. Una vez identificado, se clona este fragmento en el vector pBluescript KS digerido con la misma enzima que el inserto. Se seleccionarán aquellas colonias que contengan el inserto, y se realizarán nuevas restricciones con la finalidad de mapear la construcción y lograr aquella que posea el gen completo.

II.8. Técnicas de mutagénesis de *X. ampelinus*

II.8.1. Mutagénesis mediante inserción del transposón EZ-Tn5™

EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2> es un transposón comercial (Epicentre) muy utilizado para mutagénesis aleatoria. Contiene un origen de replicación (R6K γ ori), que permite el clonaje de la región de ADN genómico en la cual se insertó el transposón, y un gen de resistencia a kanamicina (Tn903), que permite la selección de los mutantes. Este transposón (Figura II.1) puede ser introducido en células huésped mediante electroporación e insertarse al azar en su ADN genómico, pudiendo seleccionarse los clones en placas con kanamicina.

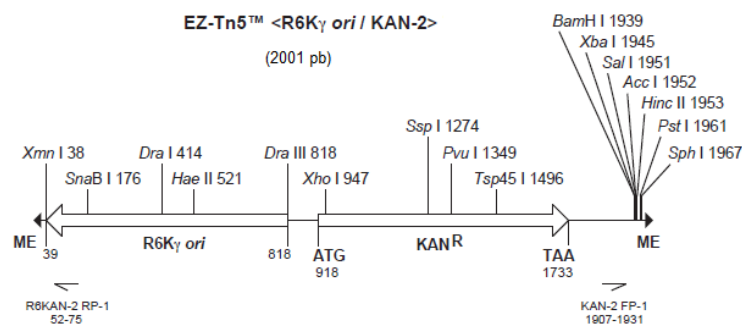


Figura II.1. Transposón EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>. (Modificado de www.epibio.com).

El procedimiento a seguir se describe a continuación:

1. Electroporación de células de *X. ampelinus* con EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2> y selección de clones.

La electroporación de células electrocompetentes de *X. ampelinus* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.6.2.2.2. Se utilizó 1 μ l del transposoma EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>Tnp (33 ng/ μ l), que es un complejo estable formado entre el transposón EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2> y la enzima EZ-Tn5 transposasa. Esta enzima es activada por el Mg⁺² intracelular, facilitando la inserción al azar del transposón en el ADN de la célula. La selección de clones se hizo en placas de LPGA con 10 μ g/ml de kanamicina.

2. Preparación del ADN genómico de las células hospedadoras.

Se extrajo el ADN de los clones seleccionados según el método ya descrito (apartado II.5.1.3). Se digirió 1 μ g de ADN con las enzimas de restricción EcoRI y PvuII, las cuales no tienen dianas en el transposón.

Este ADN digerido debe ser reparado en sus extremos para que sean romos, y fosforilado en el extremo 5'. Para ello se utilizó el kit comercial *End-It™ DNA End-Repair Kit* (Epicentre).

- ✓ Para cada ADN a reparar preparar en un tubo la siguiente reacción:
 - 5 µl tampón 10x (*End- Repair Buffer*)
 - 5 µl dNTP mix
 - 5 µl ATP
 - 1 µl enzima (*End-Repair Enzyme Mix*)
 - 1-5 µg ADN (en suspensión en TE)
 - Agua estéril hasta un volumen de reacción de 50 µl.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- ✓ Parar la reacción calentando a 70 °C durante 10 minutos
- ✓ Precipitar el ADN con etanol y acetato sódico (ver apartado II.5.1.1).
- ✓ Resuspender en 2,5 µl de agua Milli-Q.

3. Ligación del ADN genómico fragmentado.

Se preparó una autoligación del ADN digerido utilizando 3 µg de ADN y 2 U de ADN ligasa del fago T4, en un volumen final de 10 µl, e incubándolo a 15 °C hasta el día siguiente. Una vez finalizada la ligación se inactivó la enzima calentando a 70 °C durante 10 min. A continuación se hizo una extracción con CIA y se precipitó el ADN con etanol y acetato sódico, según se describe en el apartado II.5.1.1.

4. Transformación y selección de clones.

Para la transformación mediante electroporación se utilizó 1 µl de la ligación anterior y 50 µl de células electrocompetentes *TransforMaxTM EC100DTM pir-116 Electrocompetent E. coli* (Epicentre). Se siguió el procedimiento descrito en el apartado II.6.2.2.1. Como antibiótico de selección se utilizó 50 µg/ml de kanamicina.

5. Extracción y secuenciación del ADN de los clones seleccionados.

Una vez extraído el ADN plasmídico de los transformantes, se secuenció utilizando cebadores específicos (KAN-2 FP-1; R6KAN-2 RP-1) del transposón introducido. La finalidad es conocer el lugar de inserción del transposón en el ADN genómico de la bacteria.

II.8.2. Mutagénesis dirigida por doble recombinación

Esta técnica posibilita la delección de un gen mediante doble recombinación. Para ello, se amplificaron las secuencias inmediatamente anterior y posterior al gen a deleccionar, y se clonaron en el plásmido pK18*mobsacB*. Este vector contiene el gen *sacB*, letal para la bacteria cuando crece en presencia de sacarosa, y el gen de resistencia a kanamicina. Una vez conseguida la construcción, se transformó mediante electroporación en *X. ampelinus*. Las particulares características del plásmido permitirán la posterior selección de dobles recombinantes.

Procedimiento:**1. Amplificación de las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen.**

Para la amplificación de la región al inicio del gen se diseñaron dos oligos con dianas de restricción en sus extremos 5' para BamHI y XbaI, respectivamente. Para la amplificación de la región corriente abajo la pareja de oligos diseñados presentó dianas de restricción en sus extremos para XbaI y HindIII, respectivamente.

Una vez realizadas las dos PCR independientes con cada pareja de oligos, los productos fueron aislados (según procedimiento descrito en el apartado II.5.5.1.2) y se digirieron con XbaI. Transcurrido el tiempo de digestión, se inactivó la enzima calentando la reacción a 70 °C durante 10 minutos. A continuación se limpió de impurezas con CIA y se precipitó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.5.1.1. Se resuspendió el precipitado en 20 µl de agua.

2. Ligación de los fragmentos de PCR.

Los dos fragmentos de ADN obtenidos por PCR y ya digeridos, se ligaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.5.3.3. El resultado de la ligación es un fragmento de ADN formado por las secuencias anterior y posterior del gen a deletar.

Tras la inactivación de la enzima, la reacción se limpió con CIA y se precipitó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.5.1.1. Se resuspendió el precipitado en 40 µl de agua.

3. Ligación del fragmento de ADN al plásmido pK18*mobsacB* y transformación en *E.coli*.

Para poder ligar el ADN amplificado al plásmido pK18*mobsacB*, se digirieron ambos ADN (plásmido e inserto) con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Transcurrido el tiempo de incubación de la reacción, se limpió con CIA y se precipitó el ADN.

La ligación se realizó siguiendo el procedimiento habitual (apartado II.5.3.3).

La construcción plasmídica se transformó en *E. coli* DH5α, según el procedimiento descrito en el apartado II.6.1.2. La siembra de la transformación se hizo en placas de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, IPTG y X-Gal. Sólo crecerán aquellas bacterias que hayan integrado el plásmido.

Al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en la placa, y se aisló y digirió su plásmido, para comprobar si eran portadoras de la construcción adecuada. El plásmido aislado se secuenció para confirmar dicha construcción.

4. Transformación de la construcción en *X. ampelinus* mediante electroporación.

La construcción formada por el plásmido pK18*mobsacB* y el fragmento de ADN correspondiente a las secuencias flanqueantes del gen a deletar, se introdujo en *X. ampelinus* mediante electroporación (ver apartado II.6.2.2.2). El producto de la

electroporación se sembró en placas de medio LB suplementado con 25 µg/ml de kanamicina. La presión selectiva del antibiótico sólo permitirá el crecimiento de aquellas bacterias que hayan integrado el plásmido en su cromosoma mediante una primera recombinación homóloga.

5. Cultivo y selección de transformantes.

Los posibles mutantes obtenidos tras la electroporación se crecieron durante 24 horas en 50 ml de medio TSB. A continuación se midió la densidad óptica del cultivo, y se sembraron 5×10^4 , 5×10^5 y 5×10^6 células en placas con medio LPGA y placas con LPGA suplementado con 10% de sacarosa. Todas las siembras se hicieron por duplicado.

Las colonias que aparecieron en las placas se pasaron, simultáneamente, a placas de LPGA con 10% de sacarosa y a placas de LPGA con 10% de sacarosa y 50 µg/ml de kanamicina. Puesto que el plásmido pK18*mobsacB* contiene el gen *sacB*, letal para la bacteria cuando crece en presencia de sacarosa, las cepas resistentes a sacarosa y sensibles a kanamicina habrán eliminado el plásmido integrado mediante una segunda recombinación homóloga. En el cromosoma bacteriano quedará una copia del gen, la original o la delecionada, lo cual se determinará por PCR y por hibridación con una sonda marcada del gen (*Southern*).

II.9. Métodos de extracción y análisis de proteínas

II.9.1. Extracción de proteínas para análisis proteómico

Se realizó un pre-cultivo de *X. ampelinus* en medio TSB, y se incubó a 24 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 1,5. Se prepararon 6 matraces con 200 ml de medio TSB cada uno, y se inocularon con el volumen adecuado del pre-cultivo para que la DO_{600} inicial fuese 0,05. Por un lado, 3 cultivos se utilizaron como control negativo, suplementándolos con 20 ml de tampón de rotura de hojas¹. A los 3 cultivos restantes se les añadió 20 ml de extracto de hojas, que se preparó como se describe a continuación:

- ✓ Pesar 75 g de hojas de vid.
- ✓ Triturar en 150 ml de tampón de rotura de hojas.
- ✓ Filtrar a través de Nyltal para eliminar restos sólidos.
- ✓ Centrifugar el filtrado durante 20 minutos a 8000 rpm y a 4 °C.
- ✓ Filtrar a través del dispositivo *Vivaspin 20* (Sartorius Stedim Biotech) con un límite de 10 kDa.
- ✓ Congelar a -80 °C hasta su uso.

¹ **Tampón de rotura de hojas:** 25 mM Tris pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10% etanol, 1 mM DTT. Añadir agua hasta 150 ml.

Los 6 cultivos se incubaron a 24 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 1,8, aproximadamente. Todo el proceso de extracción de proteínas se realizó en frío.

II.9.1.1. Extracción de proteínas citoplasmáticas

Las proteínas citoplasmáticas fueron aisladas siguiendo el protocolo descrito en Fernández-Acero y col. (2006) con algunas modificaciones.

Procedimiento:

- ✓ Recoger las células por centrifugación y lavarlas dos veces con agua destilada.
- ✓ Lisar el pellet del cultivo en 5 ml de tampón de lisis¹.
- ✓ Romper las células mediante ultrasonidos con la ayuda de un equipo de sonicación *Sonifier® B-12* (Branson Sonic Power Company). Se sometieron a un total de 30 ciclos (ciclos de 6 s “on” y 15-20 s “off”) y a nivel de potencia 6, refrigerándose la muestra en hielo durante 5 minutos cada 10 ciclos.
- ✓ Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm y pasar el sobrenadante a otro tubo.
- ✓ Precipitar el sobrenadante con 1 volumen de una solución fría de 20% (p/v) de 2,2,2-tricloroacético (TCA) en acetona conteniendo 0,14% (p/v) de 1,4-ditiotreitol (DTT). Incubar al menos 1 hora a -20 °C.
- ✓ Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm y lavar dos veces el precipitado con 1 volumen de acetona fría con 0,07% de DTT. Repetir el lavado con acetona al 80%.
- ✓ Resuspender el pellet final en 500 µl de tampón U/C². Mantener en agitación un mínimo de 2 horas.
- ✓ Eliminar impurezas no disueltas mediante centrifugación. Recoger el sobrenadante y conservarlo a -80 °C.

II.9.1.2. Extracción de proteínas extracelulares

Las proteínas extracelulares fueron aisladas siguiendo el protocolo utilizado por Jami y col. (2010), con algunas variantes, que se describe a continuación.

Procedimiento:

- ✓ Centrifugar 100 ml de cultivo durante 15 minutos a 10000 rpm y 4 °C.
- ✓ Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), utilizando una bomba de vacío. Centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm y 4 °C.
- ✓ Añadir al sobrenadante 1 volumen de una solución fría de 20% de TCA en acetona conteniendo 0,14% (p/v) de DTT. Incubar la mezcla toda la noche a -20 °C.

¹ **Tampón de lisis:** 40 µl/ml de inhibidor de proteasa (Roche), 40mM Tris-HCl, 4% Triton X-100.

² **Tampón U/C:** 8 M urea, 2% CHAPS, 20 mM DTT, 0.002% azul de bromofenol. Una vez filtrado, conservar a -20 °C.

- ✓ Centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm y 4 °C, y eliminar el sobrenadante por completo.
- ✓ Lavar el precipitado dos veces con acetona fría conteniendo 0,07% de DTT, y una vez con acetona fría al 80% en agua Milli-Q.
- ✓ Resuspender el pellet final en 500 µl tampón de muestra U/C. Mantener en agitación hasta su total resuspensión y conservar a -80 °C.

II.9.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la cantidad total de proteínas presentes en una solución se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent* (Bio-Rad), según las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se calculó comparando los valores de absorbancia de las muestras a 595 nm con los de una recta patrón de albúmina sérica bovina (Takara) preparada con concentraciones de proteína conocidas. Para evitar amplios márgenes de error es necesario realizar una nueva recta patrón cada vez que se quieren cuantificar proteínas, dada la variabilidad de intensidad de color del reactivo Bradford a lo largo del tiempo.

II.9.3. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida o SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) permite la separación de las diferentes proteínas presentes en una mezcla, atendiendo exclusivamente a su tamaño, sin que la carga eléctrica de la proteína o su estructura espacial influyan en la movilidad electroforética de la misma.

El gel desnaturizante de poliacrilamida consta de dos fases, en cada una de las cuales la poliacrilamida presenta una concentración diferente: el gel concentrador, en la parte superior, que permite concentrar las muestras, y el gel separador, en la parte inferior, y que se encarga de separar las proteínas según su tamaño. Estos geles tienen en su composición SDS, un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas y les confiere una carga neta negativa, así como una relación entre carga y masa idéntica.

Los geles de poliacrilamida se elaboraron según la técnica descrita por Shapiro y col. (1967). Se empleó el sistema *MiniProtean II* (Bio-Rad).

Procedimiento:

- ✓ Limpiar los cristales con etanol y montarlos sobre el soporte, según las instrucciones del fabricante, con el cristal pequeño hacia adelante y los separadores en los extremos. En función del volumen de carga, se elige el peine y los separadores de un

grosor determinado. Para comprobar que el montaje ha sido correcto, y por lo tanto, no hay pérdidas, llenar el espacio entre los cristales con agua destilada.

- ✓ Preparar en un tubo de polipropileno de 10 ml la mezcla para el gel separador¹. La concentración final de acrilamida dependerá de la resolución que se quiera conseguir. De forma general, se utilizó un gel separador al 12% de acrilamida (*ProtoGel*[®], National Diagnosis). Para geles de 0,75 mm de grosor, preparar 5 ml de gel separador por cada gel.
- ✓ Retirar el agua destilada que se puso entre los cristales y añadir unos 4 ml de la mezcla con acrilamida al 12%. El TEMED es un agente polimerizante, y el persulfato amónico es un catalizador, por lo que una vez añadidos, debe echarse rápidamente la mezcla entre los cristales, evitando que polimerice en el tubo.
- ✓ Cubrir la mezcla que está entre los cristales con isopropanol, para igualar el frente y eliminar burbujas. Dejar polimerizar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
- ✓ Eliminar el 2-propanol y lavar con agua para eliminar los restos del alcohol.
- ✓ Preparar en un nuevo tubo la mezcla para el gel concentrador². En este gel, la poli(acrilamida) debe estar al 5% de concentración. Preparar un volumen de 2 ml por cada gel a polimerizar.
- ✓ Eliminar los restos de agua y añadir la mezcla de acrilamida. Introducir el peine antes de que el gel polimerice.
- ✓ Una vez polimerizado el gel concentrador, introducir el gel en la cubeta de electroforesis, y llenarla con el tampón de electroforesis³. Retirar el peine con cuidado para no deformar los pocillos.
- ✓ Añadir tampón de carga⁴ a las muestras (8 µl de tampón por cada 30 µl de muestra), y hervirlas durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.
- ✓ Preparar el marcador añadiendo 15 µl de buffer de muestra a 5 µl de marcador de peso molecular para SDS-PAGE (*SDS-PAGE Standards, Broad Range*, Bio-Rad).
- ✓ Cargar las muestras de proteínas en el gel junto con el marcador y someter a electroforesis a 150 V durante algo más de 1 hora, hasta que el colorante de las muestras comience a salir del gel.
- ✓ Una vez finalizada la electroforesis, se desmontan los cristales para poder extraer el gel y teñirlo. Para la tinción de los geles de proteínas se empleó el método del

¹ **Gel separador (12% acrilamida):** 1,70 ml agua destilada; 2 ml acrilamida 30% (p/v); 1,30 ml tampón Tris HCl 1,5 M pH 8,8; 50 µl SDS 10% (p/v); 2 µl TEMED; 50 µl persulfato amónico 10% (p/v).

² **Gel concentrador (5% acrilamida):** 1,40 ml agua destilada; 330 µl acrilamida 30% (p/v); 250 µl tampón Tris HCl 1,5 M pH 6,8; 20 µl SDS 10% (p/v); 2 µl TEMED; 20 µl persulfato amónico 10% (p/v).

³ **Tampón de electroforesis para SDS-PAGE (10X):** 0,25 M Tris-HCl pH 8,8; 2 M glicina; 1% SDS.

⁴ **Tampón de carga:** 1,2 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 2 ml SDS 10%; 1 ml glicerol; 500 µl azul de bromofenol 0,5% (p/v); 4,85 ml agua destilada.

coomassie coloidal (Candiano y col., 2004), que permite la obtención de geles más limpios y con una sensibilidad próxima a las tinciones con plata:

- Colocar el gel sobre una placa petri de 15 cm u otro recipiente similar, y cubrirlo durante 30 minutos y en agitación suave con una solución de fijación¹, que estabiliza las proteínas en la matriz del gel.
- Recuperar la solución de fijación para su reutilización, y hacer dos lavados con agua Milli-Q de 10 minutos cada uno en agitación suave.
- Eliminar el agua y añadir la solución de coomassie coloidal² manteniendo la agitación.
- Tras alcanzar la intensidad de tinción deseada, recuperar la solución de coomassie y lavar con agua Milli-Q para eliminar la tinción de fondo.

II.9.4. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La identificación de las proteínas aparecidas en el gel SDS-PAGE se llevó a cabo en el servicio de proteómica de INBIOTEC. Las proteínas se separaron en geles bidimensionales (2-DE), se extrajeron las de mejor resolución y aquellas que presentaron diferencias de expresión. A continuación se digirieron con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de los péptidos, obteniéndose un espectro de masas denominado “huella peptídica” y un espectro de fragmentación, respectivamente. La identificación se realiza de forma automática mediante el sistema GPS (*Global Protein Server*, Applied Biosystems), combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science) sobre bases de datos de secuencias de proteínas.

II.9.5. Expresión de proteínas en el sistema de expresión pET SUMO

Este sistema de expresión utiliza una proteína de pequeño tamaño (11 kDa) denominada SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) que permite la expresión, purificación y la generación de proteínas de fusión recombinantes en *E. coli*. La fusión con SUMO puede incrementar la expresión de proteínas recombinantes y mejora la solubilidad de proteínas parcialmente insolubles.

¹ Solución de fijación: ácido acético glacial 7% (v/v), metanol 7% (v/v).

² Solución de coomassie coloidal: ácido fosfórico 10% (v/v), metanol 20% (v/v), sulfato amónico 10% (p/v), azul de coomassie G-250 0,12%.

Los vectores de expresión pET presentan como ventaja la elevada actividad y especificidad de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, permitiendo la regulación de la expresión de genes en *E. coli* desde el promotor T7.

Con los sistemas pET se utiliza la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3), que contiene el ADN del bacteriófago DE3 integrado en su cromosoma. Este bacteriófago es portador del gen codificante de la ARN polimerasa del fago T7, regulado por el promotor *lacUV5* cuya actividad se induce por la adicción de IPTG. El vector de expresión pET incorpora una región promotora reconocida por la ARN polimerasa del T7, por lo que la adicción de IPTG hace que esta polimerasa induzca la expresión de la proteína integrada en el vector.

A continuación se detallan los pasos del proceso de clonaje y expresión del gen de interés fusionado a la proteína SUMO.

Procedimiento:

1. Amplificación mediante PCR del gen de interés.

Se diseñan oligos específicos para la amplificación completa del gen, desde el inicio hasta el final. Se debe comprobar la correcta amplificación mediante secuenciación, ya que no puede haber ningún error en la secuencia de nucleótidos.

2. Ligación del producto de PCR en el vector pET SUMO.

El producto de la PCR anterior debe tener una adenina libre en el extremo 3', para que la ligación con el pET SUMO sea efectiva. Se utilizaron los reactivos y las cantidades indicadas en el manual "*Champion™ pET SUMO Protein Expression System*" (Invitrogen).

3. Transformación en las células competentes *E. coli* One Shot® Mach1™-T1.

Una vez ligado el inserto al pET SUMO, se realiza la transformación de la construcción en las células competentes *E. coli* One Shot® Mach1™-T1^R:

- ✓ Añadir 2 µl de la ligación en el vial de células competentes.
- ✓ Incubar en hielo de 5 a 30 minutos.
- ✓ Someter las células a un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos, y pasar inmediatamente a hielo.
- ✓ Añadir 250 µl de medio SOC.
- ✓ Mantener en agitación (200 rpm) y a 37 °C durante 1 hora.
- ✓ Sembrar 100 y 200 µl de la transformación en placas de LB con kanamicina 100 µg/ml.
- ✓ Incubar las placas a 37 °C hasta el día siguiente.

4. Selección de colonias y aislamiento de ADN plasmídico. Análisis del plásmido mediante restricción y secuenciación.

Una vez seleccionadas las colonias en placa, se aísla el plásmido de 10-12 de ellas. Posteriormente, hay que comprobar la presencia y orientación del inserto mediante digestión con enzimas de restricción. Para confirmar que el gen está en la correcta

orientación y en fase con el extremo N-terminal, se debe secuenciar la construcción. También se pueden analizar los transformantes positivos mediante PCR.

5. Selección de un transformante positivo, aislamiento del plásmido y transformación en *E. coli* BL21(DE3).

Una vez aislado y purificado el plásmido de un transformante positivo, se transforma la construcción en las células competentes *E. coli* BL21(DE3)¹. Estas células son las indicadas especialmente para la expresión de proteínas recombinantes. Es conveniente transformar también un control positivo, como el plásmido pET SUMO/CAT, que permite la expresión de la proteína de fusión SUMO-CAT.

- ✓ Colocar un vial de células BL21(DE3) por cada transformación en baño de hielo.
- ✓ Añadir 5-10 ng de ADN plasmídico en cada vial de células.
- ✓ Incubar en hielo durante 30 minutos
- ✓ Someter las células a un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos, y pasar inmediatamente a hielo.
- ✓ Añadir 250 µl de medio SOC.
- ✓ Mantener en agitación (200 rpm) y a 37 °C durante 1 hora.
- ✓ Añadir toda la reacción de transformación a 10 ml de LB con kanamicina 50 µg/ml y 1% de glucosa².
- ✓ Incubar a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta el día siguiente.

6. Inducción de la expresión con IPTG.

Una vez crecidos los transformantes, se induce la expresión con IPTG durante varias horas. Se toman varias muestras a diferentes tiempos para determinar el tiempo de expresión óptimo. La finalidad es optimizar la expresión para maximizar la producción de proteína.

- ✓ Inocular 14 ml de LB con kanamicina 50 µg/ml y 1% de glucosa, con 1 ml del cultivo incubado toda la noche (ver paso anterior).
- ✓ Crecer 2 horas, aproximadamente, a 37 °C con agitación, hasta que la DO₆₀₀ sea 0,4-0,6.
- ✓ Repartir el cultivo en dos tubos con 5 ml cada uno. Hacer lo mismo con el cultivo control. Añadir IPTG a una concentración final de 1 mM a uno de los cultivos, de tal manera que se tendrá un cultivo inducido y otro no inducido.
- ✓ Tomar una alícuota de 500 µl de cada cultivo, centrifugar a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 30 segundos, y eliminar el sobrenadante. Conservar los pellets a -20 °C. Éstas serán las muestras a tiempo 0.
- ✓ Continuar con la incubación de los cultivos a 37 °C con agitación.
- ✓ Tomar muestras de cada cultivo cada hora hasta las 6 horas. Para cada tiempo coger 500 µl de muestra y procesar como las de tiempo 0.

7. Análisis de muestras en gel SDS-PAGE.

Una vez finalizada la expresión, las muestras son analizadas en un gel SDS-PAGE (ver el procedimiento en el apartado II.9.3).

¹ En el caso de expresión de genes tóxicos para la célula, se pueden utilizar las células *E. coli* BL21(DE3)pLysS, que reducen el nivel de expresión basal del gen.

² La glucosa aumenta la solubilidad de la proteína y disminuye la expresión basal.

- ✓ Resuspender el pellet de cada muestra en 80 µl de tampón de carga SDS-PAGE 1x y 1 µl de β-mercaptoetanol.
- ✓ Hervir las muestras 10 minutos y centrifugar 1 minuto.
- ✓ Cargar 10 µl del sobrenadante en el gel y conservar a -20 °C el resto de la muestra.

II.10. Ensayos sobre hojas de vid

II.10.1. Obtención de microtallos de vid para cultivo *in vitro*

Para el ensayo sobre hojas de vid se utilizaron plántulas cultivadas *in vitro*. El material vegetal de partida fueron varetas de vid de la variedad tempranillo, recogidas en los meses de septiembre-octubre, que fueron tratadas con fungicida con base de cobre, y colocadas en tarros con agua en una cámara de crecimiento a 25 °C y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Tras aproximadamente 2 meses de inducción, las yemas comenzaron a brotar. Como explantos se tomaron yemas brotadas con 4-5 hojas expandidas, de las que se aislaron segmentos nodales con al menos 2 yemas axilares cada uno para su establecimiento *in vitro*.

Los explantos se esterilizaron con etanol al 70% durante 1 minuto, y a continuación con una solución de hipoclorito sódico 0,4% suplementada con 4 gotas de Tween 20® (200 µl) durante 5 minutos, todo ello en agitación. A continuación se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, hasta eliminar completamente los restos de hipoclorito.

El establecimiento *in vitro* se realizó en campana de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad. Se aislaron segmentos nodales de vid que contenían al menos 2 yemas axilares. Estos segmentos nodales fueron colocados en medio MS (4,43 g/l) con sacarosa (20 g/l), benciladenina (1 mg/l) y agar (8 g/l), pH 5.8, y cultivados a 25 °C y un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad durante 45 días. Una vez brotadas las yemas axilares se aislaron nuevos segmentos nodales como explantos para un nuevo ciclo de multiplicación. Los segmentos nodales así obtenidos se cultivaron como se describió anteriormente. El subcultivo de los microtallos así obtenidos a un medio fresco se realizó cada 45 días.

II.10.2. Inoculación sobre heridas en hojas de vid

Procedimiento:

- ✓ Se recogieron 10 ml de un cultivo de *X. ampelinus* de DO₆₀₀ igual a 1. Se centrifugaron durante 10 min a 8000 rpm y se resuspendió el sedimento en 1 ml de glicerol 20%.

- ✓ Se cogieron hojas procedentes de plántulas de vid crecidas *in vitro* y se les realizó una lesión con una aguja estéril. Se colocaron sobre placas de agar (2%), con el envés hacia arriba.
- ✓ Se utilizó una placa para cada cepa o condición, y en cada placa se pusieron 3 hojas, y se inocularon con 10 μ l.
- ✓ En placas independientes se inocularon hojas con glicerol pero sin la bacteria, como control negativo, y hojas con la cepa silvestre, como control positivo.
- ✓ Todas las placas se sellaron con Parafilm®. Se incubaron a temperatura ambiente en un armario con fotoperiodo (12 horas de luz / 12 horas de oscuridad) hasta la aparición evidente de lesiones.

II.10.3. Determinación de la necrosis foliar

La infección realizada en las hojas de vid produce una lisis celular que ocasiona la pérdida de electrolitos. La medida de la conductividad permite cuantificar la necrosis foliar (Ottmann y col., 2009).

Procedimiento:

- ✓ Añadir 2 ml de agua destilada a 5 hojas, inoculadas con el mismo clon, de 1 cm de diámetro, aproximadamente. Dejar macerando durante 10 minutos.
- ✓ Pasar el sobrenadante a otro tubo y medir la conductividad con un conductímetro (CRISON 522).

II.11. Ensayo de sensibilidad a cationes

El estudio de sensibilidad de distintos clones a una serie de iones metálicos se realizó siguiendo, en líneas generales, el experimento desarrollado por Li y col. (2011). Se llevó a cabo en placas de medio LPGA, suplementando el medio de forma individual con diferentes concentraciones de cloruro de calcio, cloruro de cobalto, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de hierro, sulfato de níquel, cloruro de zinc, sulfato de cobre y sulfato de cadmio. Los pasos a seguir se describen a continuación:

- ✓ Inocular una colonia en 5 ml de medio, y crecerla hasta una DO_{600} de 0,5.
- ✓ Hacer diluciones del cultivo de 10^{-1} a 10^{-6} en el mismo medio líquido que el utilizado en las placas de ensayo.
- ✓ Inocular las placas, de izquierda a derecha, con 2 μ l de cada dilución. Incubar a 24 °C.

II.12. Determinación de niveles intracelulares de cationes

Los niveles intracelulares de distintos cationes se determinaron mediante espectrometría de absorción atómica (EAA), utilizando el espectrómetro UNICAM 969 AA Spectrometer. El procedimiento seguido es una modificación del de Li y col. (2011).

- ✓ Crecer dos cultivos de 200 ml en medio TSB, uno de ellos suplementado con 0,15 mM del ión metálico. Mantener en incubación hasta que alcancen una DO_{600} de 0,6.
- ✓ Centrifugar las células y lavarlas dos veces con tampón Tris¹ frío. Resuspender en 10 ml del mismo tampón.
- ✓ Lavar las células dos veces con tampón a temperatura ambiente.
- ✓ Hacer un lavado con agua doblemente destilada libre de metales para eliminar las sales.
- ✓ Lisar las células resuspendiendo en 1 ml de HNO_3 70% mediante vórtex. Calentar a 75 °C durante 10 minutos.
- ✓ Añadir 9 ml de agua Milli-Q estéril a las células lisadas. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
- ✓ Recoger el sobrenadante y analizar el contenido en cationes, tanto del cultivo suplementado como del cultivo control, mediante EAA.

II.13. Ensayo de mortalidad por peróxido de hidrógeno

Este ensayo permite ver el efecto del peróxido de hidrógeno en la supervivencia de la bacteria mediante el recuento de células viables tras la exposición a este reactivo.

Procedimiento:

- ✓ Crecer por duplicado cultivos de 50 ml hasta que su DO_{600} sea 0,3.
- ✓ Centrifugar las células y resuspenderlas en 5 ml de PBS².
- ✓ Tratar una de las dos suspensiones celulares con 10mM de H_2O_2 durante 15 minutos. El otro tubo sin tratar será el control.
- ✓ Centrifugar las células y lavarlas con 10 ml de medio fresco TSB.
- ✓ Sembrar muestras sin diluir y diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en placas de LPGA para calcular el número de bacterias viables.

¹ **Tampón Tris:** 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 10 mM KCl.

² **PBS:** 0,8 g NaCl; 0,02 g KCl; 0,144 g Na_2HPO_4 ; 0,024 KH_2PO_4 ; ajustar el pH a 7,4 con HCl y añadir agua destilada hasta 100 ml. Autoclavar.

II.14. Ensayo de medida de actividad catalasa y superóxido dismutasa

Las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) forman parte de la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo. La SOD cataliza la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, mientras que la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

II.14.1. Obtención de extractos celulares

Procedimiento (modificado de Li y Schellhorn, 2007):

- ✓ Preparar cultivos de 200 ml en medio TSB por triplicado. El cultivo de cada cepa se suplementará con el antibiótico adecuado.
- ✓ Crecer los cultivos a 25 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO_{600} igual a 1.
- ✓ Lavar las células con tampón fosfato 0,05 M (pH 7)¹. Resuspender el pellet en 3 ml de tampón de extracción². Pasar a tubos de 10 ml.
- ✓ Lisar las células por sonicación a 4 °C durante 12 ciclos con pulsos de 3 segundos cada 60 segundos.
- ✓ Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y recoger el sobrenadante en alícuotas de 1 ml.
- ✓ Determinar la concentración de proteína mediante método Bradford.

II.14.2. Determinación de la actividad catalasa

La actividad catalasa se calcula en base a la tasa de descomposición del peróxido de hidrógeno, que es proporcional a la reducción de la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 240 nm.

Procedimiento (modificado de Aebi, 1984):

- ✓ Centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 2 minutos. Diluirlas con tampón fosfato si fuese necesario. Mantenerlas en hielo.
- ✓ Diluir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con el tampón fosfato hasta una concentración final de 10,6 mM. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente.
- ✓ Preparar el blanco de la reacción (500 μ l de tampón fosfato). Medir inmediatamente en el espectrofotómetro (*PharmaSpec UV-1700*, SHIMADZU) a una $\lambda=240$ nm durante 90 segundos, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor (Hellma).

¹ **Tampón fosfato 0,05M pH7:** 2,653 g K_2HPO_4 ; 1,326 g KH_2PO_4 ; agua destilada hasta 500 ml.

² **Tampón de extracción:** Tris-HCl 50 mM pH 7,5; glicerol 10% (v/v); EDTA 0,1 mM; Triton X-100, 0,1%; DTT 2 mM (añadir en fresco).

- ✓ Añadir 20 μl de extractos libres de células¹ a 500 μl de tampón fosfato con H_2O_2 . Escanearlos de la misma manera.

La actividad enzimática de la catalasa (AE) se expresó en unidades de actividad (U) por mililitro. Una unidad de catalasa fue definida como la cantidad de enzima presente en el sobrenadante del extracto celular que reduce 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 25 °C. La AE se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$\text{AE (U/ml)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\text{min}} \cdot \frac{1000}{\epsilon \cdot b} \cdot F$$

$\Delta\text{DO/min}$: tasa de reducción de la absorbancia.

ϵ : coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($39,58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

b : espesor de la cubeta (1 cm).

F : (vol. total / vol. muestra) x factor de dilución.

Se referenció la actividad de la enzima respecto a la cantidad de proteína presente en el extracto, expresándola en unidades por miligramo de proteína. Es lo que se denomina actividad enzimática específica (AEE).

II.14.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

El método empleado para cuantificar la actividad SOD se basa en la capacidad de la SOD para inhibir la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) por el anión superóxido. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que causa la mitad del máximo de inhibición de la reducción del NBT. La determinación de la actividad se realizó empleando el kit comercial *SOD determination kit* (Sigma), basado en un método colorimétrico, que emplea una sal de tetrazolio soluble en agua que se colorea cuando es reducida por el anión superóxido. La actividad de la SOD se cuantifica midiendo la disminución del color a 450 nm.

El procedimiento emplea 3 blancos: el primero contiene solución de enzima y agua Milli-Q, el segundo tampón de dilución y una de las muestras, y el tercero tampón de dilución y agua Milli-Q. En la Tabla II.3 se indican las cantidades a añadir de cada solución para las muestras y los blancos.

¹ El volumen de extracto a añadir puede variar según la recta de descomposición del H_2O_2 obtenida. Si la absorbancia disminuye rápidamente en los primeros segundos, se debe añadir menos volumen o diluir la muestra.

	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Solución de muestra	20 µl		20 µl	
Agua Milli-Q		20 µl		20 µl
Solución WST	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Solución de enzima	20 µl	20 µl		
Tampón de dilución			20 µl	20 µl

Tabla II.3. Cantidades a utilizar de cada solución para la preparación de las reacciones.

Procedimiento:

- ✓ Preparar las reacciones de las muestras y los 3 blancos en una microplaca de 96 pocillos. Es recomendable hacer las reacciones por triplicado.
- ✓ Añadir 20 µl de muestra y también al pocillo correspondiente al blanco 2.
- ✓ Añadir 20 µl de agua Milli-Q a los blancos 1 y 3.
- ✓ A continuación, añadir 200 µl de la solución WST a todas reacciones, tanto de muestras como de blancos, y mezclar.
- ✓ Añadir 20 µl de tampón de dilución a los blancos 2 y 3.
- ✓ Añadir 20 µl de la solución de enzima a cada muestra y al blanco 1. Mezclar bien.
- ✓ Incubar la placa a 37 °C durante 20 minutos.
- ✓ Leer la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (*Synergy HT*, BIO-TEK).
- ✓ Calcular la actividad SOD (% inhibición) mediante la siguiente expresión:

$$\text{Actividad SOD} = \frac{(A \text{ blanco 1} - A \text{ blanco 3}) - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco 2})}{A \text{ blanco 1} - A \text{ blanco 3}} \times 100$$

La actividad enzimática de la SOD expresada en unidades de actividad por mililitro se calculó considerando el volumen de muestra (V) y el factor de dilución (FD):

$$AE \text{ (U/ml)} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50\%} \cdot \frac{1}{V} \cdot FD$$

Considerando la concentración de proteína en la muestra, se expresa la actividad enzimática en unidades de actividad por miligramo de proteína.



Resultados y Discusión

III.1. Estudios preliminares de *Xylophilus ampelinus*

Dado el escaso conocimiento y bibliografía disponibles sobre *X. ampelinus* fue necesario realizar una serie de estudios o experimentos preliminares y básicos que permitiesen conocer mejor el comportamiento de la bacteria sobre la que versa este trabajo, y que servirán de base para los posteriores estudios realizados.

III.1.1. Selección de medio y condiciones de cultivo

En una revisión de la bibliografía publicada sobre *Xylophilus ampelinus*, se observó que los medios más frecuentemente utilizados para su crecimiento en medio sólido eran NA, GYCA, YGC y LPGA, mientras que para crecimiento en medio líquido se empleaban NB y TSB. Por ello se realizaron cultivos con cada uno de estos medios (incluido LPGA sin agar) obteniéndose mejor y más rápido crecimiento con los medios GYCA, LPGA y TSB. Por su facilidad en la preparación, se eligió LPGA como medio rutinario para los cultivos en placa y TSB para los cultivos en medio líquido.

En cuanto a la temperatura de incubación, 24-25 °C fue el rango óptimo observado para el crecimiento de *Xylophilus*, coincidiendo con las distintas publicaciones sobre esta bacteria.

III.1.2. Identificación de *X. ampelinus* mediante secuenciación del ARNr 16S y PCR anidada

Antes de comenzar a trabajar con la cepa silvestre *X. ampelinus* CFBP2098, procedente del INRA, se verificó que, en efecto, se trataba de esa especie.

El método más habitual para identificar una bacteria y establecer sus relaciones filogenéticas es la secuenciación de su ADN ribosomal (ADNr) 16S, previa amplificación por PCR de una región conservada del mismo (Weisburg y col., 1991). Utilizando los oligonucleótidos universales 16Sa (27f) y 16Sb (1492r) (Frank y col., 2008), se amplificó esta región del ADN de *X. ampelinus*, y se determinó su secuencia. Seguidamente se hizo una comparación con secuencias de ADNr depositadas en bases de datos de secuencias de nucleótidos, con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El resultado obtenido mostró que el fragmento de ADNr amplificado y secuenciado exhibía una identidad del 100% con una región del ADNr 16S de *X. ampelinus*. Este sencillo experimento confirmó

que la bacteria con la que estábamos trabajando correspondía a la especie *X. ampelinus* (Tabla III.1).

Tabla III.1. Resultado del alineamiento de la secuencia amplificada por PCR, correspondiente al ADNr 16S de la bacteria objeto de estudio, realizado mediante la herramienta BLAST. Se señala la identidad de la secuencia analizada con el ADNr 16S de *Xylophilus ampelinus*. El valor E representa la probabilidad de que la secuencia comparada sea distinta de la obtenida en la base de datos (cuanto menor es el valor E, mayor es la similitud existente entre ambas secuencias).

Referencia	Descripción	Cobertura secuencia	Valor E	Identidad máxima
<u>AF078758.1</u>	Secuencia parcial del gen para el ARN ribosomal 16S (<i>Xylophilus ampelinus</i>)	100%	0.0	100%
<u>NR_036931.1</u>	Secuencia parcial del gen para el ARN ribosomal 16S (<i>Xylophilus ampelinus</i> cepa BPIC 48)	98%	0.0	100%
<u>AB504747.1</u>	Secuencia parcial del gen para el ARN ribosomal 16S (<i>Xylophilus</i> sp. Iris 8914a)	99%	0.0	99%
<u>AJ292624.1</u>	Secuencia parcial del para el ARN ribosomal 16S (bacteria no cultivable WD291)	98%	0.0	98%
<u>AB513921.1</u>	Secuencia parcial del gen para el ARN ribosomal 16S (<i>Variovorax</i> sp. RA8)	99%	0.0	97%

Como comprobación adicional se realizó una PCR anidada con cebadores específicos. En efecto, en la última década, Botha y colaboradores (2001) diseñaron un ensayo específico para la detección de *X. ampelinus* en sarmientos de vid, basado en una PCR anidada. Esta técnica consiste en dos etapas de amplificación, en las que el producto de la primera es utilizado como molde para realizar la segunda con oligonucleótidos que se sitúan dentro de la primera secuencia amplificada. En un primer paso se amplificó la región espaciadora 16S-23S del ADNr, utilizando la pareja de oligonucleótidos universales A1 (5'-AGTCGTAACAAGGTAAGCCG -3') y B1 (5'-CYRYTGCCAAGCATCCACT -3')¹. El oligo A1 está situado al final del ADNr 16S, y el B1 al comienzo del ADNr 23S. El producto de esta PCR tiene un tamaño de 742 pb. En la segunda etapa, 1 µl del producto de amplificación anterior fue utilizado como ADN molde en otra PCR con la pareja de oligos específicos S3 (5'-GGTGTAGGCCGAGTAGTGAG -3') y S4 (5'-GGTCTTTCACCTGACGCGTTA -3'). Estos cebadores más internos están situados en la región espaciadora de genes muy conservados del ARNt. El tamaño del fragmento que amplifican es de 277 pb. El resultado de esta PCR anidada fue positivo (Figura III.1).

¹ Y = C/T; R = A/G

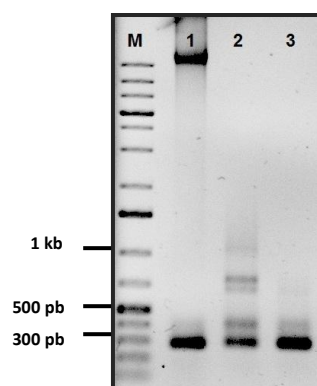


Figura III.1. Resultado de la 2ª etapa de la PCR anidada para la determinación de *X. ampelinus*. Para la optimización de la amplificación se utilizó como molde ADN genómico (1), ADN producto de la 1ª etapa de la PCR anidada (2) y una dilución 1/10 del producto de la 1ª etapa (3). M: marcador de peso molecular de 1kb *DNA Ladder Plus*.

III.1.3. Curva de crecimiento

Existen diversas formas de medir el crecimiento microbiano, una de las más habituales consiste en la elaboración de una curva de crecimiento. Ésta se obtiene midiendo la absorbancia de un cultivo a una longitud de onda determinada (que para muchas especies bacterianas suele ser de 600 nm) a distintos tiempos hasta la saturación del mismo.

Para determinar la curva de crecimiento de *X. ampelinus* se emplearon 4 cultivos de 100 ml de medio TSB, con una DO_{600} inicial de 0,05 y cuyas condiciones de incubación fueron 24 °C y 220 rpm. Los tiempos a los que se tomaron muestras y los datos de absorbancia obtenidos se reflejan en la Figura III.2, al igual que la representación de la curva de crecimiento resultante de representar gráficamente los valores medios obtenidos.

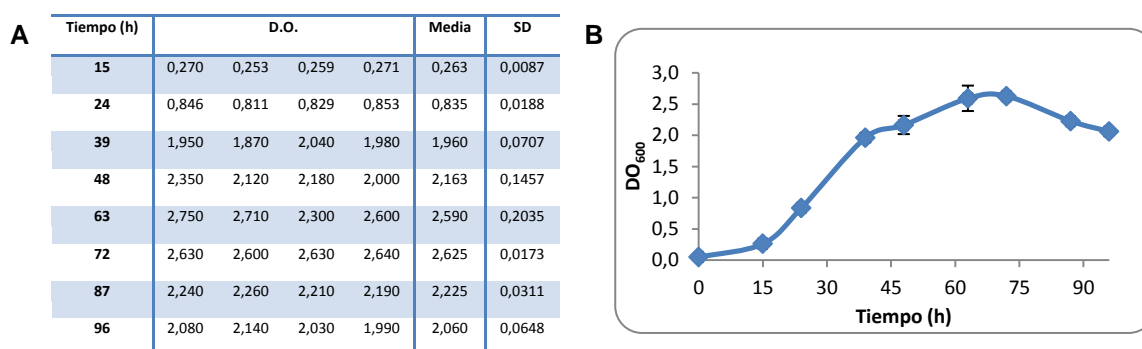


Figura III.2. A). Datos de la absorbancia de los cultivos a distintos tiempos de incubación, incluyendo la media y la desviación estándar. **B).** Curva de crecimiento de *Xylophilus ampelinus*.

Como se puede apreciar en dicha figura, para las condiciones de cultivo empleadas la curva de crecimiento se caracteriza por una fase de latencia relativamente larga de unas 15 horas de duración. La fase logarítmica se puede considerar que se extendería

aproximadamente desde las 15 a las 72 horas. A partir de este momento el cultivo entra en una fase de lisis, apreciándose un descenso en los valores de DO.

III.1.4. Relación entre la densidad óptica de un cultivo y el número de células

Un dato que puede resultar muy útil a la hora de trabajar con un microorganismo es determinar la relación existente entre el valor de DO de un cultivo y el número de células existentes en un volumen determinado. Esta relación, nos permite conocer el número de células aproximado de un cultivo midiendo simplemente su densidad óptica en un espectrofotómetro.

Para determinar esta relación el primer paso consistió en medir la DO_{600} de un cultivo líquido tras 4 días de incubación a 25 °C y 220 rpm. Seguidamente se tomó una muestra y se hizo una dilución 10^{-1} , de tal forma que la medida de la absorbancia estuviese comprendida entre 0,2 y 0,5. Esto se hace para que la medida sea proporcional a la densidad celular, ya que a elevadas concentraciones pueden formarse agregados celulares y producirse un efecto “pantalla” de unas células sobre otras. La DO_{600} del cultivo obtenida fue 1,94, considerando la dilución realizada en la muestra. El cultivo fue diluido hasta obtener una DO_{600} igual a 1. A continuación se hicieron diluciones seriadas, y se sembraron por duplicado en placas de LPGA (100 μ l de las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-8}). Para hacer las diluciones se tomó como referencia que esa densidad en *E. coli* equivale a 8×10^8 células/ml. Las placas se incubaron hasta que se desarrollaron colonias. Una vez crecidas, se contaron las colonias en las diluciones en las que fue posible (diluciones 10^{-5} y 10^{-6}). Así, considerando el volumen sembrado y la dilución realizada, se calculó la media del nº células/ml. El dato obtenido fue $9,7 \times 10^8$ células/ml para una DO_{600} igual a 1.0.

III.1.5. Optimización de las condiciones de electroporación de *X. ampelinus*

Son diversos los experimentos diseñados a lo largo de este trabajo que requieren de la introducción de material genético en la bacteria mediante electroporación. Por ello, se pusieron a punto las condiciones de electroporación para *X. ampelinus*.

Tomando como referencia publicaciones sobre electroporación de distintas especies de *Xanthomonas* (Kamoun y Kado, 1990; Lee y col., 2004; Do Amaral y col., 2005), se probaron una serie de condiciones con el objetivo de conseguir la mayor eficiencia posible en la transformación.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando 40 μ l de células electrocompetentes y 2 μ l de ADN plasmídico (100 ng/ μ l). Los parámetros para cada condición probada se indican en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Parámetros ensayados para la electroporación de *X. ampelinus*.

Tratamiento	Voltaje (kV)	Capacitancia (μ F)	Resistencia (Ω)	Tiempo (ms)
1	2,5	25	100	2,42
2	2,5	25	200	4,54
3	2,0	25	100	2,42
4	2,0	25	200	4,34

Una vez dado el pulso eléctrico, se añadió 1 ml de SOC frío. Inmediatamente la suspensión celular se incubó a 25 °C y 200 rpm durante 2 horas. Tras este tiempo se sembró la transformación en placas con medio LPGA y el antibiótico correspondiente (10 μ g/ml de kanamicina). Las placas se incubaron a 25 °C hasta la aparición de transformantes.

Como en estas condiciones no hubo crecimiento de transformantes, se hicieron algunas variaciones. En esta ocasión se utilizaron 50 μ l de células electrocompetentes y 2 μ l de ADN plasmídico (200 ng) y, en otra transformación, 50 μ l de células electrocompetentes y 1 μ l del transposoma comercial EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>Tnp (33 ng). Los parámetros eléctricos probados en ambas transformaciones fueron los correspondientes al tratamiento nº 2 y nº 4 de la Tabla III.2.

Tras el pulso eléctrico dado con el electroporador, se añadió 1 ml de TSB suplementado con 20 mM de glucosa. Los tubos se incubaron a 25 °C y 200 rpm durante 8 horas en el caso de la electroporación con las condiciones del tratamiento nº 4, y durante 24 horas para los tubos a los que se aplicó el tratamiento nº 2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron las transformaciones en placas con medio LPGA y 10 μ g/ml de kanamicina.

Sólo hubo crecimiento de transformantes en las placas correspondientes al tratamiento nº 4. El nº total de transformantes obtenidos fue 84 para la electroporación con el plásmido, y 871 para la electroporación con el transposoma.

Por lo tanto, las condiciones que se consideraron más adecuadas para la electroporación de células de *X. ampelinus*, y que se utilizaron en todas las electroporaciones posteriores fueron 50 μ l de células electrocompetentes y 60-200 ng de ADN, un pulso eléctrico de 2,0 kV, 25 μ F y 200 Ω , y 8 horas de expresión en 1 ml de medio TSB suplementado con

20 mM de glucosa. Utilizando estas condiciones se obtuvieron rutinariamente unas eficiencias de transformación de $4,20 \times 10^2$ transformantes/ μg de ADN plasmídico y de $2,63 \times 10^4$ transformantes/ μg de transposoma.

III.1.6. Sensibilidad a antibióticos

Son varios los experimentos que requieren de la selección de cepas mediante el uso de antibióticos. Por ello, era necesario conocer si *Xylophilus ampelinus* presenta resistencia natural a alguno de los antibióticos más comunes.

Los antibióticos ensayados fueron: ácido nalidíxico, ampicilina, apramicina, cefalexina, D-cicloserina, cloranfenicol, espectinomina, estreptomina, higromicina, kanamicina y trimetoprima. Partiendo de un cultivo en medio sólido LPGA de *X. ampelinus*, se hicieron siembras en placas del mismo medio suplementado con uno de los antibióticos. Las concentraciones utilizadas y los resultados de resistencia obtenidos a los 4 días de incubación se muestran en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Resultados de la sensibilidad de *X. ampelinus* a distintos antibióticos. (+) crecimiento, (X) no crecimiento, (nd) no determinado.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
	5	10	20	30	40	50	100
Ácido nalidíxico	X	X	X	X	X	X	nd
Ampicilina	X	X	X	X	X	X	nd
Apramicina	+	+	X	X	X	X	nd
Cefalexina	X	X	X	X	X	X	nd
D-cicloserina	+	X	X	X	X	X	X
Cloranfenicol	X	X	X	X	X	X	nd
Espectinomina	X	X	X	X	X	X	nd
Estreptomina	X	X	X	X	X	X	nd
Higromicina	X	X	X	X	X	X	nd
Kanamicina	X	X	X	X	X	X	X
Trimetoprima	X	X	X	X	X	X	nd

Los resultados ponen de manifiesto la elevada sensibilidad de *X. ampelinus* a una amplia variedad de antibióticos, presentando una ligera resistencia a concentraciones muy bajas de apramicina y D-cicloserina.

III.2. Análisis proteómico de *X. ampelinus*

Debido al carácter patógeno de *X. ampelinus*, resulta especialmente interesante hacer un estudio proteómico que permita conocer aquellas proteínas relacionadas con mecanismos de virulencia bacteriana y patogénesis. La caracterización del proteoma se realizó mediante electroforesis en geles bi-dimensionales (2-DE) y análisis por espectrometría de masas (MS y MS/MS). Para poner de manifiesto las diferencias de expresión durante el proceso patogénico, se creció la bacteria en presencia de extracto de hojas de vid. Se considera que existe expresión diferencial cuando el ratio del volumen medio para un punto (presente en las tres réplicas biológicas) es mayor de 1,5 y el valor de p asociado es inferior a 0,05. Se abordó tanto el análisis del proteoma intracelular como del extracelular.

III.2.1. Análisis del proteoma intracelular. Posibles factores de patogenicidad

El mapa del proteoma intracelular de los dos tratamientos, se obtuvo a partir de los geles 2-DE correspondientes a 6 extracciones independientes (3 inducidas mediante adición de un extracto de hojas de vid y 3 muestras control). Los geles permitieron visualizar manchas correspondientes a proteínas con un peso molecular que va desde 20 a 120 kDa y un pH en el rango 3-10. La mayor parte de las proteínas visualizadas se localizaron en la región básica (mitad derecha del gel) y en el intervalo de tamaños de 25-75 kDa (Figura III.3).

Se visualizaron en los geles una media de 763 puntos, de los cuales 75 se extrajeron para su identificación posterior por espectrometría de masas, presentando expresión diferencial 10 de ellos. Nueve de estas proteínas (proteínas nº 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 13 en la Figura III.3 y en la Tabla III.4) aparecen sobreexpresadas cuando la bacteria crece en presencia de extracto de hojas de vid, representando el 0,7% del volumen total de puntos.

La comparativa con las bases de datos, realizada por el motor de búsqueda MASCOT, permitió conocer la función exacta de 61 de las 75 proteínas aisladas (Tabla III.4), considerando las 14 restantes como proteínas hipotéticas no caracterizadas o predicciones de proteínas, a 3 de las cuales se les pudo asignar una función biológica putativa.

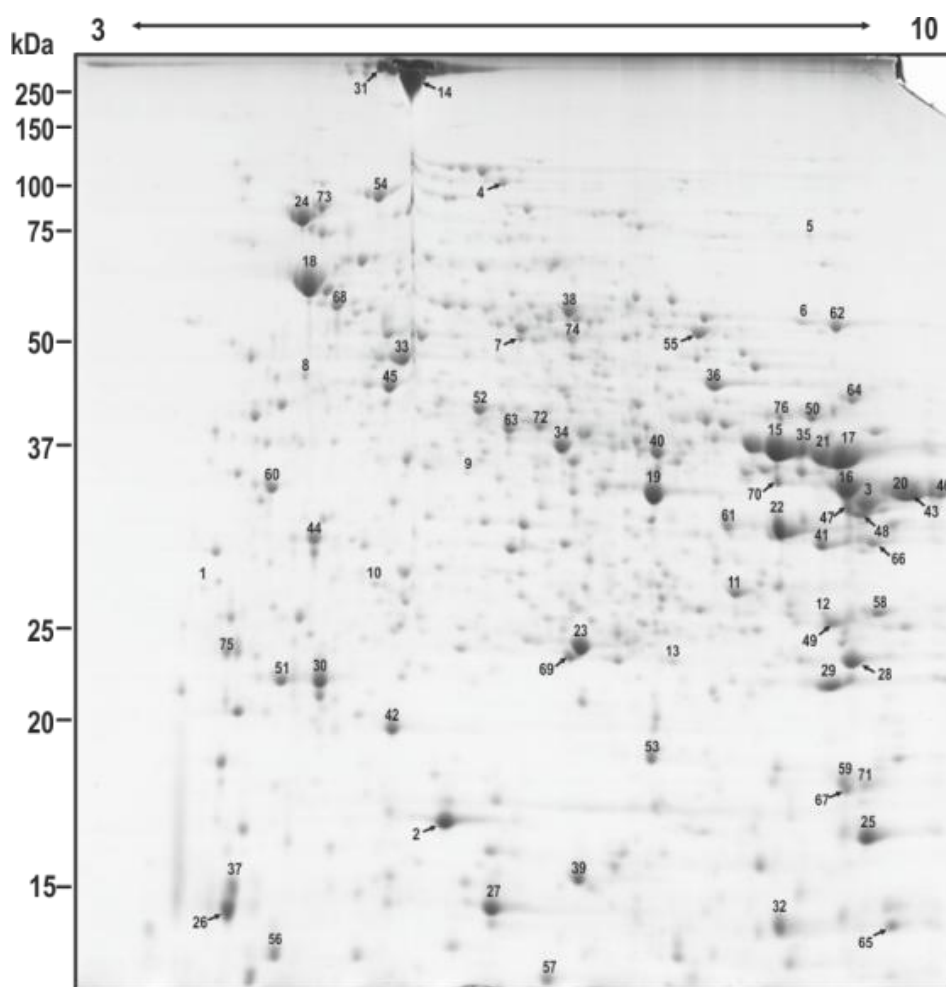


Figura III.3. Gel 2-DE SDS-PAGE al 12,5% del proteoma intracelular de *X. ampelinus*. Se indican los puntos correspondientes a las proteínas identificadas.

En la Figura III.4 se representa gráficamente la clasificación de las proteínas identificadas según su función, siguiendo el *MIPS Functional Catalogue (FunCat description)*. El grupo mayoritario incluye proteínas implicadas en **metabolismo o producción de energía** (20%), alguna de las cuales participan en el ciclo de Krebs como la fumarato hidratasa (punto 7), malato deshidrogenasa (punto 19), succinato deshidrogenasa (punto 38), succinil-CoA sintetasa (punto 40) y citrato sintasa (punto 73), mientras que la fructosa bifosfato aldolasa (punto 62) participa en la ruta glucolítica. Otras como la glutamato sintasa (punto 9) y la aspartato deshidrogenasa (punto 71) intervienen en el metabolismo de aminoácidos, o en la síntesis de ácidos grasos como la proteína transportadora de grupos acilo (punto 37). Dos de los puntos (42 y 65) se corresponden con fosfatasa y otros dos (52 y 59) con proteínas implicadas en el transporte electrónico. Relacionadas con el metabolismo de nucleótidos se identificaron la ATP sintasa (punto 67) y la adenilsuccinato liasa (punto 39).

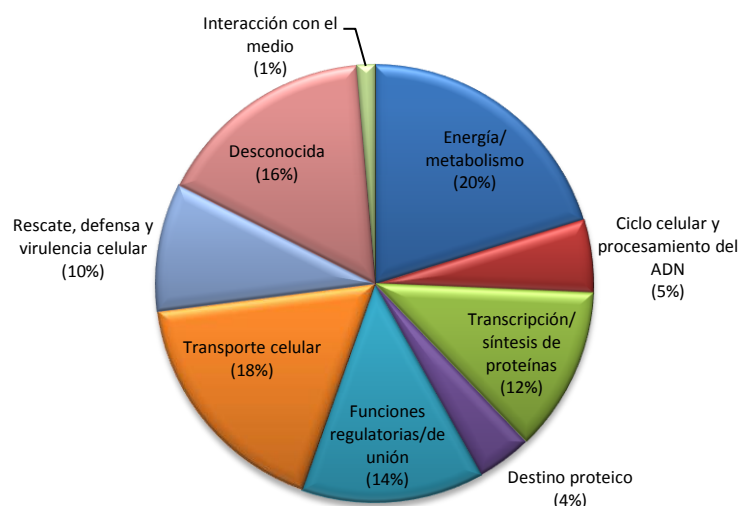


Figura III.4. Clasificación funcional de las proteínas citoplasmáticas de *X. ampelinus*, siguiendo la clasificación del MIPS Funcional Catalogue.

Otro de los grupos más numerosos (18%) es el de proteínas relacionadas con el **transporte celular**. En él se incluyen transportadores ABC (puntos 3, 10, 17, 21 y 65), que se encargan del transporte activo de membrana, porinas (puntos 20, 43 y 46), proteínas de unión extracelular implicadas en transporte activo a través de la membrana (puntos 22, 60, 63 y 69) y el dominio fasciclina de la proteína β -ig-h3 (punto 25), que media la adhesión y transporte celular.

En menor proporción, le sigue el grupo de proteínas **reguladoras o de unión** (14%), en el que aparecen proteasas (puntos 6 y 61), proteínas de unión a ácidos nucleicos (puntos 32, 41 y 70), proteínas de unión extracelular (puntos 1, 15 y 75), una proteína de unión a cofactores como la biotina (punto 23) y la lipoproteína de unión a membrana NlpA (punto 58). Esta lipoproteína contribuye a la formación de vesículas de la membrana externa que pueden contener toxinas, siendo un factor de virulencia en algunas bacterias como *E. coli* (Bodero y col., 2007).

Dentro del grupo de proteínas involucradas en **transcripción y síntesis proteica** (12%) se incluyen factores de elongación (puntos 5, 33, 34, 44 y 54), la proteína ribosómica L7/L12 (punto 56) necesaria en la traducción, y la valil-ARNt sintetasa (punto 26). Además, se identificaron dos reguladores transcripcionales, uno de la familia LuxR (punto 68) y PecS (punto 74). Este regulador, PecS, tiene un importante papel en la expresión coordinada de genes relacionados con factores de virulencia (Hommais y col., 2008). Las proteínas de la familia LuxR también podrían estar implicadas en la regulación de la patogénesis bacteriana (Alonso-Hearn y col., 2010).

Uno de los grupos que puede resultar más interesante es el formado por proteínas relacionadas con **defensa celular y virulencia** (10%). Es el caso de la catalasa (punto 4), que se encarga de proteger a la célula del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno y que puede actuar como factor de virulencia en algunas bacterias. Otra proteína con funciones de protección frente al estrés oxidativo es la alquil hidroperóxido reductasa (punto 30), la cual contribuye con su actividad antioxidante a la homeostasis de la célula. Por otro lado, se identificaron tres chaperonas: GroEL (punto 18), DnaK (punto 24) y HtpG (punto 72). Aunque su función es facilitar el plegamiento y estabilización de otras proteínas, actúan como respuesta a una situación de estrés térmico, además de estar implicadas en patogénesis (Neckers y Tatu, 2008). Los puntos 36 y 49 se corresponden con dos proteínas unidas a la membrana externa de la célula, TolB y Pal, que se encargan de mantener la integridad de la envuelta celular de bacterias Gram negativas y participan en la traslocación de partículas a través de ella. Estas proteínas forman parte de un sistema proteico denominado Tol-Pal involucrado en la patogénesis de diversas especies bacterianas (Bowe y col., 1998; Godlewska y col., 2009).

Menos numeroso es el conjunto de proteínas relacionadas con el **ciclo celular y el procesamiento del ADN** (5%), que incluye una tubulina (punto 8) implicada en la división celular, una helicasa (punto 14), y dos proteínas que participan en procesos de reparación y recombinación del ADN: una exodeoxirribonucleasa (punto 12) y una hipotética proteína FbacS (punto 29).

Otro grupo es el encargado de controlar y regular el **destino proteico** (4%), es decir el destino celular de otras proteínas, compuesto por una proteasa C-terminal (punto 55) y dos peptidil-prolil isomerasas (puntos 53 y 66) que se ocupan de acelerar el plegamiento de las proteínas y que están relacionadas con factores de virulencia (Reffuveille y col., 2012).

Por último, se identificó una posible dineína (punto 2) dentro del grupo de proteínas con funciones de **interacción con el medio** (1%), responsable del movimiento del flagelo.

A la vista de los resultados del análisis queda patente la variedad funcional del proteoma intracelular de *X. ampelinus*. Llama especialmente la atención la cantidad de proteínas que, aún teniendo funciones principales diferentes, están involucradas en mayor o menor medida en procesos de virulencia que tienen lugar durante la interacción entre patógeno y hospedador. Este resultado cobra aún mayor sentido y coherencia si se tiene en cuenta el microorganismo sobre el que se ha hecho el análisis: una bacteria patógena de vid.

Tabla III.4. Lista de proteínas citoplasmáticas identificadas de *X. ampelinus*.

Punto	Nº de acceso	Proteína identificada ¹	Organismo	PC/ puntuación ²	PM/pl experimental	PM/pl teórico
1	gi 14278671	Cadena A, lisozima	<i>Gallus gallus</i>	12/308	26,2/4,4	14,8/9,3
2	gi 291391949	Predicción: dineína	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	33/80	16,1/5,6	463,7/5,8
3	gi 338821408	Transportador ABC de unión a sustrato	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11/79	31,5/7,6	39,9/7,6
4	gi 261211705	Catalasa	<i>Vibrio</i> sp.	6/93	94,3/5,8	56,8/8,4
5	gi 299135122	Factor de elongación específico de selenocisteína	<i>Afipia</i> sp.	13/83	72,1/8,2	64,1/7,4
6	gi 241763846	Proteasa Do	<i>Acidovorax delafieldii</i>	5/198	49,8/8,1	51,5/9,3
7	gi 323373182	Fumarato hidratasa, clase II	<i>Acidovorax avenae</i>	8/190	47,6/5,9	49,4/6,2
8	gi 337278607	Tubulina	<i>Ramlibacter tataouinensis</i>	9/353	43,1/5,1	42,3/5,0
9	gi 374368971	Glutamato sintasa	<i>Cupriavidus basilensis</i>	20/74	33,8/5,7	179,3/7,3
10	gi 351728553	Transportador ABC	<i>Acidovorax radidis</i>	4/112	26,5/5,4	25,1/6,1
11	gi 197294912	Proteína de unión extracelular a aminoácidos	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	8/91	25,9/7,2	39,4/8,7
12	gi 261219151	Exodeoxirribonucleasa V	<i>Brucella ceti</i>	9/69	24,7/8,3	41,7/7,0
13	gi 351732935	Proteína hipotética	<i>Acidovorax radidis</i>	4/170	21,7/6,7	20,3/6,5
14	gi 227548339	Helicasa	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	12/87	296,2/5,5	60,5/5,5
15	gi 121611818	Receptor de unión extracelular	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	6/92	35,6/7,7	40,1/8,9
16	gi 162454982	Proteína hipotética	<i>Sorangium cellulosum</i>	18/82	32,5/8,6	138,6/5,7
17	gi 351729978	Transportador ABC de unión periplásmica a azúcares	<i>Acidovorax radidis</i>	8/146	34,8/8,5	38,5/9,1
18	gi 326315731	Chaperonina GroEL	<i>Acidovorax avenae</i>	16/638	57,5/5,1	57,0/5,2
19	gi 332528256	Malato deshidrogenasa	<i>Hylemonella gracilis</i>	11/477	32,1/6,6	35,0/8,4
20	gi 239816132	Porina	<i>Variovorax paradoxus</i>	5/135	32,2/9,5	38,2/9,8
21	gi 404266325	Transportador ABC de unión a sustrato	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	5/166	34,8/8,3	38,8/6,6
22	gi 91789746	Proteína de unión extracelular a solutos	<i>Polaromonas</i> sp.	5/438	29,8/7,8	32,0/9,2
23	gi 258597921	Putativa biotina carboxilasa de la acetil CoA carboxilasa	<i>Plasmodium falciparum</i>	29/86	22,6/6,2	39,7/7,7
24	gi 398804590	Chaperona DnaK	<i>Polaromonas</i> sp.	13/442	78,6/5,1	69,4/5,1

¹ La asignación de la función enzimática a las proteínas hipotéticas se muestra entre paréntesis y en cursiva.

² Número de péptidos coincidentes/puntuación.

Resultados y Discusión

Punto	Nº de acceso	Proteína identificada ¹	Organismo	PC/ puntuación ²	PM/pi experimental	PM/pi teórico
25	gi 365088923	Fasciclina / β -ig-h3	<i>Acidovorax</i> sp.	4/149	15,7/8,9	18,7/9,5
26	gi 341577890	Valil- ARNt sintetasa	<i>Streptococcus agalactiae</i>	15/79	13,9/4,6	101,1/4,9
27	gi 17545360	Producto del gen groES	<i>Ralstonia solanacearum</i>	7/402	14,0/5,8	10,4/5,8
28	gi 196011279	Proteína hipotética	<i>Trichoplax adhaerens</i>	54/131	21,6/8,7	71,2/5,9
29	gi 372209378	Proteína hipotética (<i>FbacS</i>)	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>	12/78	20,3/8,4	98,0/9,3
30	gi 71274707	Alquil hidroperóxido reductasa	<i>Xylella fastidiosa</i>	5/92	20,5/5,2	20,7/5,5
31	gi 322709722	Proteína hipotética	<i>Metarhizium anisopliae</i>	15/97	325,9/5,4	51,4/6,3
32	gi 398810631	Dominio RRM de unión a ARN	<i>Variovorax</i> sp.	3/192	13,6/7,8	16,4/9,5
33	gi 239813600	Factor de elongación Tu	<i>Variovorax paradoxus</i>	18/760	45,0/5,5	43,4/5,5
34	gi 239815581	Factor de elongación Ts	<i>Variovorax paradoxus</i>	13/450	35,8/6,1	32,6/5,9
35	gi 352103132	Proteína hipotética	<i>Halomonas</i> sp.	17/90	35,5/8,1	101,1/7,4
36	gi 319762343	TolB	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	6/149	41,9/7,0	47,2/9,4
37	gi 402565406	Transportador de grupos acilo	<i>Burkholderia cepacia</i>	7/76	14,5/4,7	7,6/5,5
38	gi 325525897	Succinato semialdehido deshidrogenasa	<i>Burkholderia</i> sp.	11/237	52,0/6,1	51,0/6,5
39	gi 227893934	Adenilsuccinato liasa	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	13/77	14,7/6,2	49,3/5,9
40	gi 332531167	Succinil-CoA sintetasa	<i>Hylemonella gracilis</i>	16/599	35,3/6,6	31,5/8,4
41	gi 56707751	Proteasa La de unión a ADN	<i>Francisella tularensis</i>	12/76	28,9/8,3	86,4/8,2
42	gi 109899628	Fosfatasa Ppx/GppA	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	13/81	18,8/5,4	57,4/8,6
43	gi 239816132	Porina	<i>Variovorax paradoxus</i>	4/135	32,4/10,2	38,2/9,8
44	gi 239814785	Factor de elongación P	<i>Variovorax paradoxus</i>	9/380	29,3/5,1	20,8/5,0
45	gi 221126321	Predicción: proteína hipotética	<i>Hydra magnipapillata</i>	10/523	41,7/5,4	41,4/5,4
46	gi 239816132	Porina	<i>Variovorax paradoxus</i>	3/114	32,2/10,4	38,2/9,8
47	gi 328852243	Proteína hipotética	<i>Melampsora larici-populina</i>	6/79	31,2/8,7	36,2/8,7
48	gi 87306730	Proteína hipotética	<i>Blastopirellula marina</i>	4/83	30,8/8,8	5,6/9,5
49	gi 395005343	Pal	<i>Acidovorax</i> sp.	7/149	24,1/8,4	13,0/9,4
50	gi 337755855	Proteína hipotética	<i>Francisella</i> sp.	17/84	38,5/8,2	82,9/5,5

Punto	Nº de acceso	Proteína identificada ¹	Organismo	PC/ puntuación ²	PM/pi experimental	PM/pi teórico
51	gi 121609946	Bi-fosfatasa inorgánica	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	5/145	20,6/5,0	19,9/5,5
52	gi 239813058	Flavin oxidorreductasa	<i>Variovorax paradoxus</i>	5/152	39,3/5,7	39,2/5,5
53	gi 89900139	Peptidil-prolil isomerasa	<i>Rhodoferax ferrereducens</i>	2/92	17,9/6,6	18,3/6,3
54	gi 398807077	Factor de elongación EF-G	<i>Polaromonas</i> sp.	25/744	87,5/5,4	77,1/5,3
55	gi 239817073	Proteasa carboxi-terminal	<i>Variovorax paradoxus</i>	11/376	48,2/6,9	52,4/7,7
56	gi 91790276	Proteína ribosomal 50S L7/L12	<i>Polaromonas</i> sp.	5/274	13,0/5,0	12,7/4,9
57	gi 302685145	Proteína hipotética	<i>Schizophyllum comune</i>	4/130	12,4/6,0	53,5/9,2
58	gi 333913856	Lipoproteína NLPa	<i>Delftia</i> sp.	9/481	24,8/9,0	29,9/9,3
59	gi 319781307	Flavoproteína de transferencia de electrones	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	4/135	32,7/5,0	31,6/5,0
60	gi 91789746	Proteína de unión extracelular de solutos	<i>Polaromonas</i> sp.	6/448	30,0/7,1	32,0/9,2
61	gi 121610184	Proteasa Do	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	7/241	49,1/8,5	51,6/9,3
62	gi 120613209	Fructosa-bifosfato aldolasa	<i>Acidovorax avenae</i>	11/510	37,3/5,9	38,3/5,6
63	gi 239817103	Proteína de unión extracelular de solutos	<i>Variovorax paradoxus</i>	12/421	40,4/8,7	47,8/9,3
64	gi 71907006	Proteína hipotética	<i>Dechloromonas aromatica</i>	21/94	13,6/9,3	166,1/6,2
65	gi 395007334	Transportador periplásmico ABC de azúcares	<i>Acidovorax</i> sp.	5/364	29,0/9,0	33,1/9,4
66	gi 365087914	Ciclofilina tipo peptidil-prolil isomerasa	<i>Acidovorax</i> sp.	2/201	17,0/8,6	20,5/9,3
67	gi 398808389	ATP sintetasa	<i>Variovorax</i> sp.	24/1020	53,3/5,2	50,3/5,2
68	gi 120612503	Regulador transcripcional LuxR	<i>Acidovorax avenae</i>	8/417	21,9/6,1	23,3/6,0
69	gi 326317500	Proteína de unión extracelular a solutos	<i>Acidovorax avenae</i>	2/105	33,1/7,8	32,7/9,1
70	gi 337281472	Proteína de unión a ARN	<i>Ramlibacter tataouinensis</i>	4/296	17,1/8,9	15,1/9,6
71	gi 91789463	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	<i>Polaromonas</i> sp.	5/171	37,5/6,0	40,8/5,8
72	gi 262373989	Chaperona htpG	<i>Acinetobacter junii</i>	9/145	82,8/5,2	72,0/4,9
73	gi 388568479	Citrato sintasa I	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	9/391	47,7/6,1	48,9/6,4
74	gi 401703805	PecS	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	6/73	22,3/4,6	20,7/5,9
75	gi 319790904	Receptor de unión extracelular	<i>Variovorax paradoxus</i>	9/102	38,5/7,8	43,7/8,8

III.2.2. Análisis del proteoma extracelular. Posibles factores de patogenicidad

El estudio proteómico de *X. ampelinus*, iniciado con la caracterización del proteoma intracelular, se continuó con el análisis de las proteínas secretadas por este microorganismo. El mapa de referencia del proteoma extracelular se obtuvo a partir de geles 2-DE, que permitieron resolver las proteínas aisladas del sobrenadante de los 6 cultivos empleados. En el gel de referencia se visualizan puntos en el rango de pH 3-10, y tamaños entre 15 y 100 kDa (Figura III.5). Se distinguieron una media de 248 proteínas, 38 de las cuales se analizaron por espectrometría de masas para intentar su identificación.

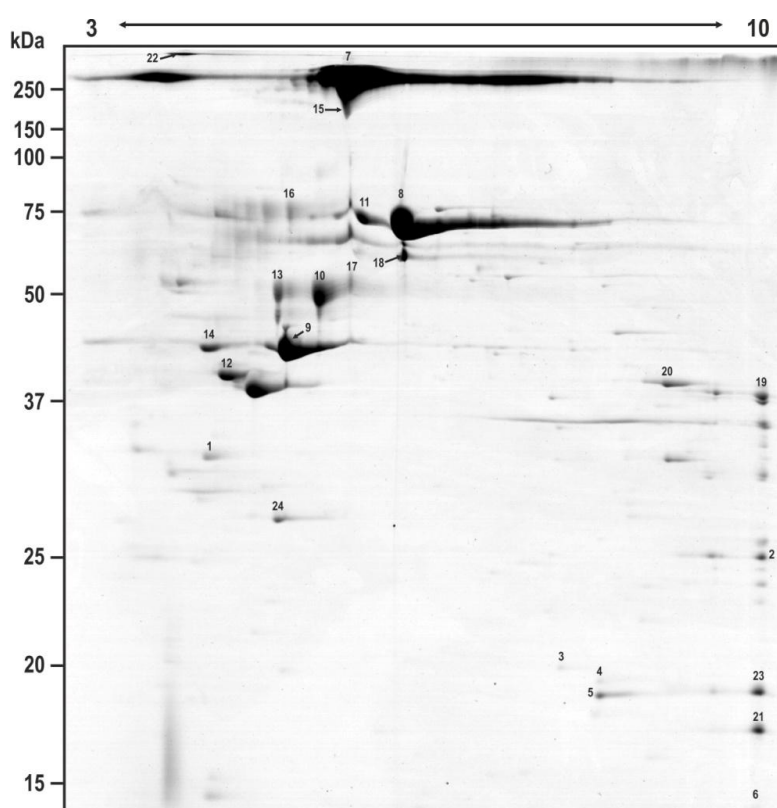


Figura III.5. Gel 2-DE SDS-PAGE al 12,5% del proteoma extracelular de *X. ampelinus*. Se indican los puntos correspondientes a las proteínas identificadas.

En cuanto a las diferencias de expresión, sólo 2 de las proteínas analizadas estaban sobreexpresadas en los cultivos que se suplementaron con extracto de hojas de vid, mientras que 16 proteínas se detectaron en niveles inferiores en estas mismas condiciones. Las restantes 20 proteínas cuyo análisis se llevó a cabo se eligieron por ser las más abundantes en los geles, en lo que a volumen del punto se refiere, representando en conjunto las 38 proteínas seleccionadas un 48,86% del volumen total. Tan sólo 2 proteínas del conjunto analizado (proteínas nº 3 y 5 en la Figura III.5) cumplen los criterios de expresión diferencial,

tanto de porcentaje de volumen como de valor p : se trata de una peptidil-prolil isomerasa (proteína nº 3) y de una TrbM (proteína nº 5).

La búsqueda con MASCOT permitió identificar 13 proteínas. Con las demás proteínas se hizo una comparativa de la secuencia de aminoácidos, derivada del análisis por espectrometría de masas (MS/MS), con la base de datos del NCBI, empleando para ello la herramienta informática ProBLAST (Applied Biosystems). Este análisis permitió asignar posibles funciones biológicas a otras 11 proteínas (Tabla III.5). El resto de proteínas analizadas no se pudieron identificar, bien porque no se obtuvo el número de péptidos suficiente (es necesario un mínimo de dos), bien porque los espectros peptídicos obtenidos no fueron fiables, o porque no se detectaron coincidencias con proteínas depositadas en las bases de datos.

Como análisis complementario se utilizó el software SignalP para predecir la presencia de secuencias péptido señal clásicas. Dicho análisis detectó 6 proteínas con hipotéticos péptidos señal (proteínas nº 3, 5, 19, 20, 23 y 24 en Figura III.5 y Tabla III.5), lo cual sugiere un posible carácter como proteína secretada y, por tanto, su posible localización extracelular en condiciones fisiológicas. El software SecretomeP permitió detectar 9 proteínas sin péptido señal clásico y que, por tanto, podrían ser secretadas mediante un mecanismo de secreción diferente (no-clásico), tratándose también de proteínas extracelulares. Las 9 proteínas restantes presentes en el secretoma son proteínas intracelulares, ya que no tienen péptido señal. Esto puede deberse a una lisis celular durante el crecimiento bacteriano o durante la preparación de las muestras.

La clasificación funcional de las proteínas identificadas se representa en la Figura III.6, en la cual se observa que los 3 grupos mayoritarios engloban el 50% del secretoma. Comprenden funciones de ciclo celular y procesamiento del ADN, funciones regulatorias o de unión, y funciones en la interacción con el medio ambiente. En el grupo de **proteínas regulatorias o de unión** se incluyen dos proteínas de unión (puntos 1 y 20), una periplásmica y la otra extracelular, y dos proteínas hipotéticas (puntos 9 y 11), un posible dominio FHA que reconoce epitopos de treonina y una proteasa LonB. Esta proteasa dependiente de ATP juega un papel importante en el control de la calidad proteica, degradando proteínas deficientes o con mutaciones. Además, es necesaria para la homeostasis celular y supervivencia frente a cambios inducidos por estrés. En bacterias patógenas regula la expresión de genes de virulencia que promueve la infección celular (Tsilbaris y col., 2006; Breidenstein y col., 2012). Se identificaron además 2 proteínas implicadas en el proceso de conjugación bacteriana, TrbM (puntos 4 y 5) y TrbI (punto 2), y una enzima de restricción de tipo III (punto 14), todas ellas pertenecientes al grupo funcional de **ciclo celular y procesamiento del ADN**. Dentro del grupo

relacionado con la **interacción con el medio**, se incluyen 3 flagelinas (puntos 10, 13 y 17) y una posible dineína (punto 22) cuya localización citoplásmica no hace fiable su inclusión como proteína del secretoma.

El grupo más abundante en el análisis de las proteínas citoplasmáticas fue el de **funciones metabólicas y de energía**. Sin embargo, en el secretoma sólo se localizaron dos proteínas englobadas en esta categoría: una putativa exoglucanasa (punto 8), que hidroliza la celulosa, y una diguanilato ciclasa (punto 6), que sintetiza guanosina monofosfato cíclica. Este nucleótido está implicado en la expresión de genes de virulencia.

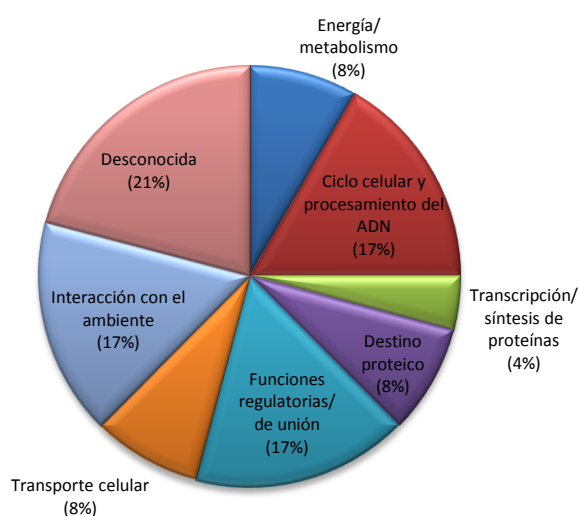


Figura III.6. Clasificación funcional de las proteínas extracelulares de *X. ampelinus*, siguiendo la clasificación del MIPS Funcional Catalogue.

Otro grupo con sólo dos componentes es el de proteínas que controlan el **destino proteico**. Lo forman dos peptidil-prolil isomerasas (puntos 3 y 23) que se encargan de acelerar el plegamiento de las proteínas, y que están relacionadas con factores de virulencia, como ya se comentó anteriormente. Se identificaron dos proteínas con funciones de **transporte celular**, un transportador ABC de azúcares a través de la membrana (punto 19), y el dominio fasciclina de la proteína β -ig-h3 (punto 21), que media la adhesión y transporte celular. En cuanto a proteínas relacionadas con la **transcripción** sólo se encontró el regulador transcripcional HypF (punto 16), necesario para la maduración del ARN ribosomal 16S.

En contra de lo que cabría esperar, apenas se han identificado proteínas implicadas en procesos de patogénesis. Sólo 4 de ellas tienen algún tipo de relación con procesos de virulencia: dos peptidil-prolil isomerasas, una diguanilato ciclasa y una hipotética LonB. Estas dos últimas no parece que tengan ningún tipo de péptido señal, por lo que es dudoso que pertenezcan al secretoma. La elevada proporción de proteínas no identificadas, 14 de un total

de 38 analizadas, puede tener su explicación en el hecho de que el genoma de *X. ampelinus* no está secuenciado, lo cual es una dificultad añadida a la hora de identificar muchas de ellas.

Tabla III.5. Lista de proteínas identificadas secretadas por *X. ampelinus*.

Punto	Nº de acceso	Proteína identificada ¹	Organismo	PC/puntuación ²	Mejores péptidos (PRO-BLAST)	Identificada por	PM/pl experimental	PM/pl teórico	Péptido señal
1	gi 385806371	Proteína periplásmica de unión	<i>Feridicoccus fontis</i>	2/71	EAGAGM*DNNRTTNITM*R M*GDIDGVTTNITM*R	PRO-BLAST	32,0/4,5	41,8/4,7	1,0
2	gi 121582572	TrbI	<i>Acidovorax</i> sp.	6/216		MASCOT	25,0/10,3	49,3/9,0	NN ³
3	gi 302879534	Peptidil-prolil isomerasa	<i>Gallionella capsiferriformans</i>	2/83	DDVPKEDVIITK KTKDNTLM*HR	PRO-BLAST	19,6/6,6	21,1/7,8	1,0
4	gi 379049180	TrbM	<i>Salmonella enterica</i>	5/157		MASCOT	19,0/6,9	7,9/5,3	No
5	gi 359743198	TrbM	Bacteria no cultivable	7/255		MASCOT	18,4/6,9	21,7/8,6	NN
6	gi 392393061	Diguanilato ciclasa	<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i>	13/93		MASCOT	14,3/10,1	52,1/6,3	NN
7	gi 322696955	Proteína hipotética	<i>Metarhizium acridum</i>	6/69	DPTDNSC*TIPATAVARR KC*IVATAPITRNTGIPR	PRO-BLAST	422,4/5,5	87,5/9,6	No
8	gi 299073863	Putativa exoglucanasa A	<i>Ralstonia solanacearum</i>	8/79	VSVTSDVSNAGYC*ER TIAPSATVEM*GM*C*AAR	PRO-BLAST	69,6/5,7	63,4/8,1	NN
9	gi 153806364	Proteína hipotética (dominio FHA)	<i>Bacteroides caccae</i>	10/95		MASCOT	42,1/5,2	20,4/5,9	1,0
10	gi 124268051	Flagelina	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	6/76	VNSM*KDDAAVGAALER GDDGTVTAM*VTKEGNGNM*SNKM *R	PRO-BLAST	49,5/5,4	41,9/4,5	NN
11	gi 390934517	Proteína hipotética (proteasa, LonB)	<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	12/85		MASCOT	71,8/5,5	32,7/6,7	No
12	gi 325923703	Proteína putativa de secreción	<i>Xanthomonas gardneri</i>	8/115	DYAIEGIEWNAR PSVPLVVKHVPHLRVYMR	PRO-BLAST	39,4/4,7	29,4/4,4	NN
13	gi 121596100	Flagelina	<i>Acidovorax</i> sp.	2/116		MASCOT	50,0/5,2	29,2/5,3	NN
14	gi 312069940	Enzima de restricción tipo III	<i>Loa loa</i>	8/72	IDGTIEPNPVC*AKDNM*TR VSPKAVDEKGR	PRO-BLAST	42,7/4,5	118,8/8,6	No
15	gi 158424865	Proteína hipotética	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	5/70	C*M*HRWNAGNDYSTLAALGSK TDM*TM*SIPTR	PRO-BLAST	230,0/5,5	43,6/11,0	No
16	gi 34557188	HypF	<i>Wolinella succinogenes</i>	16/94		MASCOT	73,8/5,2	81,2/6,4	No
17	gi 124268051	Flagelina	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	6/75	VNSM*KDDAAVGAIAER FENALGTLDKNENVSASR	PRO-BLAST	52,4/5,5	41,9/4,5	NN
18	gi 401074752	Proteína hipotética	<i>Bacillus cereus</i>	18/84		MASCOT	60,0/5,7	108,3/8,6	No
19	gi 351729978	Transportador ABC	<i>Acidovorax radicis</i>	11/284		MASCOT	37,2/10,3	38,5/9,1	1,0
20	gi 332530553	Proteína de unión extracelular	<i>Hylemonella gracilis</i>	4/108		MASCOT	38,5/8,3	39,6/8,5	1,0
21	gi 365088921	β -lg-H3	<i>Acidovorax</i> sp.	4/189		MASCOT	17,0/10,2	18,7/9,5	No
22	gi 348508304	Predicción: dineína citoplásmica	<i>Oreochromis niloticus</i>	2/70	TWGASDGAUVSPGAATAGLR TDRISM*TDDD	PRO-BLAST	633,4/4,2	487,4/6,1	No
23	gi 365087914	Peptidil-prolil isomerasa	<i>Acidovorax</i> sp.	3/184		MASCOT	18,5/10,2	20,5/9,3	1,0
24	gi 326315043	Proteína hipotética	<i>Acidovorax avenae</i>	3/73	DGTEAGSPGTVTIDM*R RSSVVM*YSAVGPIKDNR	PRO-BLAST	27,4/5,2	27,6/6,9	1,0

¹ La asignación de la función enzimática a las proteínas hipotéticas se muestra entre paréntesis y en cursiva.

² Número de péptidos coincidentes/puntuación.

³ Proteínas de secreción no clásica.

III.3. Clonación y caracterización del gen *tolB*

De entre las proteínas relacionadas con mecanismos de patogénesis, identificadas en el análisis del proteoma intracelular de *X. ampelinus*, se eligió TolB para hacer un estudio más en profundidad del gen codificante de la misma, además de tratar de confirmar su posible papel en patogenicidad.

III.3.1. TolB y el complejo Tol-Pal

TolB es una proteína que se localiza en el periplasma de la envuelta celular de bacterias Gram negativas. Pertenece al sistema proteico Tol-Pal que está compuesto por cinco proteínas: TolA, TolQ y TolR, que interaccionan entre ellas en la membrana interna, y TolB y Pal (*Peptidoglycan-associated lipoprotein*), que forman otro complejo en la membrana externa (Bouveret y col., 1995; Clavel y col., 1998). TolB interacciona además con porinas de la membrana externa (Rigal y col., 1997). A través de estas múltiples conexiones se mantiene la unión entre las tres capas de la envuelta celular (Figura III.7).

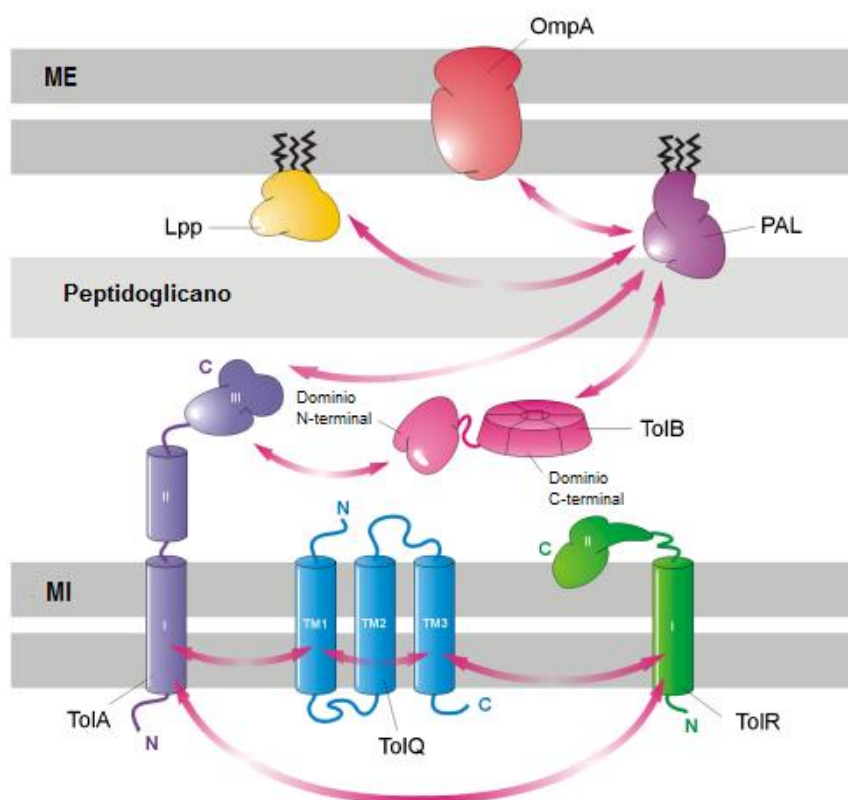


Figura III.7. Ubicación de las proteínas del complejo Tol-Pal en la pared celular de bacterias Gram negativas. ME: membrana externa. MI: membrana interna. (Modificado de Godlewska y col., 2009).

Tol-Pal es un sistema muy conservado entre bacterias Gram negativas (Sturgis, 2001) y necesario para el mantenimiento de la integridad de la membrana externa (Lazzaroni y col.,

1999; Cascales y col.; 2002). Mutaciones en alguno de los genes *tol-pal* provoca cambios en la bacteria, tales como hipersensibilidad a detergentes, antibióticos y otros agentes deletéreos, además de la liberación de proteínas periplásmicas al medio, división celular anómala, reducción de la motilidad y producción de vesículas de la membrana externa (OMVs) que pueden contener factores de virulencia, enzimas degradativas, porinas y proteínas periplásmicas como TolB (Llamas y col., 2000; Lloubès y col., 2001; Lazzaroni y col., 1999; Bernadac y col., 1998). Los efectos de las mutaciones pueden ser letales en algunas especies bacterianas (Dubuisson y col., 2005; Yeh y col., 2010), resultando este complejo proteico esencial para su viabilidad. Aunque se desconoce la función específica del sistema Tol-Pal, se sabe que tiene múltiples roles fisiológicos, incluyendo el mantenimiento de la unión entre la membrana externa y el peptidoglicano, la expresión de antígenos lipopolisacáridos de superficie y factores de virulencia, la traslocación de ADN filamentoso de fagos durante la infección y de colicinas (toxinas producidas por *E. coli*), además participan en la división celular y en el transporte de compuestos a través de la membrana citoplasmática (Clavel y col., 1998; Gaspar y col., 2000; Vines y col., 2005; Bouveret y col., 1998; Riechmann y Holliger, 1997; Gerding y col., 2007; Llamas y col., 2003).

Diversos trabajos ponen de manifiesto la implicación de algunos de los genes *tol-pal* en la patogénesis de *E. coli* (Hellman y col., 2002), *Haemophilus ducreyi* (Fortney y col., 2000), *Salmonella enterica* (Bowe y col., 1998), *Vibrio cholerae* (Heilpern y Waldor, 2000), *Erwinia chrysanthemi* (Dubuisson y col., 2005) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Oscarsson y col., 2008). Se sabe que en *E. coli* la proteína Pal inicia la inflamación en la sepsis, mientras que en *V. cholerae* los mutantes *tolQRA* muestran una defectuosa entrada del ADN fágico que codifica para la toxina del cólera. Sin embargo, no se conoce muy bien cómo participan los genes *tol-pal* en los mecanismos de virulencia de las demás bacterias (Godlewska y col., 2009).

III.3.2. Construcción de una genoteca de *X. ampelinus*

Una librería génica (genoteca) es una herramienta útil para el aislamiento de fragmentos de ADN y genes de interés. El genoma de *Xylophilus ampelinus* no está secuenciado, por lo que la construcción de su genoteca es un primer paso en el conocimiento del mismo. Para su elaboración se utilizó el vector fágico λ -DASH II/BamHI (Stratagene), siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (apartado II.7.1). Este bacteriófago permite clonar fragmentos de ADN de hasta 23 kb, empaquetándose el ADN recombinante *in vitro* en la cápsida proteica del fago. Éste infecta a la bacteria, donde se replica y genera múltiples copias, que llevan el fragmento de ADN de interés en la clonación.

III.3.2.1. Digestión parcial del ADN genómico de *X. ampelinus* y ligación al vector λ -DASH II/BamHI

El ADN genómico de *X. ampelinus* se digirió parcialmente con la enzima Sau3AI, para así obtener fragmentos de ADN de un tamaño adecuado para la construcción de la genoteca (15-21 kb). Esta enzima genera extremos cohesivos compatibles con los del vector λ -DASH II digerido con BamHI. Inicialmente, se realizaron ensayos de digestión a pequeña escala (con unos 10 μ g de ADN) con la finalidad de determinar la concentración óptima de enzima.

Las concentraciones de enzima Sau3AI ensayadas fueron las siguientes: 0,25 U/ μ l, 0,125 U/ μ l, $6,25 \times 10^{-2}$ U/ μ l, $3,125 \times 10^{-2}$ U/ μ l, $1,56 \times 10^{-2}$ U/ μ l, $7,8 \times 10^{-3}$ U/ μ l, $3,9 \times 10^{-3}$ U/ μ l, $1,95 \times 10^{-3}$ U/ μ l, 9×10^{-4} U/ μ l, $4,5 \times 10^{-4}$ U/ μ l y 0 U/ μ l. La concentración óptima de Sau3AI resultó ser $3,9 \times 10^{-3}$ U/ μ l, puesto que fue la que generó una mayor proporción de fragmentos de un tamaño comprendido entre 20-30 kb.

Se realizó a continuación una digestión parcial a gran escala utilizando 50 μ g de ADN por reacción. El cambio de escala no siempre se comporta igual que las condiciones iniciales, por lo que se realizó la digestión con varias concentraciones de enzima, además de la determinada como óptima en el ensayo previo a pequeña escala. En concreto se emplearon el doble de la concentración óptima, ella misma y su mitad, respectivamente: $7,8 \times 10^{-3}$ U/ μ l, $3,9 \times 10^{-3}$ U/ μ l y $1,95 \times 10^{-3}$ U/ μ l. En este caso, la concentración óptima fue $1,95 \times 10^{-3}$ U/ μ l.

Tras la digestión a gran escala, se realizó una segunda selección de fragmentos mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Este paso permite incrementar la eficiencia del empaquetamiento, ya que se eliminan muchos de los fragmentos que no presentan un tamaño adecuado y que además reducirían el número de moléculas de vector disponible para la ligación con fragmentos de ADN de tamaño óptimo. Las fracciones separadas se analizaron en un gel de agarosa (Figura III.8).

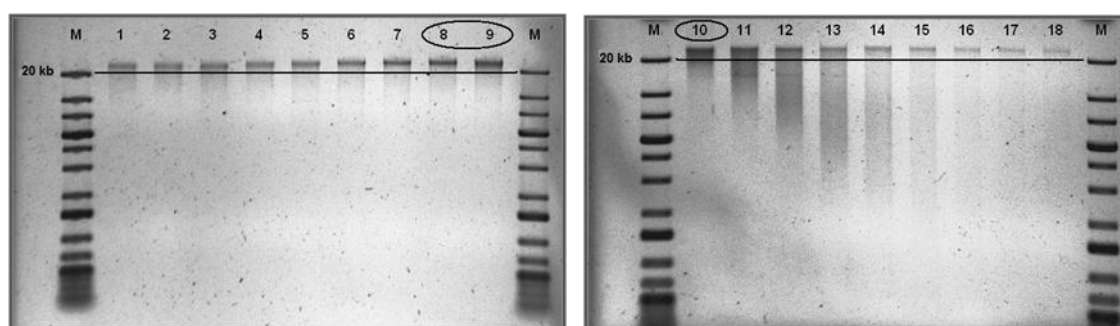


Figura III.8. Visualización en gel de agarosa de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. M: marcador de peso molecular de 1kb *DNA Ladder Plus*. Carriles 1-18: fracciones de la digestión parcial. Las líneas horizontales corresponden a un tamaño de ADN de 20 kb. Las fracciones señaladas fueron las utilizadas para el empaquetamiento.

El siguiente paso consistió en la ligación de los fragmentos de ADN seleccionados con el fago λ -DASH II digerido con BamHI. El producto de la ligación fue encapsidado *in vitro* en fagos, por la adición de extractos crudos de células bacterianas que contienen las proteínas necesarias para ensamblar un fago completo (*Gigapack III XL Packaging extract*, Stratagene). Estos fagos, que contienen los diferentes fragmentos del ADN genómico de *X. ampelinus* clonados en el vector fágico λ -DASH II, son los encargados de transferir estas construcciones a las células *E. coli* XL1 Blue-MRA (P2) hospedadoras mediante infección.

III.3.2.2. Titulación de la genoteca mediante infección en medio sólido de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA (P2)

El producto del empaquetamiento se tituló con el objeto de comprobar si contenía un número de fagos suficiente para que la genoteca fuese representativa del genoma total de *X. ampelinus*. La titulación se realizó mediante una infección a pequeña escala (20 μ l de diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-4} de la solución de fagos) y posterior recuento de las colonias infectadas en cada dilución. El número de fagos recombinantes obtenidos en el empaquetamiento se calcula en función del número de halos de lisis (ufp o unidades formadoras de placas) aparecidos en las infecciones realizadas en cada placa de cultivo, la dilución utilizada y el volumen de solución de fagos añadido. El valor obtenido fue 7500 fagos recombinantes en el volumen total de la mezcla de encapsidación (500 μ l).

La representatividad de una librería génica viene dada por la siguiente ecuación descrita por Clarke y Carbon (1976):

$$N = \frac{\ln(1 - p)}{\ln(1 - f)}$$

N = número de fagos recombinantes necesarios

p = probabilidad de que un gen determinado se encuentre representado en algún clon

f = cociente entre el tamaño medio de los insertos y el tamaño real del genoma del organismo

Como ya se comentó en el apartado II.7.1. de Materiales y Métodos, al desconocerse el tamaño del genoma de *X. ampelinus*, se ha asumido como referencia el tamaño de una especie muy próxima filogenéticamente, *Variovorax paradoxus*, que es aproximadamente 6 Mb (Han y col., 2011). Por otro lado, se consideró que el tamaño promedio de los fragmentos encapsidados fue 15 kb, y que p debe ser del 0,9998 (99,98%) para que la genoteca sea suficientemente representativa. Por lo tanto, el número de fagos recombinantes necesarios (N) debe ser 3403. La mezcla de empaquetamiento contiene más del doble de los fagos necesarios, siendo por tanto la genoteca obtenida representativa del genoma de *Xylophilus ampelinus*.

El siguiente paso fue la amplificación de la genoteca, que se tituló procediendo del mismo modo descrito con anterioridad, obteniéndose un título final de $4,25 \times 10^8$ ufp/ml.

III.3.3. Amplificación de un fragmento interno del gen *tolB* por PCR

La librería genómica de *X. ampelinus* permitirá aislar y caracterizar diferentes genes de esta bacteria. Para ello, el primer paso es obtener un fragmento interno del gen de interés que se utilizará como sonda para rastrear la genoteca. El gen sobre el que se realizó el estudio fue *tolB*, codificante de la proteína periplásmica TolB, identificada en el análisis proteómico. Esta identificación, a través del motor de búsqueda MASCOT, se realizó por homología con los péptidos de TolB en *Alicyclophilus denitrificans*. Partiendo de esta secuencia, se realizó una comparativa con la base de datos de proteínas del NCBI para conocer las especies cuyas secuencias de TolB fuesen más similares, resultando ser las pertenecientes a los géneros *Acidovorax*, *Comamonas* y *Variovorax*. A continuación se hizo un alineamiento entre ellas con la finalidad de elegir las zonas más conservadas, y así diseñar unos cebadores degenerados que permitiesen amplificar mediante PCR una secuencia interna de *tolB* (Figura III.9).

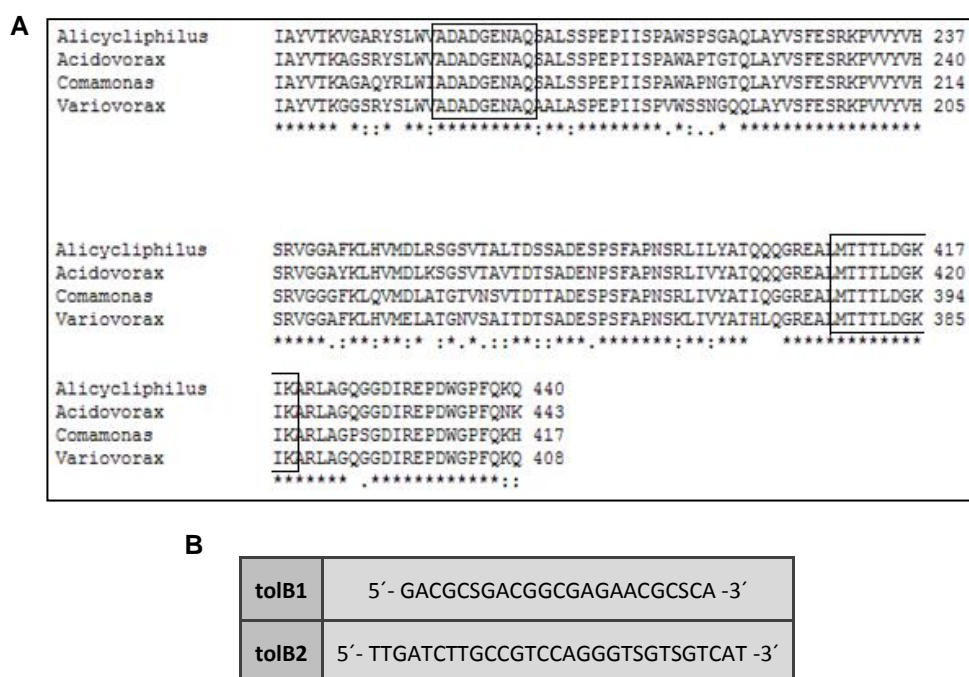


Figura III.9. Diseño de oligonucleótidos degenerados para la amplificación parcial de *tolB*. **A)** Fragmento del alineamiento realizado para el diseño de los cebadores en sentido directo (tolB1) y reverso (tolB2). El recuadro señala las secuencias conservadas utilizadas para el diseño de cada oligonucleótido. **B)** Secuencia nucleotídica de los cebadores tolB1 y tolB2. (S=G+C).

A partir de la secuencia de aminoácidos seleccionada se dedujo la secuencia de nucleótidos, empleando el uso de codones (obtenido de *Codon Usage Database*) de una

especie próxima a *X. ampelinus*, *Variovorax paradoxus*. Con esta pareja de cebadores degenerados (tolB1 y tolB2) se amplificó por PCR un fragmento interno del gen *tolB* de 678 pb. El producto de amplificación obtenido se secuenció, y se comparó con la base de datos de proteínas mediante el programa Blastx, confirmándose la correspondencia con la proteína TolB. Esta secuencia se alineó con las secuencias de esta proteína en *Acidovorax*, *Alicyclophillus* y *Variovorax*, utilizadas anteriormente para el diseño de los oligonucleótidos tolB1 y tolB2. A partir de este alineamiento se diseñaron los cebadores específicos xtolB1 y xtolB2 (Figura III.10) que permitieron amplificar un fragmento de 507 pb del gen *tolB* a partir de ADN total de *X. ampelinus*. Este fragmento es el que se utilizó como sonda de *tolB* para rastrear la genoteca, una vez que se comprobó que la secuencia amplificada era la correcta mediante secuenciación.

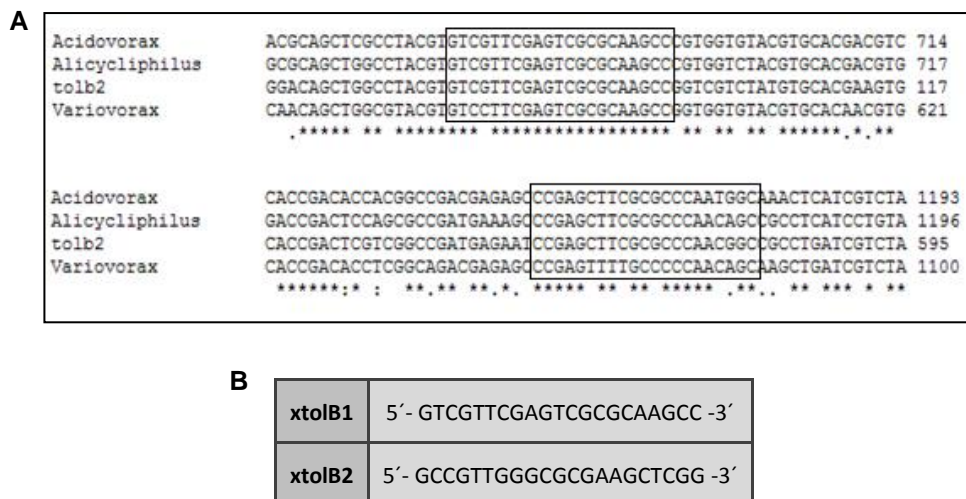


Figura III.10. Diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación parcial de *tolB*. **A)** Fragmento del alineamiento realizado para el diseño de los cebadores en sentido directo (xtolB1) y reverso (xtolB2). El recuadro señala las secuencias conservadas utilizadas para el diseño de cada oligonucleótido. La secuencia *tolb2* hace referencia a la obtenida con los cebadores degenerados por amplificación del ADN de *X. ampelinus*. **B)** Secuencia nucleotídica de los cebadores xtolB1 y xtolB2.

Además, se realizó una comparativa de esta secuencia parcial del gen *tolB* de *X. ampelinus* con otras secuencias de la base de datos de proteínas del NCBI. Los resultados reflejan la cercanía filogenética entre las especies con proteínas TolB con mayor identidad. Como se puede observar en la Tabla III.6, las bacterias *Acidovorax* sp., *Acidovorax radialis*, *Verminephrobacter eiseniae* y *Comamonas testosteroni* fueron las que presentaron mayor identidad (81-85%) a nivel de aminoácidos con la secuencia parcial de las proteínas TolB de *X. ampelinus*. Todas ellas, al igual que *Xylophilus ampelinus*, pertenecen a la familia *Comamonadaceae*. Destacar como excepción, el 83% de identidad con una posible proteína TolB en un anfibio, *Xenopus tropicalis*.

Tabla III.6. Similitud de la secuencia de aminoácidos deducida del fragmento interno del gen *tolB* de *X. ampelinus* con proteínas TolB de otras especies. Se muestran los principales resultados de la búsqueda en la base de datos de proteínas realizada con Blastx, a partir de la secuencia de nucleótidos traducida.

Nº acceso	Descripción	Cobertura secuencia	Valor E	Identidad máxima
WP_008906954.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Acidovorax</i> sp.NO-1)	100%	5·10 ⁻⁹⁰	83%
YP_006854482.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Acidovorax</i> sp.KKS102)	100%	7·10 ⁻⁹⁰	83%
WP_010465530.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Acidovorax radialis</i>)	100%	2·10 ⁻⁸⁹	83%
WP_007862090.1	Motivo de repetición β de la proteína TolB del sistema <i>tol-pal</i> (<i>Acidovorax</i> sp. CF316)	100%	2·10 ⁻⁸⁹	85%
YP_995803.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2)	100%	4·10 ⁻⁸⁹	84%
XP_002945375.1	Posible proteína TolB, parcial (<i>Xenopus tropicalis</i>)	100%	6·10 ⁻⁸⁸	83%
YP_003277659.1	Proteína TolB (<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2)	100%	3·10 ⁻⁸⁷	81%

III.3.4. Rastreo de la genoteca de *X. ampelinus* con una sonda de *tolB*

El estudio anterior permitió asegurar que el fragmento de ADN clonado correspondía a un fragmento interno del gen *tolB* de *X. ampelinus*. A continuación se procedió a rastrear la genoteca de *X. ampelinus* (ver apartado II.7.3. de Materiales y Métodos). Antes de comenzar el rastreo se tituló de nuevo la genoteca, obteniéndose un valor de 2,27x10⁷ ufp/ml, un orden de magnitud menos respecto a la última titulación realizada.

El rastreo se inició realizando infecciones en placas grandes (15 cm). Se hizo la transferencia a membranas de nailon y a continuación se hibridaron con la sonda marcada. Se obtuvo hibridación con 19 fagos, correspondientes a las señales aparecidas en las membranas, eligiéndose las 7 más intensas que aparecieron en ambas réplicas. Se recogieron los 7 trozos de agar correspondientes y se pasaron a tubos con 1 ml de tampón SM y 50 µl de cloroformo; se mantuvieron en agitación a 4 °C durante 4 horas. Se hicieron nuevas infecciones en placas medianas (9 cm) con 5 de estos fagos, empleando las diluciones 10⁻¹ a 10⁻³ en SM. La placa correspondiente a la dilución 10⁻¹ presentaba halos de lisis aislados, lo cual permite detectar fagos simples, por lo que se eligió para transferirla a la membrana. Se transfirieron las 5 placas de esta dilución, en cada una de las cuales había unos 40 halos de lisis de media. Se obtuvieron varios positivos en cada placa; se eligieron 3 fagos de 3 de ellas (correspondientes a los fagos F2, F5 y F6), es decir, un total de 9 fagos. Cada trozo de agar se pasó a un tubo con tampón SM y cloroformo, procediendo como anteriormente. Para asegurar que las placas de lisis elegidas procedían de fagos simples, se repitió la infección con los nuevos fagos aislados, haciendo diluciones 10⁻¹ a 10⁻³ en SM. Tras la transferencia a membrana de la placa con halos de lisis

aislados y la hibridación, se seleccionó un fago simple de cada placa y se pasó de nuevo a un tubo con tampón SM y cloroformo.

Antes de continuar con la amplificación de los fagos aislados, se realizó una PCR para comprobar si se trataba de fagos positivos, es decir, que contenían el gen de interés. Un volumen de 100 μ l de la solución de fagos se trató con 5 μ l de proteinasa K (Fermentas) calentando a 55 °C durante 1 hora, y a continuación se hirvió durante 10 minutos. Después de este pre-tratamiento para liberar el ADN, se llevó a cabo la reacción de amplificación con la polimerasa, empleando como cebadores los mismos que para la obtención de la sonda (xtolB1/xtolB2), y como control positivo ADN total de *X. ampelinus*. Las 9 reacciones hechas con los 9 fagos dieron una banda de 500 pb, igual a la obtenida con el control positivo. Esto indicaba que todos ellos contenían en su ADN ese fragmento del gen *tolB*.

Los fagos F2/1, F2/2, F5/1 y F6/1 se seleccionaron para su amplificación, ya que fueron los que presentaron unas bandas más intensas en la PCR anterior. Tras las sucesivas rondas de purificación necesarias se obtuvieron suspensiones fágicas puras (conteniendo un solo fago recombinante) con los títulos que se indican a continuación:

Fago 2/1	8,55 x 10 ⁸ ufp/ml
Fago 2/2	7,80 x 10 ⁸ ufp/ml
Fago 5/1	5,45 x 10 ⁹ ufp/ml
Fago 6/1	2,15 x 10 ¹⁰ ufp/ml

Con los fagos ya amplificados se hizo una infección en medio líquido con células *E. coli* LE392, seguida de la extracción del ADN fágico.

El ADN de los fagos se digirió con las enzimas BamHI, EcoRI y XbaI, que permiten la liberación de los brazos del vector (20 y 9 kb, respectivamente). El patrón de restricción obtenido permitió conocer que los fagos F2/1 y F2/2 eran idénticos, lo cual no es extraño, ya que se aislaron de la infección en placa de un mismo fago (F2). El ADN de los 3 fagos diferentes se sometió a una nueva restricción con las mismas enzimas y se visualizó el resultado en un gel de agarosa (Figura III.11). Dicho gel se transfirió a una membrana de nailon para realizar una hibridación con la sonda de *tolB*.

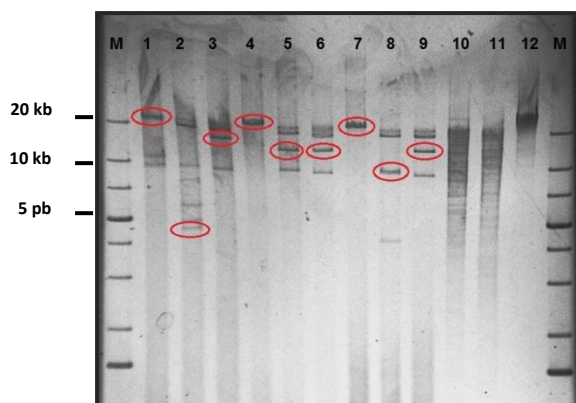


Figura III.11. Resultado de la digestión del ADN fágico y de *X. ampelinus* con las enzimas de restricción BamHI, EcoRI y XbaI. M: marcador de peso molecular de 1kb *DNA Ladder Plus*. Carriles 1-3: digestión del fago 2/1. Carriles 4-6: digestión del fago 5/1. Carriles 7-9: digestión del fago 6/1. Carriles 10-12: digestión de *X. ampelinus*. El orden de la restricción mostrado para cada ADN es BamHI, EcoRI y XbaI. Se señalan las bandas de los fagos que dieron señal de hibridación con la sonda de *tolB* al realizar el *Southern*. El ADN digerido de *X. ampelinus* dio un mayor número de señales de hibridación, por lo que no se indican en la figura.

Los resultados de la restricción del ADN fágico y de la posterior hibridación con la sonda mediante *Southern*, permitieron conocer en qué fragmentos se encuentra el gen *tolB*, bien sea total o parcialmente. Esta información es importante a la hora de seleccionar uno de estos fragmentos para su clonación y secuenciación posterior, con la finalidad de conocer el tamaño y secuencia de *tolB* en *X. ampelinus*, así como la posible existencia de genes adyacentes.

III.3.5. Clonación y secuenciación de la región del genoma de *X. ampelinus* en la que se localiza el gen *tolB*

Se eligió el fragmento de ADN de un tamaño aproximado de 18 kb obtenido tras la digestión del fago F2/1 con la enzima XbaI, para su clonación en el vector pBluescript KS. Este fragmento hibridaba con la sonda de *tolB*, por lo que presumiblemente contenía el gen, y a priori tenía un tamaño suficiente como para presentar la secuencia completa.

El trabajo de clonación permitió obtener un plásmido recombinante denominado pBS-F2/Xba que portaría el gen.

Seguidamente se hicieron una serie de digestiones simples y dobles del plásmido pBS-F2/Xba, con la finalidad de seleccionar de nuevo un fragmento más pequeño que contenga el gen de interés. Se realizó un primer bloque de digestiones simples con las siguientes enzimas de restricción: BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, NotI, PstI, SacI, Sall, XbaI y XhoI. Se eligieron aquellas enzimas que no originaron muchos fragmentos de ADN (BamHI, EcoRI, HindIII, SacI y XbaI) y se hicieron nuevas digestiones, en esta ocasión simples y dobles. El gel resultante se transfirió a una membrana de nailon para su posterior hibridación para detectar en qué bandas estaba localizado el gen *tolB* (Figura III.12).

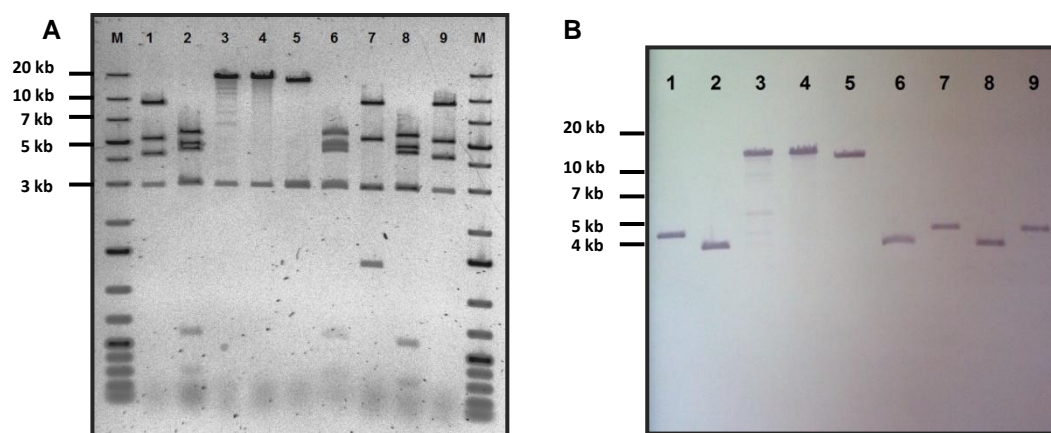


Figura III.12. A) Resultado de las digestiones de la construcción pBS-F2/Xba con las enzimas de restricción BamHI (1), EcoRI (2), HindIII (3), SacI (4), XhoI (5), EcoRI+SacI (6), HindIII+SacI (7), EcoRI+HindIII (8), BamHI+HindIII (9). M: marcador de peso molecular de 1kb *DNA Ladder Plus*. B) Análisis mediante hibridación con la sonda *to/B*.

Como se puede observar en dicha figura, se visualizó una banda de aproximadamente 5,3 kb, en la digestión con **BamHI**, que podría contener el gen *to/B* completo dado su tamaño, y se eligió para ser subclonada. Se realizó una reacción de ligación entre la banda extraída de un gel de agarosa y el vector pBluescript KS digerido con BamHI. Esta construcción se denominó **pBS-F2/X-Bam**. Mediante restricción se seleccionó un transformante que presentaba dos bandas de 3 y 5,3 kb, que se corresponden con los tamaños esperados. Mediante PCR se comprobó que contenía el gen *to/B*.

A fin de acotar más la región de ADN que presumiblemente incluiría el gen, se hicieron restricciones de la construcción **pBS-F2/X-Bam**. Se procedió del mismo modo que con la construcción anterior, haciendo varias digestiones simples, y una vez visualizado el resultado, se realizaron digestiones simples y dobles. Se identificaron las bandas portadoras de *to/B* mediante análisis por *Southern* (Figura III.13).

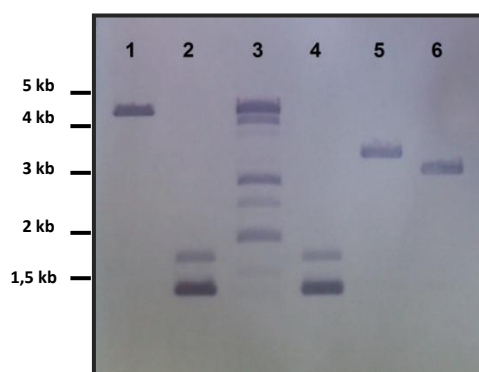


Figura III.13. Resultado del análisis mediante hibridación del plásmido pBS-F2/X-Bam digerido con EcoRI (1), NotI (2), BamHI+EcoRI (3), BamHI+NotI (4), BamHI+KpnI (5) y BamHI+Sall (6).

En la digestión doble con **BamHI** y **KpnI** se obtuvo una banda de aproximadamente 3,4 kb que dio señal de hibridación. Esta banda fue aislada para incorporarla mediante ligación

al vector pBluescript KS digerido con **KpnI**, y así obtener la construcción que se denominó **pBS-F2/XB-Kpn**. Se seleccionó un transformante mediante restricción y se confirmó, por amplificación con oligonucleótidos específicos, que tenía incluido en su ADN el gen *to/B*.

III.3.5.1. Determinación y análisis de la secuencia nucleotídica

El inserto de extremos KpnI, subclonado en el vector pBluescript, fue secuenciado utilizando inicialmente los cebadores universales de este vector, M13 -20 y M13 Reverso. A partir de la secuencia obtenida, se diseñaron nuevos cebadores (Tabla III.7) para completar la secuenciación del fragmento clonado. De esta manera se consiguió secuenciar el gen *to/B* completo y parte de otro gen que codificaría un hipotético transportador de lípidos del tipo ABC.

Tabla III.7. Oligonucleótidos diseñados para la secuenciación del inserto de 3,4 kb del plásmido pBS-F2/XB-Kpn.

kpn608F	5'-GGGTGCGCCGTCGTCCCGGTA-3'
kpn619R	5'-TGCTTTGCATCAGCCGCTTCGG-3'
kpn1297R	5'-TCTTCTGAGGCGACTGCGCAT-3'

En otras bacterias, *to/B* aparece situado junto a otros de los genes integrantes del complejo *tol-pal*. Es por ello que resultó interesante analizar las regiones adyacentes a este gen en *X. ampelinus*. Dicho análisis se llevó a cabo mediante la secuenciación del inserto de extremos BamHI del plásmido pBS-F2/X-Bam. La secuenciación se inició empleando los oligonucleótidos universales que anillan en el vector, continuándose con nuevos cebadores (Tabla III.8) diseñados a partir de las secuencias que se fueron obteniendo, hasta llegar a la parte ya secuenciada del inserto anterior.

Tabla III.8. Oligonucleótidos diseñados para la secuenciación del inserto de 5,3 kb del plásmido pBS-F2/X-Bam.

bam527F	5'-ATGCGCGCAACGCCACCGGA-3'
bam555R	5'-TTCTCGCCGCTGGGTCTGGTCGAG-3'
bam1245R	5'-TGCTGCCCTGCTGCATACCA-3'
bam1939R	5'-TTCAGTGCGCACCTCCTCCAT-3'

De esta manera se consiguió completar la secuenciación del gen codificante del transportador ABC, y también se obtuvieron las secuencias incompletas de un gen codificante de la ribonucleasa G y del gen *pal*. La organización de los genes hallados se esquematiza en la Figura III.14. La localización de *pal* junto a *to/B* ha sido descrita en otros microorganismos

(Lazzaroni y col., 2005; Gerding y col., 2007; Yeh y col., 2010), lo que evidencia el grado de conservación de esta agrupación génica también en *X. ampelinus*.

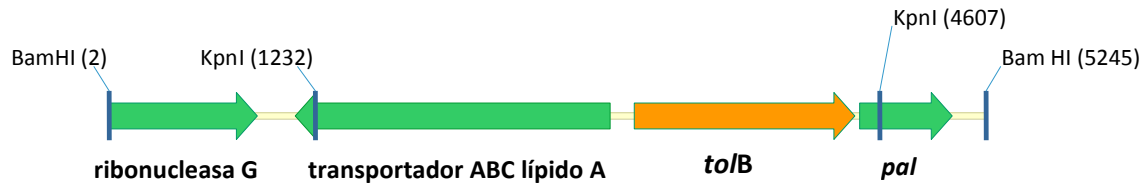


Figura III.14. Estructura de la región del genoma de *X. ampelinus* que contiene el gen *tolB*. El fragmento BamHI secuenciado y clonado en el plásmido pBS-F2/X-Bam tiene un tamaño total de 5249 pb. Se señalan los puntos de corte de las enzimas BamHI y KpnI (entre paréntesis se indica la posición nucleotídica).

Se analizó la secuencia obtenida utilizando el programa informático DNASTAR, que permitió deducir la secuencia aminoacídica de TolB a partir de la nucleotídica (Figura III.15) y localizar el marco de lectura correspondiente al gen *tolB*. Este gen tiene un tamaño de 1320 pb y codifica una proteína de 439 aminoácidos con una masa molecular teórica de 46,8 kDa y un punto isoeléctrico de 9,18.

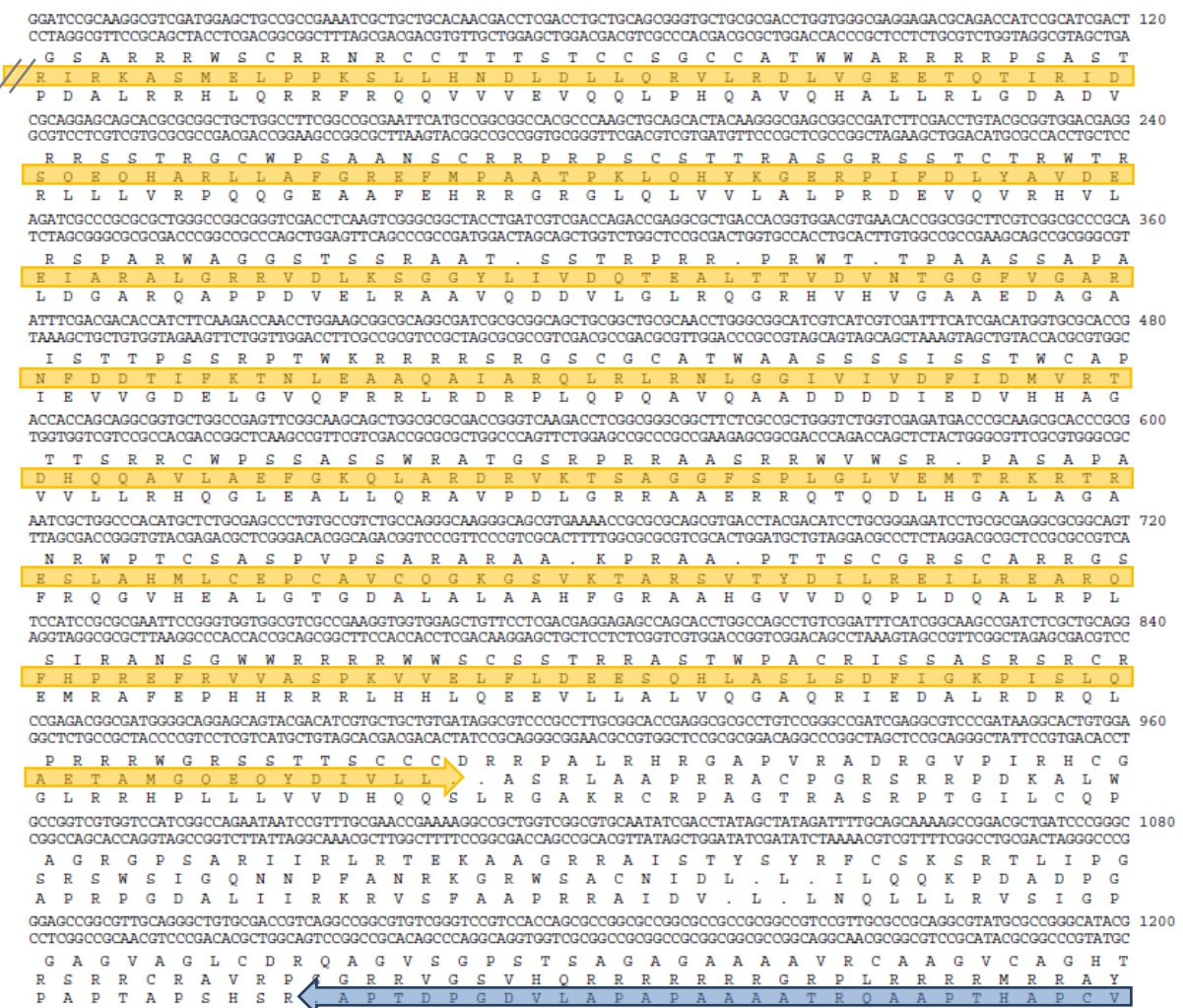


Figura III.15. Secuencias nucleotídica y aminoacídica del genoma de *X. ampelinus* que contiene el gen *tolB*.

III.3.6. Análisis del número de copias del gen *tolB* en el genoma de *X. ampelinus*

Seguidamente se realizó un análisis para comprobar si existían más copias del gen *tolB* en otro locus del genoma de *X. ampelinus*.

La forma de comprobarlo consistió en digerir el ADN de esta bacteria con diferentes enzimas de restricción que corten fuera de la secuencia o en puntos conocidos de la misma, originando fragmentos que podrían visualizarse en un gel de agarosa. La hibridación con la sonda originará tantas señales como copias del gen haya, salvo si la enzima corta en la secuencia génica, en cuyo caso dependerá del número de fragmentos que genere del gen. El ADN de *X. ampelinus* se digirió con BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, Sall y XhoI. Se realizó una hibridación de *Southern* con la sonda de 507 pb de *tolB* utilizada hasta ahora.

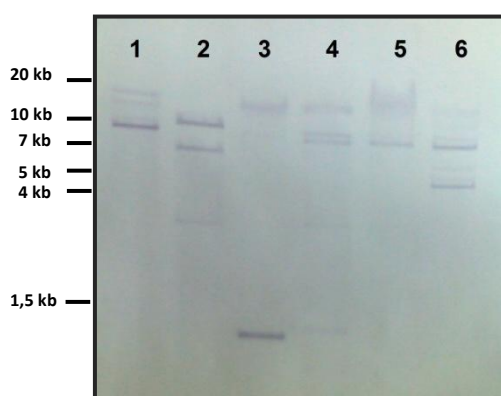


Figura III.16. Hibridación de ADN total de *X. ampelinus* digerido con BamHI (1), EcoRI (2), HindIII (3), PstI (4), Sall (5) y XhoI (6) con una sonda de *tolB*.

En la Figura III.16 se visualiza el resultado de la hibridación. Se puede comprobar que con las enzimas BamHI, HindIII y Sall se obtiene una única señal clara de hibridación (además de otras señales más débiles que parecen coincidir con fragmentos resultantes de digestiones parciales). Por el contrario, en el caso de las enzimas EcoRI, PstI y XhoI se obtienen un mínimo de 2 bandas de hibridación. Teniendo en cuenta que la única enzima con dianas en *tolB* es PstI (por lo que cabría esperar dos señales de hibridación), se puede pensar que en el caso de las enzimas EcoRI y XhoI las distintas señales obtenidas se deben a digestiones incompletas del ADN o a hibridaciones parciales con la sonda. Por tanto, este experimento parece sugerir la existencia en el genoma de *X. ampelinus* de una única copia de *tolB*.

III.3.7. Análisis de la secuencia de aminoácidos de TolB deducida de la secuencia de su gen

La secuencia de aminoácidos de la proteína TolB, obtenida a partir de la secuencia de nucleótidos, fue sometida a distintos análisis que permitieron caracterizar más ampliamente esta proteína.

III.3.7.1. Comparativa de la secuencia de TolB con otras especies

Se realizó una búsqueda en la base de datos con el programa Blastp con el objetivo de comparar la secuencia de aminoácidos de TolB de *X. ampelinus* con las secuencias de otras especies.

Tabla III.7. Similaridad de secuencia de la proteína TolB de *X. ampelinus* con proteínas TolB de otras especies. Se muestran los principales resultados de la búsqueda en la base de datos de proteínas realizada con Blastp, a partir de la secuencia de aminoácidos.

Nº acceso	Descripción	Cobertura secuencia	Valor E	Identidad máxima
WP_010465530.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Acidovorax radicans</i>)	94%	0,0	80%
WP_005795789.1	Motivo de repetición β de la proteína TolB del sistema <i>tol-pal</i> (<i>Acidovorax delafieldii</i>)	95%	0,0	80%
YP_006854482.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Acidovorax</i> sp.KKS102)	94%	0,0	78%
YP_004488722.1	Proteína TolB (<i>Delftia</i> sp. Cs1-4)	97%	0,0	78%
YP_001564417.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1)	97%	0,0	78%
YP_004126280.1	Motivo de repetición β de la proteína TolB del sistema <i>tol-pal</i> (<i>Alicyclophilus denitrificans</i> BC)	95%	0,0	80%
WP_007862090.1	Motivo de repetición β de la proteína TolB del sistema <i>tol-pal</i> (<i>Acidovorax</i> sp. CF316)	95%	0,0	82%
YP_985989.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Acidovorax</i> sp. JS42)	95%	0,0	79%
YP_995806.1	Proteína de traslocación TolB (<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2)	94%	0,0	78%
YP_004234310.1	Motivo de repetición β de la proteína TolB del sistema <i>tol-pal</i> (<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860)	98%	0,0	75%

En la Tabla III.7 se muestran los 10 primeros resultados de la comparación por orden de similitud. Se obtuvo una elevada homología con proteínas TolB de diversas bacterias. Las especies del género *Acidovorax*, muy próximas filogenéticamente a *Xylophilus*, son las que presentan mayor identidad. Le siguen dos especies de los géneros *Delftia* y *Alicyclophilus*. Otra especie próxima a *Xylophilus*, *Verminephrobacter eiseniae*, aparece entre las secuencias más similares de TolB.

La secuencia de aminoácidos deducida se comparó también mediante alineamiento con la de las otras proteínas TolB que tenían mayor similitud, empleando el programa

ClustalW. En la Figura III.17 se aprecia que el grado de conservación de la secuencia proteica es bastante elevado, especialmente en la zona central y final de la misma.

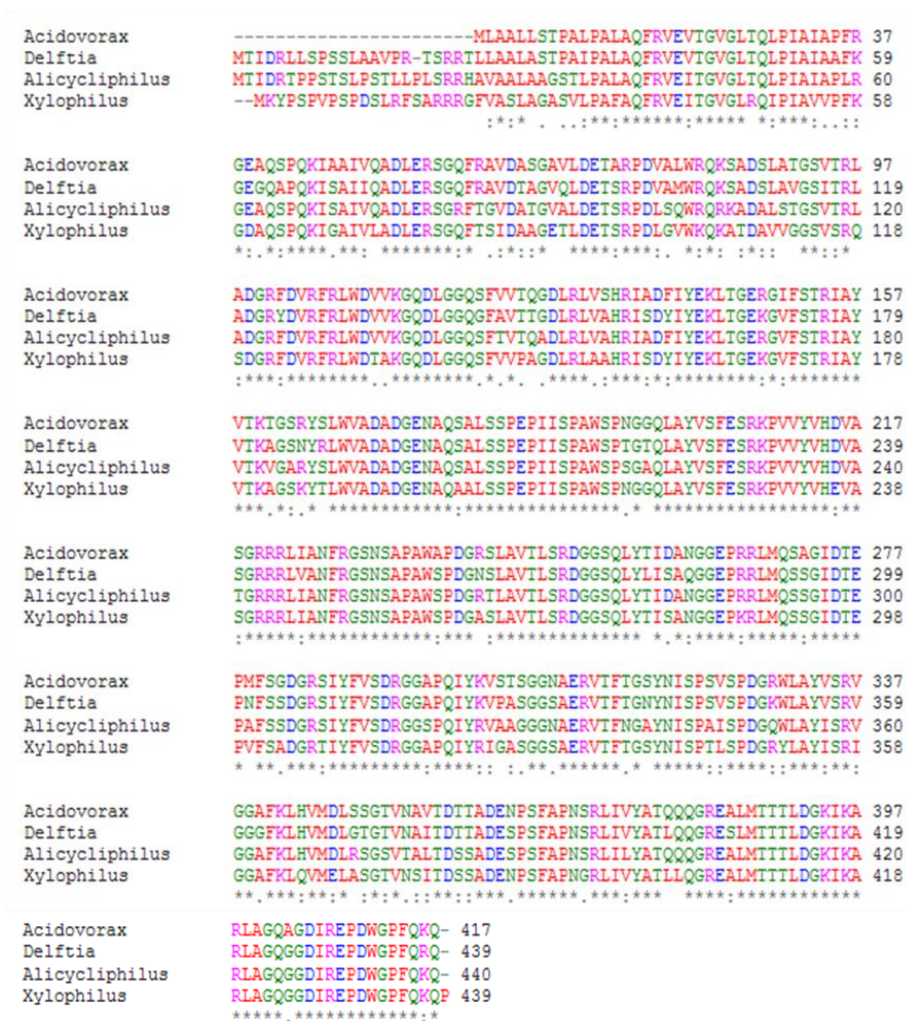


Figura III.17. Alineamiento múltiple, mediante ClustalW, de las secuencias de aminoácidos de la proteína TolB de *Xylophilus* y de 3 de las especies con mayor homología según los resultados de Blastp: *Acidovorax radialis*, *Delftia* sp. y *Alicyclophilus denitrificans*. El código de color clasifica los aminoácidos según sus propiedades: rojo (pequeños, hidrofóbicos y aromáticos), azul (ácidos), magenta (básicos) y verde (hidrofílicos, neutros y polares).

III.3.7.2. Caracterización de la estructura primaria

La proteína se caracteriza por presentar 439 aminoácidos, de los cuales el 9,8% tiene carga negativa y el 10,9% tienen carga positiva. Los aminoácidos mayoritarios son los más pequeños en tamaño, glicina (10,9%), alanina (10,7%) y serina (10,5%). Otros aminoácidos también abundantes son arginina (7,3%), leucina (7,1%) y valina (6,8%). Estos resultados se obtuvieron a través del programa ProtParam del servidor ExPASy (<http://expasy.ch/tools/>).

III.3.7.3. Caracterización de la estructura secundaria

Se realizó el estudio de la estructura secundaria de la proteína a través del programa Psi-Pred (*Protein Structure Prediction Server*). Según los resultados, la proteína presentaría un 10,7% de los aminoácidos formando α -hélices, un 34,6% láminas β y un 54,7% giros. El programa elabora una predicción de la estructura secundaria que se muestra en la Figura III.18.

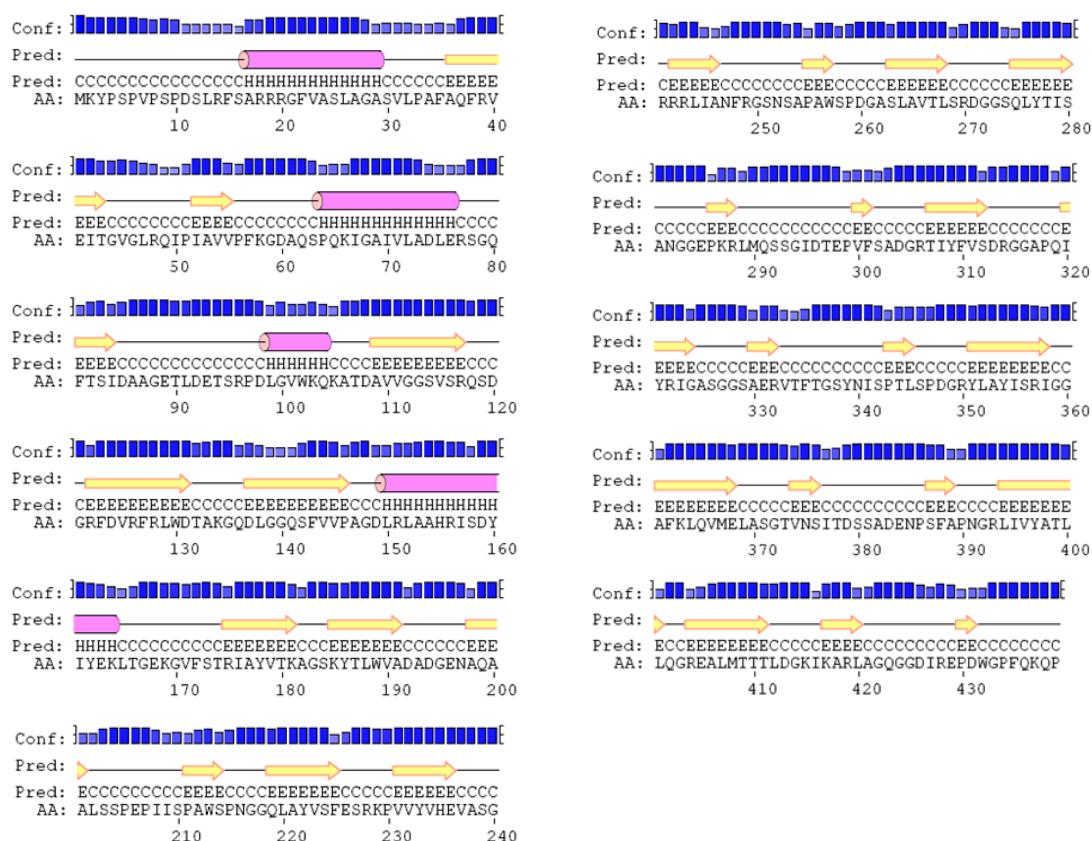


Figura III.18. Predicción de la estructura secundaria de TolB realizada por el programa Psi-Pred. Los cilindros rosas representan regiones con disposición en α -hélice y las flechas amarillas indican regiones con disposición en lámina β . La fiabilidad de la predicción para cada aminoácido se representa en columnas azules.

III.3.7.4. Caracterización de la estructura tridimensional

La estructura tridimensional de la proteína TolB fue modelada mediante el software SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) (Schwede y col., 2003). El servidor hace un alineamiento de la secuencia aminoacídica con la base de datos de proteínas que han sido cristalizadas y selecciona las estructuras con mayor identidad. A continuación genera el modelo por homología, obteniéndose una representación tridimensional de la estructura proteica. En muchos casos, zonas poco conservadas del extremo amino suelen eliminarse por el programa.

La representación obtenida (Figura III.19) muestra dos zonas diferenciadas. Por un lado, una cavidad de aspecto globoso rodeada de láminas β en la zona del extremo carboxilo, mientras que en el extremo amino se localizan las α -hélices y también láminas β . La estructura predicha coincide con la de la proteína TolB de *E. coli* previamente cristalizada (Abergel y col., 1999), que la define como una proteína con dos dominios estructurales: el amino terminal formado por 2 α -hélices y 5 láminas β , y el carboxilo terminal formado por 6 bucles de láminas β .

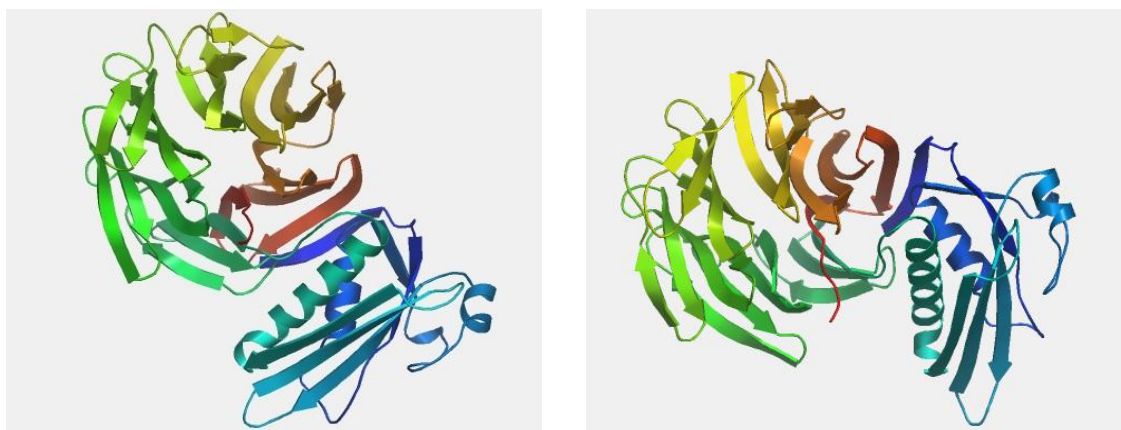


Figura III.19. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína TolB de *X. ampelinus*.

III.3.8. Interrupción génica de *tolB* por doble recombinación

La técnica de inactivación génica por doble recombinación fue utilizada para tratar de obtener mutantes con el gen *tolB* deletado. Consiste en el reemplazamiento del gen, en la cepa silvestre, por secuencias que lo flanquean con las que tendrá lugar la recombinación. Estas secuencias fueron clonadas en el vector pK18*mobsacB*, muy utilizado en estos casos, ya que contiene el gen *sacB*, que se manifiesta como letal para la bacteria cuando crece en presencia de 10% sacarosa, además de resistencia a kanamicina, como sistemas de selección.

III.3.8.1. Construcción del plásmido pK18*mobsacB*- Δ *tolB*

Se diseñaron 2 parejas de cebadores específicos (Tabla III.8), cada una para la amplificación de la región corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, del gen *tolB*. La primera pareja amplificó un fragmento de ADN de 732 pb, inmediatamente anterior al gen, con secuencias diana en sus extremos para BamHI (extremo 5') y XbaI (extremo 3'). La segunda pareja permitió amplificar un fragmento de 724 pb, localizado a continuación del final gen, con secuencias diana en sus extremos para XbaI (extremo 5') y HindIII (extremo 3').

Tabla III.8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región corriente arriba (A) y corriente abajo (B) del gen *to/B*. En negrita se indican las secuencias diana para las enzimas de restricción correspondientes.

A	
deltolB1	5'- GTTAGGATCCAGCACGCCGACGATCAGCGTGAG -3'
deltolB2	5'- CTGGTCTAGATGGCAGCAAAGGCTTGGTCGGC -3'
B	
deltolB3	5'- GAGGTCTAGAGGGGCCCGTTCCAGAAGCAACCCTGACAG -3'
deltolB4	5'- CTTGAAGCTTTCGCGCGGGGCTTCGTGTC -3'

Estos fragmentos flanqueantes de *to/B* se digirieron con XbaI y se ligaron. Una vez hecha la ligación, el producto de la reacción de ligación se digirió con BamHI y HindIII y se ligó al vector pK18*mobsacB*, previamente digerido con ambas enzimas. Se seleccionaron y analizaron las colonias obtenidas tras la transformación en *E. coli* DH5 α del plásmido formado. Se obtuvieron 2 transformantes positivos, cuya construcción (Figura III.20) se comprobó mediante secuenciación con los oligonucleótidos universales M13 (-20) Directo y M13 Reverso.

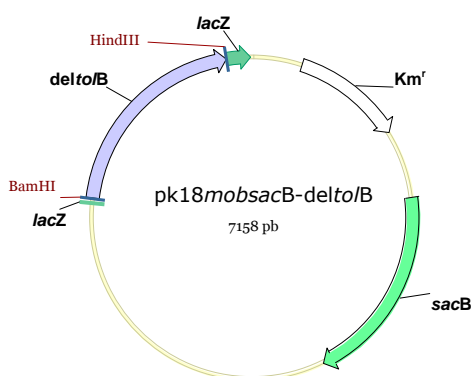


Figura III.20. Plásmido pK18*mobsacB-delta/B* construido para la delección del gen *to/B*. El inserto *delta/B*, formado con las secuencias flanqueantes del gen, se introdujo en el policonector del vector pK18*mobsacB*.

III.3.8.2. Transformación por electroporación y selección de transformantes

A continuación, el plásmido pK18*mobsacB-delta/B* se introdujo en *X. ampelinus* mediante electroporación, siguiendo la metodología descrita. Se seleccionaron los transformantes que integraron el plásmido, como consecuencia de una primera recombinación homóloga, mediante siembra en placa con 25 μ g/ml de kanamicina. Tras varios intentos fallidos en los que no hubo crecimiento, se consiguieron 9 transformantes en uno de los ensayos. Estos transformantes, originados por recombinación simple, tendrían en su genoma copias en tándem del gen original y el plásmido pK18*mobsacB-delta/B* modificado para la delección (Figura III.21).

Los mutantes obtenidos se crecieron en medio líquido TSB y se hicieron siembras en LPGA con 10% de sacarosa para seleccionar la pérdida del plásmido. Sólo hubo crecimiento en placa de 2 de los transformantes, en los que aparecieron 14 y 7 colonias respectivamente. Estas colonias se pasaron, de forma simultánea, a placas de LPGA con 10% de sacarosa y a placas de LPGA con 10% de sacarosa y 25 µg/ml de kanamicina. Los clones capaces de crecer en presencia de sacarosa pero no de kanamicina habrán perdido el plásmido mediante una segunda recombinación homóloga (pérdida del gen *sacB*). Como consecuencia, en el material genético bacteriano de los clones resultantes se puede encontrar una copia del gen, la original o en su defecto un clon con el gen deleciónado (Figura III.21).

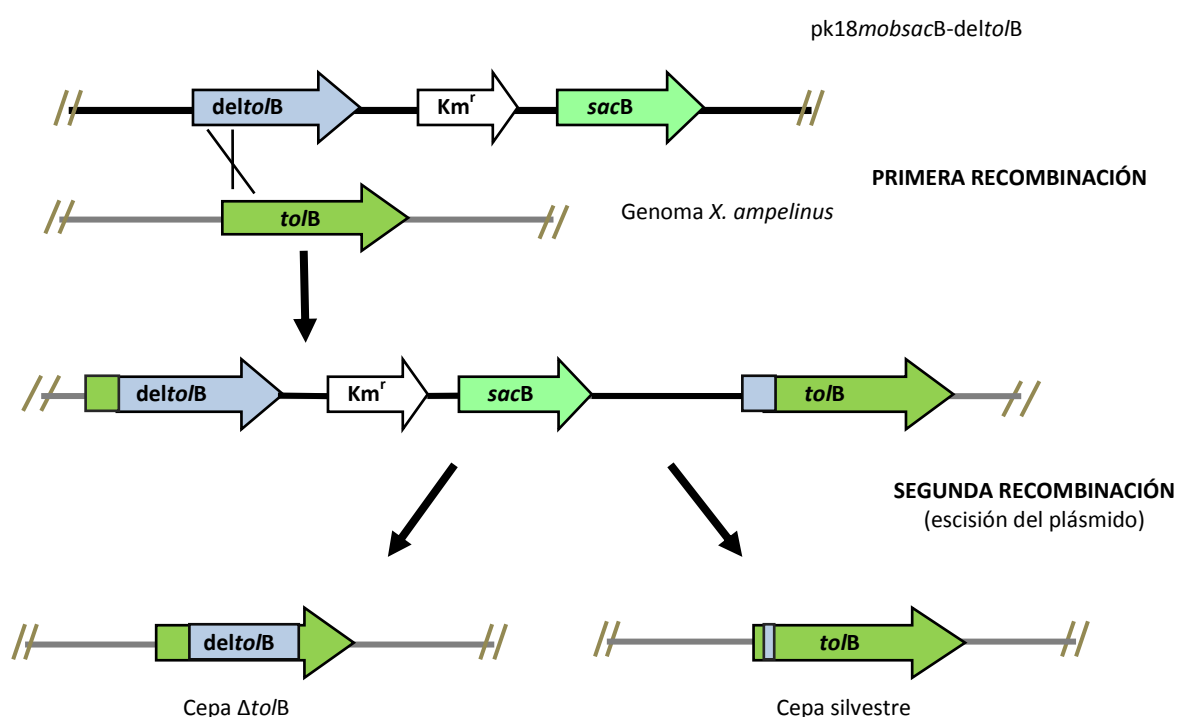


Figura III.21. Esquema del proceso de deleción del gen *to/B* por doble recombinación. La primera recombinación produce la integración del plásmido *pk18mobsacB-delta/B* en el cromosoma de la bacteria por recombinación homóloga simple, pudiendo seleccionarse los recombinantes por resistencia a kanamicina. En un segundo evento de recombinación, forzada por crecimiento en presencia de 10% de sacarosa se produce la pérdida del plásmido. Las células que hayan crecido en este medio pueden tener restaurado el genotipo silvestre o bien tener el gen deleciónado.

Mediante esta aproximación sólo se obtuvieron 3 posibles doble recombinantes que se comprobaron mediante PCR con los oligonucleótidos específicos *xto/B1* y *xto/B2*. El resultado de dicho análisis (Figura III.22) muestra una amplificación normal de un fragmento interno del gen *to/B*. Este dato claramente indicaba que los recombinantes obtenidos presentaban un genotipo similar al de la cepa silvestre y, por tanto, sin deleción del gen *to/B*.

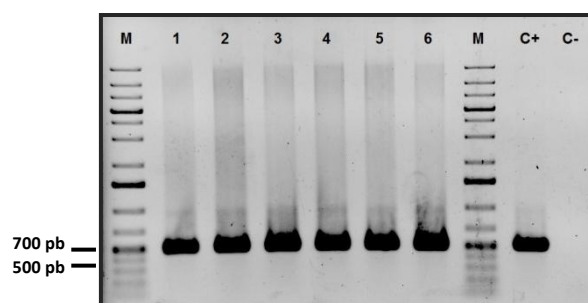


Figura III.22. Resultado de la PCR realizada con los posibles dobles recombinantes (carriles 1, 3 y 6) y con otros 3 clones que crecieron en ambas placas (carriles 2, 4 y 5). M: marcador de 1kb *DNA Ladder Plus*. C+: control positivo. C-: control negativo.

Además se realizó una comprobación adicional mediante *Southern*, que confirmase los resultados de la PCR. El ADN de los 3 posibles dobles recombinantes y de otros 3 clones que crecieron en presencia de sacarosa y kanamicina, se digirió con *EcoRI* y se hibridó con la sonda. En la Figura III.23 se puede ver que el patrón de hibridación de los 3 hipotéticos dobles recombinantes (clones 1, 3 y 6) es el mismo que el de la cepa silvestre (WT), y diferente al de los otros 3 clones (2, 4 y 5). Esto puede deberse a que los dobles recombinantes incorporaron la copia original del gen *tolB*, mientras que los otros clones no habrían perdido el plásmido y presentan tanto la copia original como la delecionada. El crecimiento de estos clones en presencia de sacarosa, a pesar de conservar el plásmido, es posible en el caso de que el gen *sacB* hubiese sufrido una mutación. Por otro lado, aunque este gen es letal en presencia de sacarosa para la mayoría de los clones que lo portan, en algunos casos se puede producir crecimiento.

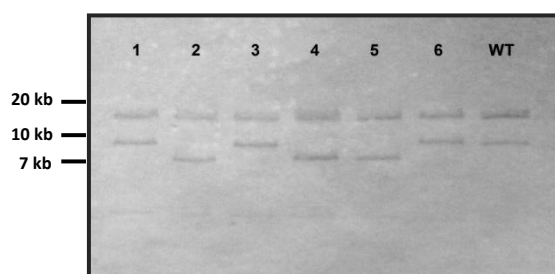


Figura III.23. Resultado de la hibridación de los hipotéticos recombinantes y de la cepa silvestre de *X. ampelinus* con la sonda de *tolB*.

Este experimento se repitió varias veces más, siempre con idéntico resultado: sin éxito para la deleción del gen *tolB*. Una posible explicación podría estar relacionada con la evidencia de que, según algunos autores, el complejo Tol-Pal es esencial para la viabilidad de la célula, de tal forma que los efectos de las mutaciones en alguno de sus componentes resultan letales en ciertas especies bacterianas (Dubuisson y col., 2005; Yeh y col., 2010). Por tanto, parece

evidente que por doble recombinación estaríamos seleccionando aquellos clones con un gen *tolB* funcional, ya que el mutante deleciónado podría ser letal.

III.4. Obtención de mutantes avirulentos e hipervirulentos de *X. ampelinus* mediante mutagénesis con una transposasa

La inserción de elementos genéticos transponibles en el ADN es una herramienta mutagénica que permite el análisis funcional de genes. Esta técnica fue empleada para la identificación de proteínas implicadas en la virulencia de *X. ampelinus*.

III.4.1. Mutagénesis mediante transposasa. Rendimiento de obtención de mutantes

El complejo estable formado por el transposón EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2> y la enzima EZ-Tn5 transposasa se introdujo en células electrocompetentes de *X. ampelinus* mediante electroporación. La transposasa, activada por el Mg^{+2} intracelular, facilita la inserción del transposón realizando cortes en las dos hebras del ADN bacteriano que generan extremos cohesivos. Durante la replicación la polimerasa rellena los huecos originados, de tal forma que se duplica la secuencia que flanquea al transposón (Figura III.24).

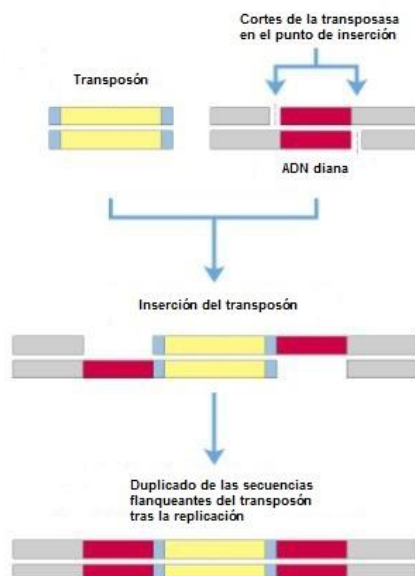


Figura III.24. Esquema del proceso de inserción del transposón en el ADN diana.

En un primer ensayo de electroporación se obtuvieron 871 transformantes, seleccionados en placas con kanamicina, lo que supuso un rendimiento neto de 27 mutantes

por ng de transposón. En una segunda serie de mutagénesis, en las mismas condiciones que la anterior, se logró un rendimiento mayor con 43 mutantes/ng, obteniéndose en total 1395 transformantes.

III.4.2. Análisis del carácter virulento de los mutantes obtenidos: ensayos con hojas de plántulas de vid desarrolladas *in vitro*

La determinación del carácter virulento de los mutantes obtenidos por transposición se realizó mediante ensayos en hojas de vid de plantas desarrolladas *in vitro*, mediante un análisis de virulencia que tuvo que ser desarrollado en el laboratorio. Estas hojas se obtuvieron a partir de plántulas desarrolladas *in vitro* bajo las condiciones descritas previamente.

En total se analizaron 35 mutantes, cada uno de ellos sobre 4 hojas de vid. Como referencia de la relevancia de las lesiones producidas se hicieron inoculaciones con la cepa silvestre (control positivo) y con glicerol al 20% (control negativo). Los daños fueron visibles transcurridos al menos 10 días desde la infección. De los 35 mutantes ensayados, 5 fueron considerados como avirulentos (clones 12, 16, 23, 33 y 554) y 4 como hipervirulentos (clones 3, 4, 14 y 32), en función de los daños observados en las hojas (Figura III.25).

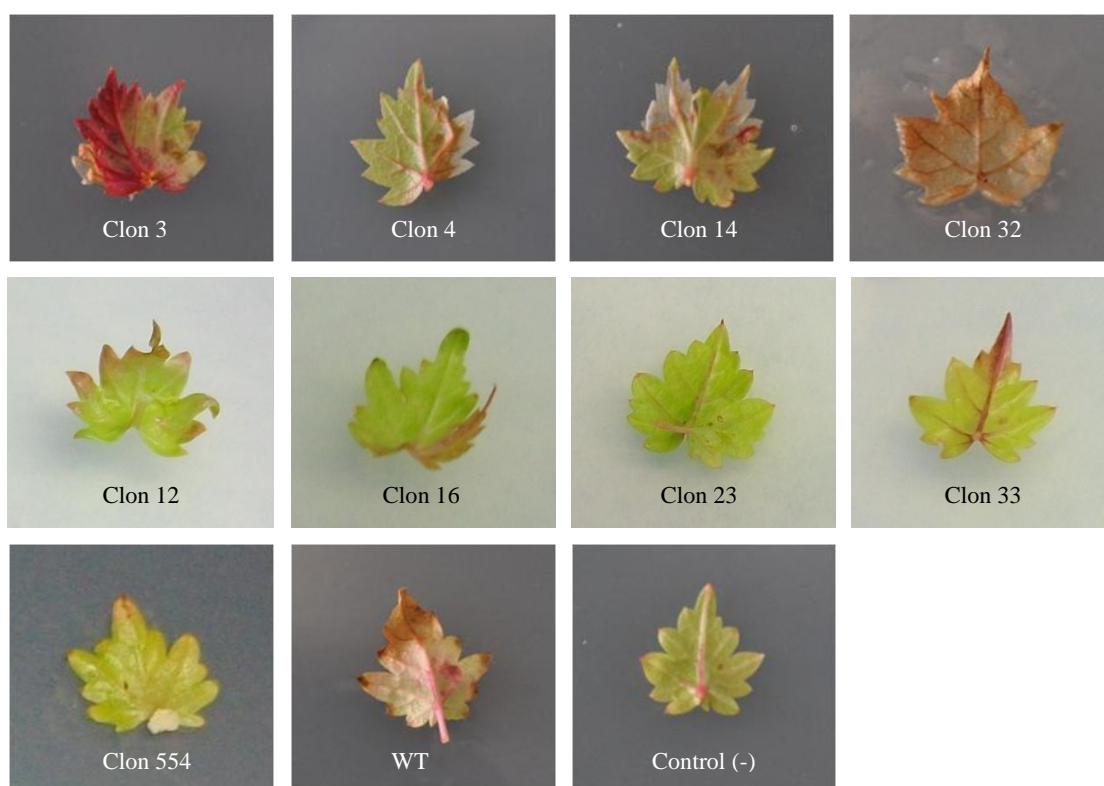


Figura III.25. Daños en hoja producidos por los mutantes seleccionados hipervirulentos (clones 3, 4, 14 y 32) y avirulentos (clones 12, 16, 23, 33 y 554), la cepa silvestre (WT) y el control (-).

En los clones más virulentos la extensión de la necrosis fue mayor, agravada por la pérdida marginal de tejido y el aumento de la decoloración, con respecto a las lesiones producidas por la cepa silvestre de *X. ampelinus*. Los escasos daños producidos por algunos de los clones aceptados como avirulentos se limitan a una ligera decoloración en los márgenes de la hoja y en la herida provocada al realizar la inoculación.

Una vez seleccionados 5 clones avirulentos (Av) y 4 hipervirulentos (Hv), se volvió a realizar el ensayo anteriormente descrito con estos 9 clones, obteniendo el mismo resultado, con lo que se ratificó la clasificación realizada en el ensayo anterior según su virulencia.

III.4.3. Identificación de los genes interrumpidos en mutantes avirulentos e hipervirulentos seleccionados

Las variaciones en la virulencia de los mutantes seleccionados es un indicador de la posible alteración de algún gen relacionado con patogenicidad. La inserción del transposón en el genoma supone la interrupción de la secuencia génica. La identificación de los genes interrumpidos en estos mutantes se realizó siguiendo el procedimiento descrito (Materiales y Métodos, apartado II.8.1) que se esquematiza en la Figura III.26.

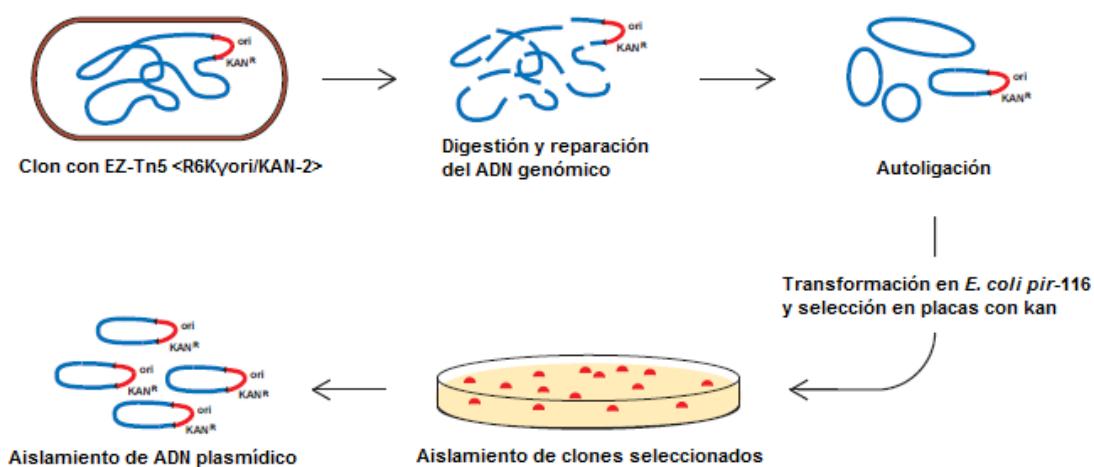


Figura III.26. Esquema del procedimiento seguido para la identificación de los genes interrumpidos en los mutantes seleccionados. (Modificado de <http://www.epibio.com/>).

El ADN digerido de forma independiente con EcoRI y con PvuII, una vez reparado y autoligado, se introdujo en forma de plásmido en la cepa *E. coli TransformTM EC100DTM pir-116* mediante electroporación. Los transformantes se seleccionaron en placas con kanamicina. Se eligió un clon de cada mutante para secuenciar su ADN, utilizando los cebadores específicos del transposón insertado, KAN-2 FP-1 (5' -ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC- 3') y R6KAN-2 RP-1 (5' -CTACCCTGTGGAACACCTACATCT- 3'). Estos cebadores están orientados hacia la parte

externa del transposón, de tal forma que se obtiene la secuencia de la región en la que se insertó. Con esta secuencia se realizó una búsqueda en la base de datos de proteínas con la herramienta Blastx, a partir de la secuencia de nucleótidos traducida.

En la Tabla III.9 se indican las proteínas codificadas por los genes interrumpidos en los 9 mutantes analizados y sus funciones.

Tabla III.9. Proteínas afectadas por la interrupción de genes en los mutantes avirulentos e hipervirulentos seleccionados. Entre paréntesis se indica el microorganismo en el que se ha descrito la proteína identificada.

Mutante	Clasificación	Proteína afectada	Función proteína	Referencia
Hv3	hipervirulento	Desconocida. Posible región promotora regulador transcripcional LysR	Desconocida	
Hv4	hipervirulento	Dominio de unión a peptidoglicano (<i>Alicyclophilus denitrificans</i>)	Funciones de unión	YP_004386439.1
Hv14	hipervirulento	Proteína de división celular FtsQ (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Esencial en división celular	WP_007940319.1
Hv32	hipervirulento	Proteína repetición YD (<i>Delftia acidovorans</i>)	Dipéptido muy conservado, forma parte de las proteínas Rhs. Algunas proteínas de esta familia están implicadas en virulencia.	YP_001564737.1
Av12	avirulento	Proteína hipotética	Desconocida	
Av16	avirulento	Tirosina fosfatasa (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Implicada en virulencia	YP_361664.1
Av23	avirulento	Transportador de Mn ⁺² MntH (<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>)	Sistema de transporte de Mn ⁺² . Implicada en la virulencia de bacterias patógenas.	WP_007160634.1
Av33	avirulento	Proteína repetición YD (<i>Delftia acidovorans</i>)	Dipéptido muy conservado, forma parte de las proteínas Rhs. Algunas proteínas de esta familia están implicadas en virulencia.	YP_001564737.1
Av554	avirulento	Transportador de Mn ⁺² MntH (<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>)	Sistema de transporte de Mn ⁺² . Implicada en la virulencia de bacterias patógenas.	WP_007160634.1

La mayoría de los genes interrumpidos codifican para proteínas que en algún microorganismo han sido relacionadas o están implicadas en virulencia. Es el caso de la tirosina fosfatasa (mutante Av16) (Alfano y Collmer, 2004), del transportador de Mn⁺² MntH (mutantes Av23 y Av554) (Anderson y col., 2009) y del dipéptido YD que forma parte de proteínas Rhs (mutantes Hv32 y Av33) (Kung y col., 2012). Estos dos mutantes, a pesar de tener un grado de virulencia muy diferente, tienen afectado el mismo gen. Dado que el punto de inserción del transposón no fue el mismo en ambos mutantes, puede explicar que los efectos sean distintos.

Otras proteínas afectadas tienen funciones de unión (mutante Hv4) o participan en la división celular (mutante Hv14), sin relación aparente con patogénesis. Se desconocen los genes interrumpidos en los mutantes Hv3 y Av12, pudiendo estar relacionados con otros genes

adyacentes. El caso del mutante Hv3 merece especial atención, ya que la inserción del transposón parece situarse en la región promotora de un gen que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR. Concretamente se insertó a 173 nucleótidos del codón inicial del gen. Parece evidente que su inserción en este punto podría provocar una ineficiente transcripción o expresión de dicho gen. Las proteínas de esta familia regulan la virulencia en bacterias patógenas (Maddocks y Oyston, 2008).

III.4.4. Análisis del mutante avirulento Av23: caracterización del gen *mntH*

De entre los mutantes ensayados en hoja de vid, el mutante Av23 fue el que pareció mostrar un menor nivel de virulencia, por lo que se eligió para realizar un estudio más exhaustivo. Como ya se ha indicado, este clon presentaba interrumpido un hipotético gen *mntH*, que codificaría la proteína transportadora de Mn^{+2} MntH.

MntH es un transportador de cationes divalentes dependiente de protones, de alta afinidad por manganeso, localizado en la membrana citoplasmática de diversas bacterias. Su extremo N-terminal se sitúa en el citoplasma, seguido de varios dominios transmembrana, mientras que el C-terminal alcanza el periplasma (Courville y col., 2004). Esta proteína es homóloga de la familia de proteínas de eucariotas NRAMP (*natural-resistance-associated macrophage protein*), que transportan Fe^{+2} y Mn^{+2} principalmente (Kehres y col., 2000; Makui y col., 2000; Que y Helmann, 2000). En algunas bacterias éste es el principal sistema de adquisición de manganeso y resulta necesario para el crecimiento bacteriano y el mantenimiento de la homeostasis celular de este catión (Hohle y O'Brian, 2009). Mn^{+2} es un importante cofactor en una gran variedad de enzimas, algunas de ellas protectoras contra el estrés oxidativo como la catalasa y la superóxido dismutasa (Makui y col., 2000; Runyen-Janecky y col., 2006). La expresión del gen *mntH* es inducida por exposición al peróxido de hidrógeno y reprimida por Mn^{+2} a través de proteínas reguladoras como OxyR y MntR, respectivamente (Que y Helmann, 2000; Kehres y col., 2002; Anjem y col., 2009). El sistema MntH tiene un papel importante en virulencia, permitiendo el crecimiento intracelular del patógeno y facilitando la protección frente a las especies reactivas del oxígeno generadas por el hospedador en respuesta a la infección (Champion y col., 2011). La mutación de *mntH* implica la disminución de la virulencia en varias especies bacterianas y un aumento en la sensibilidad al peróxido de hidrógeno en condiciones limitantes de manganeso, por lo que MntH y Mn^{+2} resultan esenciales en patogénesis (Zaharik y col., 2004; Papp-Wallace y Maguire, 2006; Anderson y col., 2009; Champion y col., 2011; Perry y col., 2012).

III.4.4.1. Análisis de la región del genoma de *X. ampelinus* que contiene el gen *mntH*

La región del ADN de *X. ampelinus* en la que se localiza *mntH* fue secuenciada con la finalidad de caracterizar este gen y las zonas adyacentes al mismo. Se secuenció por completo el plásmido de 4 kb de uno de los clones obtenidos tras la digestión con EcoRI del ADN del mutante Av23 y su posterior autoligación y transformación en *E.coli* (apartado III.4.3).

A partir de la secuencia conocida tras la secuenciación del mutante Av23 en ambas direcciones desde el punto de inserción del transposón, que permitió identificar *mntH* como el gen interrumpido en este clon, se diseñaron nuevos cebadores (Tabla III.10) para completar la secuenciación de esa región mediante la estrategia del “*chromosome walking*”.

Tabla III.10. Oligonucleótidos diseñados para la secuenciación parcial del ADN del mutante Av23.

23ec612F	5'-GTGCTGGCCGCGCGCAGGAT-3'
23ec611R	5'-ACAGCAGCATGTAGCCGAACT-3'
23ec1297F	5'-ACGCGACCGACCAGATTGCGCA-3'
23ec1387R	5'-GTGGTGCGCCGCCCTTACCGA-3'

Mediante análisis por Blastn de la secuencia obtenida, se determinó la secuencia completa de *mntH*, y se identificaron los genes codificantes de la proteína MntR y de un receptor dependiente de TonB (incompleto), localizados corriente arriba y corriente abajo, respectivamente (Figura III.27).

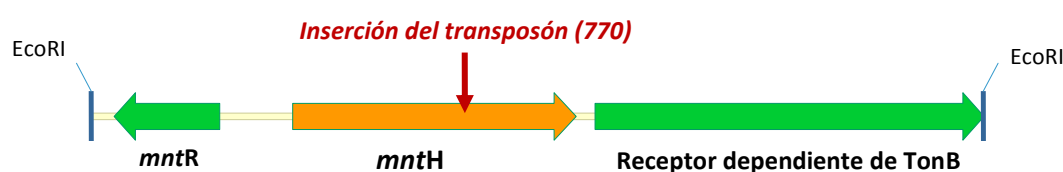


Figura III.27. Esquema general de la organización génica de la región genómica de *X. ampelinus* que contiene el gen *mntH* interrumpido en el mutante Av23. Se indican los puntos de corte de EcoRI en la secuencia de nucleótidos y el punto exacto de inserción del transposón en el gen *mntH* (entre paréntesis se indica la posición nucleotídica desde el inicio del gen).

El análisis de la región genómica permitió localizar el gen *mntR* que codifica la proteína MntR. MntR es una proteína reguladora del transporte de manganeso, perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales DtxR. Actúa como represor de la transcripción del gen *mntH* en presencia de Mn^{+2} (Que y Helmann, 2000; Kehres y col., 2002). La presencia de esta proteína evidencia que la regulación de *mntH* en *X. ampelinus* tiene lugar a través de MntR. De

hecho, en la región intergénica entre los genes *mntR* y *mntH* se localizó una secuencia palindrómica muy conservada que correspondería a una zona de unión de la proteína reguladora MntR (Figura III.28).

<i>X. ampelinus mntH</i>	ATTATAGCCCAGGCTATAT
<i>Escherichia coli mntH</i>	AAACATAGCCTTTGCTATGT
<i>Salmonella entérica mntH</i>	AAACATAGCAAAGGCTATGT
<i>Salmonella entérica sitABCD</i>	TAAACATAGCAAAGGCTATAT
<i>Xanthomonas oryzae yebN</i>	GGCAATAGCCAAGGCTATAA

Figura III.28. Alineamiento de la secuencia de la hipotética zona de unión de la proteína MntR detectada en la región intergénica entre los genes *mntR* y *mntH* de *X. ampelinus* con otras secuencias de unión a MntR detectadas en el gen *mntH* de *E. coli* (Patzer y Hantke, 2001), en *mntH* y promotores de *sitABCD* de *Salmonella enterica* (Ikeda y col., 2005), y en el promotor de *yebN* (Li y col., 2011). Destacados en gris se señalan los residuos conservados en las secuencias comparadas. Las flechas indican las secuencias palindrómicas que reconocería la proteína MntR.

Los receptores dependientes de TonB son una familia de proteínas de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Estas proteínas son receptores específicos de membrana implicados en la captación de nutrientes esenciales para la célula como el hierro. Este proceso de entrada de sustratos requiere energía que es proporcionada por un complejo proteico al que pertenece la proteína TonB, con la cual interaccionan estos receptores dependientes de TonB. TonB es una proteína localizada en la membrana citoplasmática de bacterias Gram negativas. Junto con las proteínas ExbB y ExbD, forma un sistema que media la transducción de energía protón-motriz desde la membrana citoplasmática a la membrana externa. Esta fuente de energía es necesaria para el transporte hacia el interior de la célula de complejos hierro-sideróforos y de vitamina B12 (Letain y Postle, 1997).

La secuencia nucleotídica del gen *mntH* fue analizada a través del programa DNASTAR, lo que permitió deducir la secuencia aminoacídica de su proteína (Figura III.29) y localizar el marco de lectura de *mntH*. Este gen presenta un tamaño de 1275 pb y codifica para una proteína de 424 aminoácidos cuya masa molecular teórica es 45,2 kDa y su punto isoeléctrico 9,2.

GAATTCCTCGTATCCACGCTAATTTCCATTTCTTGCCTCGTCTCGTCAGCCACTCGCTCTGGGCCAAGACAGAGGGGAATCGCTTTATAGAGATAGAGCCGATCACTGTCTCGACGTC 120
CTTAAGGAGGCATAGGTCGATTAAAGGTAAGAAGCGGAGCAGAGCAGTCCGGTAGCGAGACCCGGTCTGTCTGCCCTTAGCGAAATATCTTATCTCCGCTAGTGACAGAGCTGCAG 120
E P L R I H A N F H P L P R L V S H S L W A K T D G E S L Y R D R G D H C L D V
N S S V S T L I S I S C L V S S A T R S G P R Q T G N R F I E I E A I T V S T S
S N R R I W A L K W K K C R R T L W E S Q A L V S P S D S . L S L P S Q E S T
TGGCGGCAGCGGCTTCAGGAGCGCGGAGGCGTCGAGCGTGCCTTCTGACGTGGTCTCGATGCCCTCGCGTCGCGCGCGGGCGCAGTGGCGTCCACGCCAGCCAGCCAGCAGG 240
ACCGCGCGTGCAGGAGTCTCTTCGCGCGCTTCCGCGCTCGCGAGCGAGAAAGACTGCAACCAAGAGCTACGGGAGCGCGAGCGCGCGCGCGTTCAGCGCGCAGGTCGCGCGTGCCTC 240
W A A R A P R K R A K A S S V A L L T W C S M P S A S R R A Q S A S T P S A S R
G R H A P S G S A R R R R A S P C . R G A R C P R R R R G G R E R R P R P A P A G
Q A A R A K L F R A F A D L T A E E V H H E I G E A D R R A C D A D V G L A L L

Figura III.29. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la región del genoma que contiene el gen *mntH* en *Xylophilus ampelinus*.

III.4.4.2. Amplificación del gen *mntH* por PCR

Se realizó la amplificación completa de *mntH* mediante PCR, necesaria para obtener una sonda de este gen y para el desarrollo de estudios posteriores. Se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla III.11) que permitiesen la amplificación desde el inicio hasta el final del gen. Se utilizó como molde ADN genómico de la cepa silvestre. El producto de amplificación, una vez verificado su tamaño (1,2 kb) y purificado, se secuenció para comprobar que no contenía errores, condición necesaria para estudios de expresión.

Tabla III.11. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *mntH*.

mntHF	5'-ATGAACGGCAGCGTGCCGGTG- 3'
mntHR	5'-CTACCAAGTGGCCATGTCGAAAAGC- 3'

III.4.4.3. Análisis del número de copias del gen *mntH* en el genoma de *X. ampelinus*

Se desconoce el número de copias existentes en el genoma de *X. ampelinus* del gen *mntH*. Para comprobarlo, se digirió su ADN con BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, Sall y XhoI, y se realizó una hibridación mediante *Southern* con la sonda de 1,2 kb obtenida anteriormente por amplificación de *mntH*.

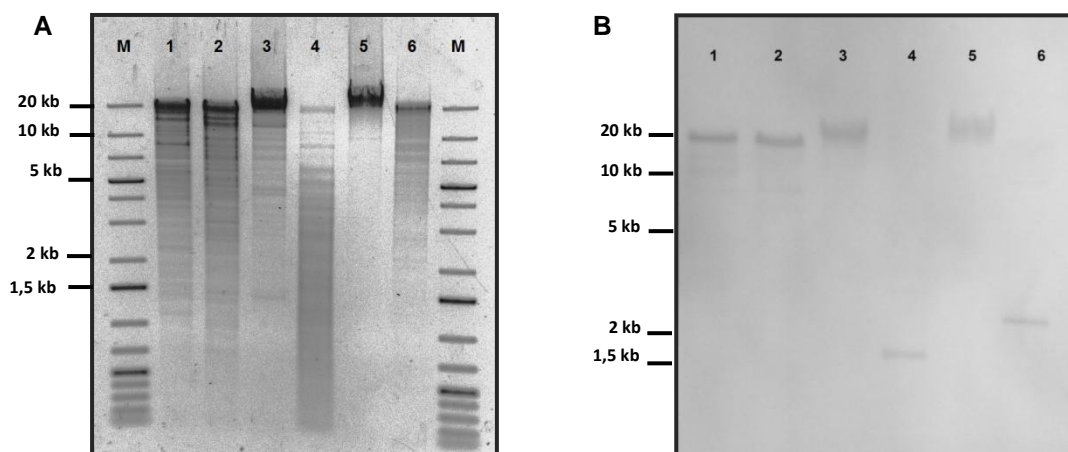


Figura III.30. A) Gel de agarosa mostrando el resultado de la digestión del ADN de *X. ampelinus* con las enzimas de restricción BamHI (1), EcoRI (2), HindIII (3), PstI (4), Sall (5) y XhoI (6). B) Análisis mediante hibridación con la sonda de *mntH*.

El resultado de la hibridación (Figura III.30) muestra una banda en cada uno de los carriles, correspondientes a las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. Esto indica que sólo existe una copia de *mntH* en *X. ampelinus*. Las enzimas empleadas no cortan en la secuencia del gen, a excepción de PstI, que tiene dos puntos de corte en *mntH*, originando

fragmentos de 309, 329 y 1858 pb, cada uno de ellos con parte del gen. La única banda de hibridación en el carril de la digestión con esta enzima se corresponde con el fragmento de mayor tamaño, mientras que los fragmentos más pequeños generarían una señal demasiado débil, inapreciable en el revelado de la membrana.

III.4.4.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de MntH deducida a partir de la secuencia del gen

A continuación se llevó a cabo un análisis de la composición y estructura de la secuencia de aminoácidos de MntH, determinada a partir de la secuencia de nucleótidos, con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre esta proteína.

III.4.4.4.1. Comparativa de la secuencia de MntH con otras especies

La secuencia de la proteína MntH de *X. ampelinus* fue comparada con otras proteínas de la base de datos para identificar posibles homólogos en otras especies.

Tabla III.12. Similitud de la secuencia de la proteína MntH de *X. ampelinus* con proteínas MntH de otras especies. Se muestran los principales resultados de la búsqueda en la base de datos de proteínas realizada con Blastp, a partir de la secuencia de aminoácidos.

Referencia	Descripción	Cobertura secuencia	Valor E	Identidad máxima
WP_007160634.1	Transportador de manganeso (<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>)	99%	0,0	82%
WP_017640021.1	Transportador de manganeso (<i>Pseudomonas</i> sp. 313)	99%	0,0	81%
WP_019364645.1	Transportador de manganeso (<i>Pseudomonas luteola</i>)	99%	0,0	80%
WP_010798816.1	Transportador de iones metálicos (Mn ²⁺ /Fe ²⁺) de la familia Nramp (<i>Pseudomonas</i> sp. HPB0071)	99%	0,0	80%
WP_019904854.1	Transportador de manganeso (<i>Methylobacterium</i> sp. 77)	99%	0,0	79%
WP_018042420.1	Transportador de manganeso (<i>Methylobacterium</i> sp. 88A)	99%	0,0	78%
WP_017913854.1	Transportador de manganeso (<i>Xanthomonas</i> sp. SHU166)	99%	0,0	82%
WP_017909490.1	Transportador de manganeso (<i>Xanthomonas</i> sp. SHU199)	99%	0,0	81%
WP_017917152.1	Transportador de manganeso (<i>Xanthomonas</i> sp. SHU308)	99%	0,0	82%
WP_008370962.1	Transportador de manganeso (<i>Pseudomonas</i> sp. M47T1)	99%	0,0	79%

En la Tabla III.12 se muestran las 10 proteínas más similares de la comparación, dispuestas en el orden generado por el programa Blastp. Se observa una clara homología con proteínas transportadoras de manganeso, concretamente con proteínas MntH, de diferentes especies. La mayor identidad en aminoácidos es con la proteína MntH de *Pseudomonas psychrotolerans*, seguida de proteínas transportadoras de manganeso de especies de los géneros *Methylobacterium* y *Xanthomonas*. El grado de identidad entre estas proteínas es elevado, indicativo de que MntH es una proteína bastante conservada, característica común en las proteínas de la familia NRAMP (Courville y col., 2004).

La comparativa entre secuencias se completó con el alineamiento entre la secuencia de aminoácidos deducida y las de otras proteínas MntH con mayor similitud respecto a la de *Xylophilus*, empleando el programa ClustalW. En la Figura III.31 se visualizan numerosas zonas idénticas entre las distintas especies, lo cual era de esperar después de los resultados obtenidos mediante Blast.

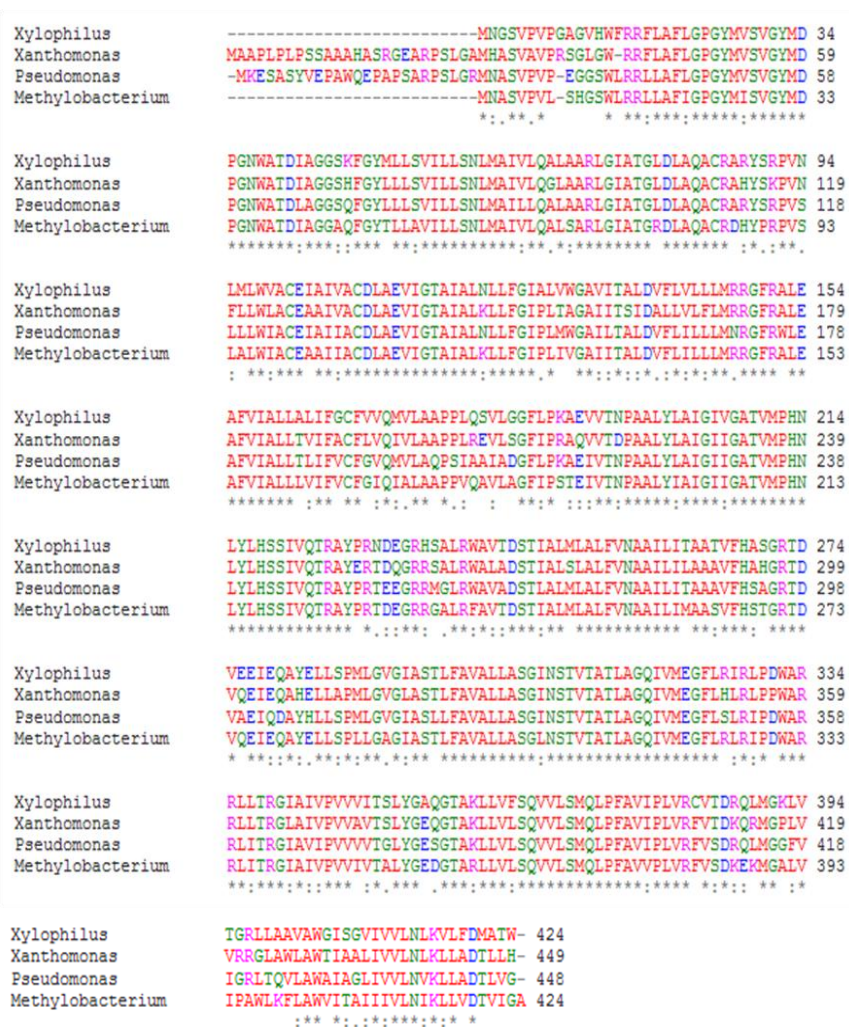


Figura III.31. Alineamiento múltiple, mediante ClustalW, de las secuencias de aminoácidos de la proteína MntH de *Xylophilus* y de 3 de las especies con mayor homología según los resultados de Blast: *Pseudomonas psychrotolerans*, *Methylobacterium* sp. 77 y *Xanthomonas* sp. SHU166. El código de color clasifica los aminoácidos según sus propiedades: rojo (pequeños, hidrofóbicos y aromáticos), azul (ácidos), magenta (básicos) y verde (hidrofílicos, neutros y polares).

III.4.4.4.2. Caracterización de la estructura primaria

MntH está formada por 424 aminoácidos, 27 de ellos con carga positiva y 21 con carga negativa. Predominan en la secuencia los aminoácidos con cadenas hidrofóbicas, alanina (13,7%), leucina (15,3%) y valina (11,6%), aunque también abundan los residuos de glicina (8,3%).

III.4.4.4.3. Caracterización de la estructura secundaria

El estudio de la estructura secundaria de la proteína a través del programa Psi-Pred determinó que la proteína presenta un 76,4% de los aminoácidos formando α -hélices, un 1,4% láminas β y un 22,2% giros. La predicción de la estructura secundaria realizada por el programa se muestra en la Figura III.32.

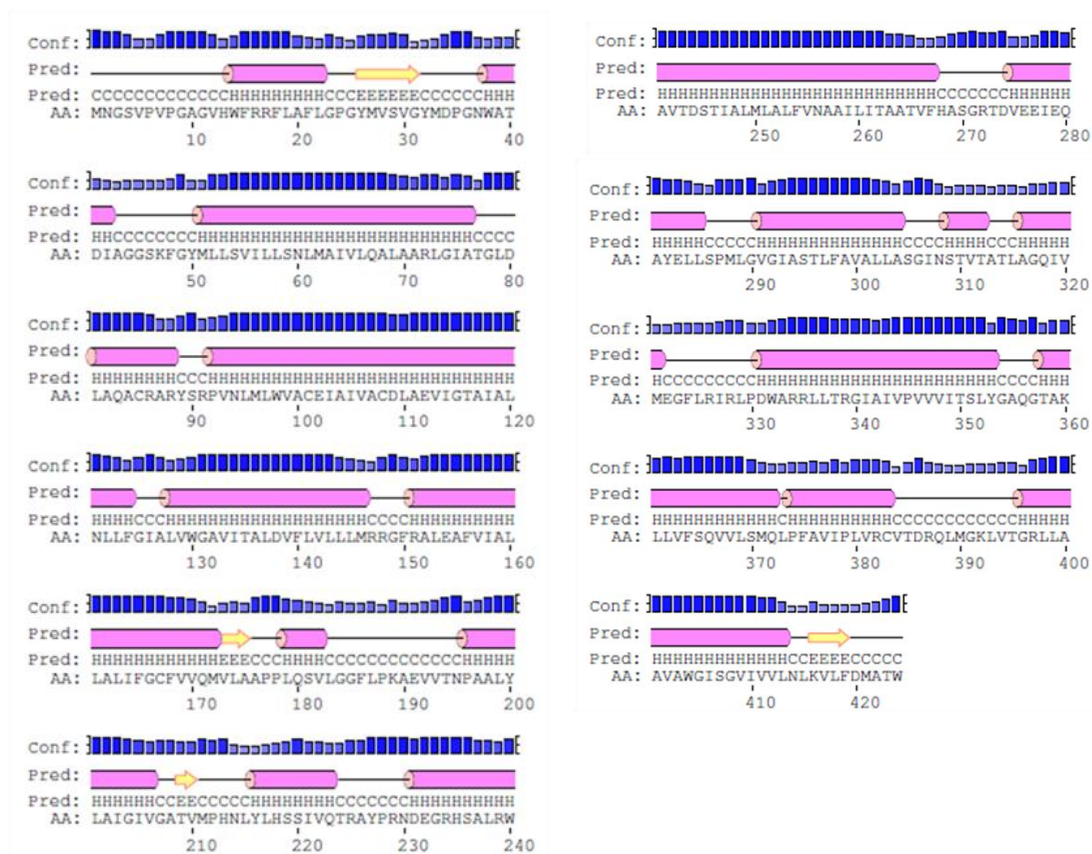


Figura III.32. Predicción de la estructura secundaria de MntH realizada por el programa Psi-Pred. Los cilindros rosas representan regiones con disposición en α -hélice y las flechas amarillas indican regiones con disposición en lámina β . La fiabilidad de la predicción para cada aminoácido se representa en columnas azules.

La alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos se traduce en la presencia en esta proteína de 10 segmentos transmembranales (Figura III.33) deducidos por el programa informático Split-4.0 (<http://split4.pmfst.hr/split/4/>). Este dato confirma que MntH es una proteína integral de membrana, de acuerdo con su función biológica de transportador de membrana. Además, esta topología transmembrana es muy similar a la de otras proteínas MntH de otras especies (Courville y col., 2004), lo cual confirma el alto grado de conservación de esta proteína.

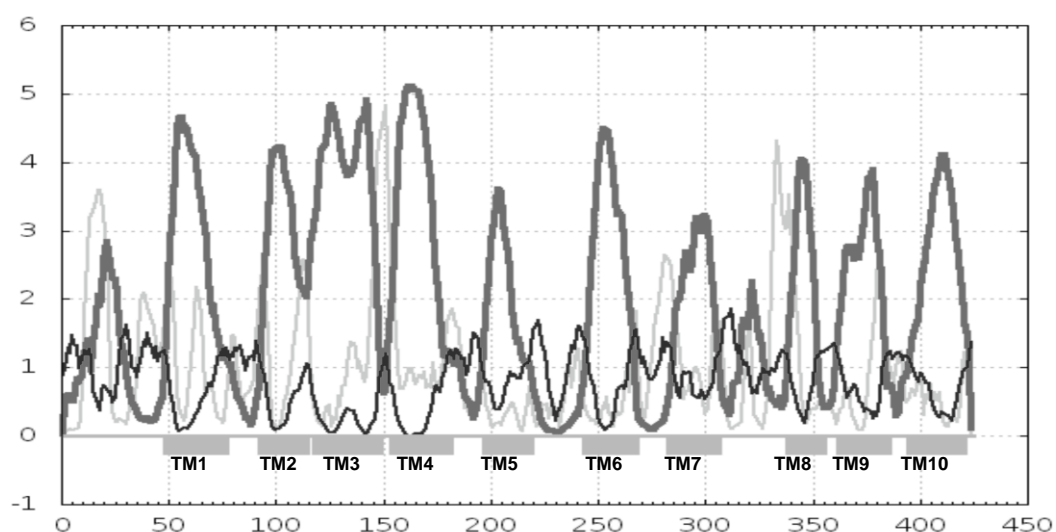


Figura III.33. Predicción de los dominios transmembrana de la proteína MntH mediante el programa Split-4.0. El modelo establece 10 dominios transmembrana (designados como TM1 hasta TM10) en esta proteína.

III.4.4.4. Caracterización de la estructura tridimensional

La estructura tridimensional de la proteína MntH fue modelada por homología mediante el software SWISS-MODEL. La representación obtenida (Figura III.34) presenta una fiabilidad muy baja, según el programa esto puede suceder por tratarse de una proteína de membrana o porque la calidad del modelo sea mala. La estructura predominante es la α -hélice, coincidiendo con la predicción de la estructura secundaria.

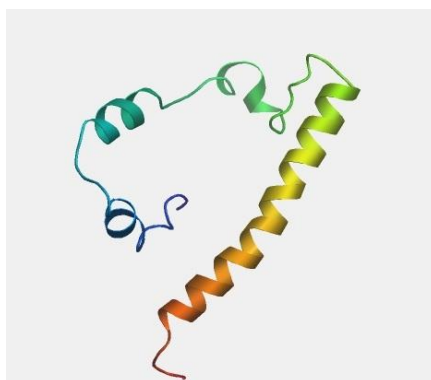


Figura III.34. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína MntH de *X. ampelinus*.

III.4.4.5. Interrupción génica de *mntH*

La técnica utilizada para la interrupción del gen *mntH* fue la misma que se empleó para tratar de interrumpir el gen *to/B*, la inactivación génica por doble recombinación (Figura III.35). Igualmente se eligió el vector pK18*mobsacB* para la clonación de las secuencias flanqueantes del gen *mntH*. Como ya se comentó, este plásmido contiene el gen *sacB*, letal para la bacteria

cuando crece en presencia de 10% sacarosa, además de resistencia a kanamicina, como sistemas de selección.

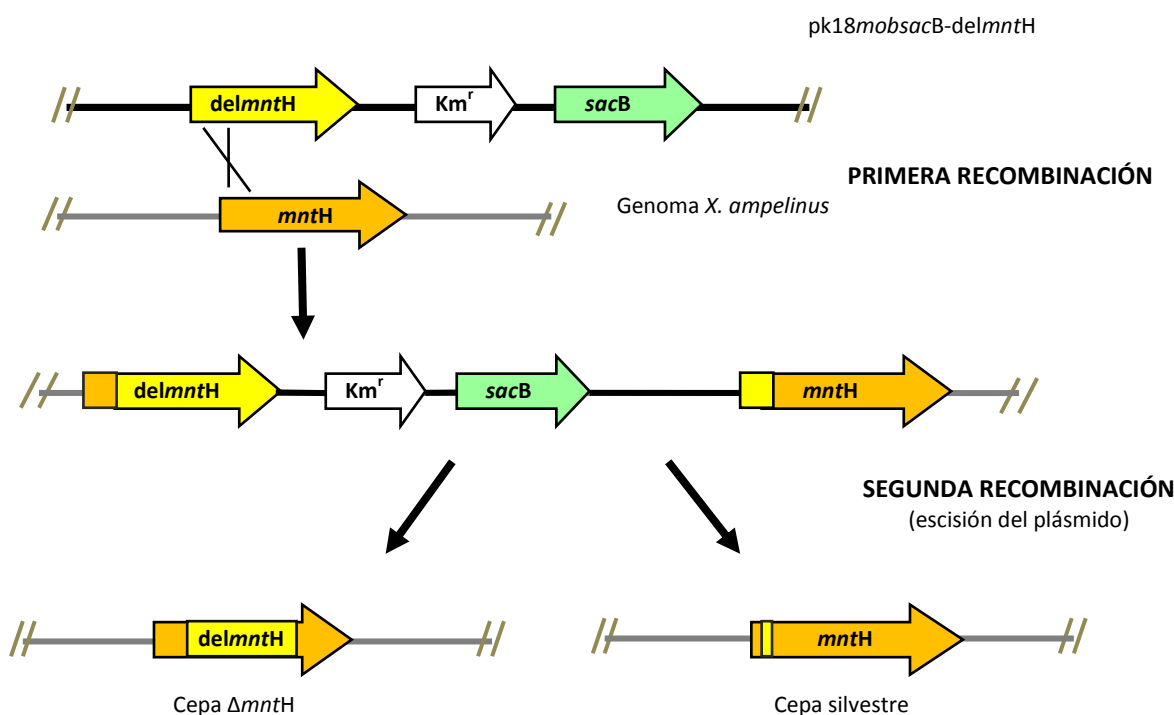


Figura III.35. Representación esquemática del proceso de deleción del gen *mntH* por doble recombinación. La primera recombinación produce la integración del plásmido *pk18mobsacB-delmntH* en el cromosoma de la bacteria por recombinación homóloga simple, pudiendo seleccionarse los recombinantes por resistencia a kanamicina. En una segunda recombinación se produce la pérdida del plásmido, forzada por crecimiento en presencia de 10% de sacarosa. Las células que hayan crecido en este medio pueden tener restaurado el genotipo silvestre o bien tener el gen delecionado.

III.4.4.5.1. Construcción del plásmido *pk18mobsacB-delmntH*

Se diseñaron 2 parejas de cebadores específicos (Tabla III.13), cada una para la amplificación de la región corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, del gen *mntH*. La primera pareja amplificó un fragmento de ADN de 711 pb, inmediatamente anterior al gen, con secuencias diana en sus extremos para *Bam*HI (extremo 5') y *Xba*I (extremo 3'). La segunda pareja permitió amplificar un fragmento de 702 pb, localizado inmediatamente a continuación del final gen, con secuencias diana en sus extremos para *Xba*I (extremo 5') y *Hind*III (extremo 3').

Los fragmentos de ADN obtenidos tras la amplificación por PCR se digirieron con *Xba*I y se ligaron. A continuación se digirió con *Bam*HI y *Hind*III y se ligó al vector *pk18mobsacB*, previamente digerido con ambas enzimas.

Tabla III.13. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región corriente arriba (A) y corriente abajo (B) del gen *mntH*. En negrita se indican las secuencias diana para las enzimas de restricción correspondientes.

A	
delmntH1	5'- CTT AGGATCCT CGCGGCGGGCGCAGTCGGCGT -3'
delmntH2	5'- ACATT CTAGACT CGCCCAGGCTGGCGCCGGCG -3'
B	
delmntH3	5'- GGTAT CTAGA AAGAAAGTAGCGATGACCGTTTCCGATGCGGATGCG -3'
delmntH4	5'- CTAG AAGCTT CGGCGCATCCGGTCGCAGTTGTC -3'

Se seleccionaron y analizaron las colonias obtenidas tras la transformación en *E. coli* DH5 α del plásmido formado. Se obtuvieron 4 transformantes positivos, cuya construcción (Figura III.36) se comprobó mediante secuenciación con los oligonucleótidos universales M13 (-20) Directo y M13 Reverso.

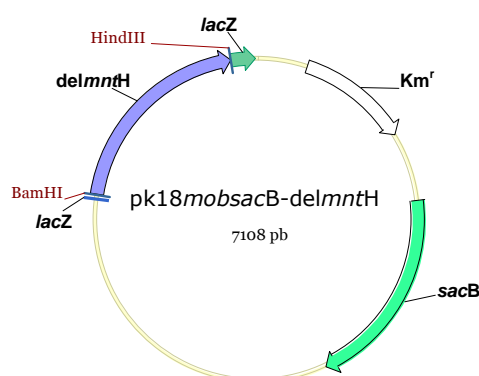


Figura III.36. Plásmido pK18mobsacB-delmntH construido para la delección del gen *mntH*. El inserto *delmntH*, formado con las secuencias flanqueantes del gen, se introdujo en el policonector del vector pK18mobsacB.

III.4.4.5.2. Transformación por electroporación y selección de transformantes

Mediante electroporación se introdujo la construcción pK18mobsacB-delmntH en *X. ampelinus*. Se seleccionaron los transformantes que integraron el plásmido, como consecuencia de una primera recombinación homóloga, mediante siembra en placa con 25 μ g/ml de kanamicina. Tras varios intentos sin éxito en los que no hubo crecimiento, se logró conseguir 1 transformante en uno de los ensayos. Este transformante sería portador del gen original y del modificado para la delección.

El mutante obtenido se creció en medio líquido TSB y se hicieron siembras en LPGA con 10% de sacarosa para seleccionar la pérdida del plásmido. Tras varias siembras se obtuvieron 14 colonias. Estas colonias se pasaron, de forma simultánea, a placas de LPGA con 10% de sacarosa y a placas de LPGA con 10% de sacarosa y 25 μ g/ml de kanamicina. Los clones que hayan crecido en presencia de sacarosa pero no de kanamicina habrán sufrido una

segunda recombinación homóloga, y en su genoma habrá una copia del gen, la original o la delecionada.

Sólo se obtuvieron 6 posibles doble recombinantes que se comprobaron mediante PCR con los oligonucleótidos específicos *bmntH1* (5'-CTTAGGATCCGTGTGGCGTGGCGCGCAGCGGT-3') y *bmntH2* (5'-CTGTGGATCCGGAAACGGTCATCGCTACTTTCT-3'), que amplifican un fragmento de 1,6 kb que incluye la secuencia completa de *mntH*. Se produjo amplificación con todos ellos (Figura III.37), resultado que demuestra que no se produjo la deleción del gen.

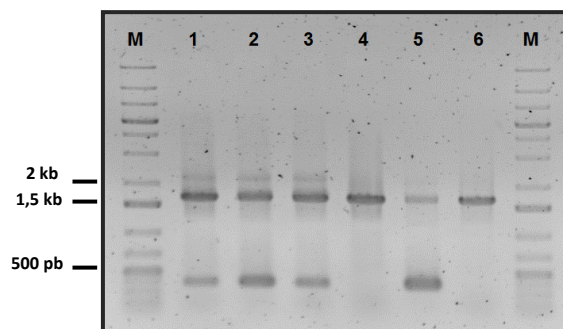


Figura III.37. Resultado de la PCR realizada con los posibles dobles recombinantes (carriles 1 al 6). M: marcador de 1kb *DNA Ladder Plus*. Todos los clones producen amplificación de la banda de 1,6 kb que contiene el gen *mntH*. Las otras bandas de distintos tamaños que aparecen son producto de amplificaciones inespecíficas.

Se repitió este ensayo en varias ocasiones sin que se lograra la deleción del gen *mntH*. Este gen codifica para una proteína de membrana, sin la cual el crecimiento se ve dificultado en algunas bacterias (Anderson y col., 2009; Hohle y O'Brian, 2009). Podría ser ésta la causa de que no se obtengan clones viables careciendo de un gen *mntH* funcional.

III.4.4.6. Estudio de la expresión de MntH en el sistema de expresión pET SUMO

El sistema de expresión pET SUMO permite la expresión, purificación y la generación de proteínas de fusión recombinantes en *E. coli*. Puesto que la fusión con la proteína SUMO puede incrementar la expresión de la proteína recombinante formada, fue el sistema utilizado para la expresión de MntH.

La secuencia del gen *mntH*, amplificada por PCR de principio a fin (apartado III.4.4.2), se clonó en el vector pET SUMO. La clonación en este vector es de tipo TA (timina-adenina), por lo que fue necesario añadir una adenina en el extremo 3' del producto de PCR. A continuación se transformó en las células *E. coli* One Shot® Mach1™-T1^R y, de entre las colonias seleccionadas en las placas de LB con kanamicina 100 µg/ml, se aisló el plásmido de 12 de ellas y se comprobó que 2 eran transformantes positivos. La correcta construcción de

estos transformantes se confirmó mediante restricción y por secuenciación con los oligonucleótidos específicos de pET SUMO. El gen estaba en la correcta orientación y en fase con el extremo N-terminal.

El plásmido de uno de los transformantes positivos se introdujo en las células competentes *E. coli* BL21(DE3) que facilitan la expresión de proteínas recombinantes. También se transformó el plásmido pET SUMO/CAT como control positivo, el cual permite la expresión de la proteína de fusión SUMO-CAT. Una vez crecidos los transformantes en medio líquido, se indujo la expresión de ambos cultivos con 1 mM de IPTG y se continuó con la incubación. Se tomaron muestras a tiempos 0, 1, 2, 3, 4 y 6 horas, tras la inducción. A modo de referencia, también se tomaron muestras de los mismos cultivos pero sin añadirles IPTG.

Al finalizar la expresión se analizaron las muestras en un gel SDS-PAGE. El peso molecular de la proteína de fusión SUMO-CAT (control positivo) es de 39 kDa y el de la proteína SUMO-MntH de 58 kDa (al formar la proteína recombinante, la proteína SUMO incrementa en unos 13 kDa el tamaño de la proteína a la que se fusiona).

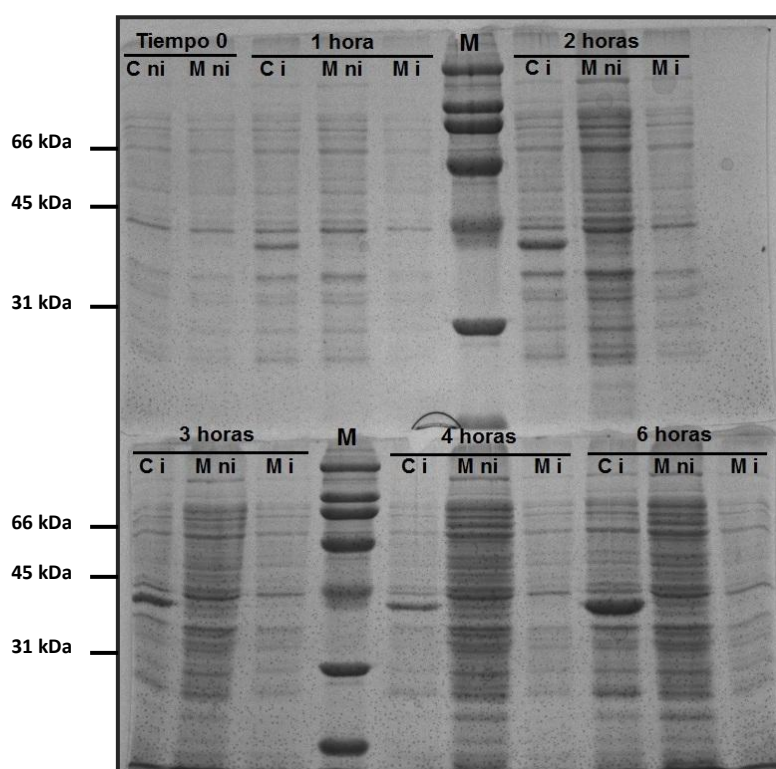


Figura III.38. Gel SDS-PAGE (12,5% acrilamida) mostrando el resultado del estudio de expresión de MntH en pET SUMO. Se indican los tiempos tras la inducción a los que corresponden las muestras. C i: control no inducido. M ni: MntH no inducida. M i: MntH inducida. M: marcador *SDS-Page molecular weight standards, broad range* (Bio-Rad).

En la imagen del gel (Figura III.38) se visualiza la inducción de SUMO-CAT, aumentando la expresión con el tiempo. Sin embargo no se aprecian variaciones en el caso de la proteína

recombinante SUMO-MntH, lo que indica que no hubo sobre-expresión. Se repitió la transformación utilizando la cepa *E. coli* BL-21(DE3)pLysS, útil en los casos en que se trata de expresar un gen tóxico para la célula puesto que reduce los niveles de expresión basal. El resultado fue el mismo, sin poder visualizarse un aumento de la expresión. Se realizaron una serie de cambios en la metodología para tratar de que se produjese la inducción, como disminuir la cantidad de IPTG utilizada a 0,1 mM o realizar la expresión a 30 °C en lugar de a 37 °C como se estaba haciendo, en todos los casos sin éxito. Este resultado parece sugerir que la expresión de la proteína MntH es tóxica para *E. coli*.

La posible inestabilidad generada al tratar de expresar una proteína integral de membrana como MntH podría justificar la ineficiencia en la expresión de la misma.

III.4.4.7. Análisis de la función biológica de MntH y su papel en patogenicidad

Continuando con el análisis de MntH se realizaron una serie de ensayos para profundizar en el estudio de su función biológica. En estos análisis se utilizaron 4 tipos de cepas de *X. ampelinus*: cepa silvestre (WT), cepa silvestre conteniendo el plásmido pHMI (WT-pHMI), mutante avirulento Av23 (Av23) y mutante avirulento Av23 conteniendo el gen *mntH* integrado en el plásmido pHMI (Av23/pHMI-*mntH*). Se eligió el plásmido pHMI como vector de clonación de *mntH* por sus peculiares características, ya que se trata de un vector de amplio rango de huéspedes y presenta resistencia a espectinomicina y estreptomycin. Este vector y los plásmidos recombinantes generados se introdujeron en *X. ampelinus* por electroporación.

III.4.4.7.1. Introducción del gen *mntH* en el mutante avirulento Av23.

Para la construcción del plásmido recombinante pHMI-*mntH* se diseñaron unos cebadores (Tabla III.14) que permitieron amplificar un fragmento de ADN de 1,6 kb, que incluye el gen *mntH* y la región promotora corriente arriba hasta el inicio del gen *mntR* con secuencias diana en sus extremos para BamHI. El producto de PCR y el plásmido pHMI fueron digeridos con BamHI para poder realizar, de forma efectiva, la ligación entre ambos. Una vez transformada la construcción en *E. coli*, se seleccionaron y se analizaron las colonias mediante restricción de su plásmido con diferentes enzimas. Se consiguió obtener un transformante positivo, confirmándose también por PCR que era portador de *mntH*.

Tabla III.14. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento de ADN que contiene la secuencia del gen *mntH* con extremos de corte para BamHI. En negrita se indica la secuencia diana para BamHI.

bmntH1	5'- CTTAG GATCC GTGTGGCGTGGCGCGCAAGCGGT -3'
bmntH2	5'- CTGT GGATCC GGAAACGGTCATCGCTACTTTCT -3'

La construcción pHMI-*mntH* se introdujo en células electrocompetentes del mutante Av23 mediante electroporación, siguiendo el procedimiento descrito para *X. ampelinus*. Se seleccionaron los transformantes en placas de LPGA con 25 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de espectinomicina. Se eligieron 3 de los transformantes para los ensayos posteriores.

III.4.4.7.2. Análisis por PCR de las diferentes cepas obtenidas de *X. ampelinus*

El ADN de las cepas a analizar (WT, WT-pHMI, Av23 y 3 clones de la cepa Av23 conteniendo el plásmido pHMI-*mntH*) se empleó como molde para su amplificación por PCR, utilizando la pareja de cebadores *bmntH1/bmntH2*. La finalidad es verificar las diferencias entre las cepas que portan el gen *mntH* original y/o el interrumpido por el transposón. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para la visualización del resultado (Figura III.39).

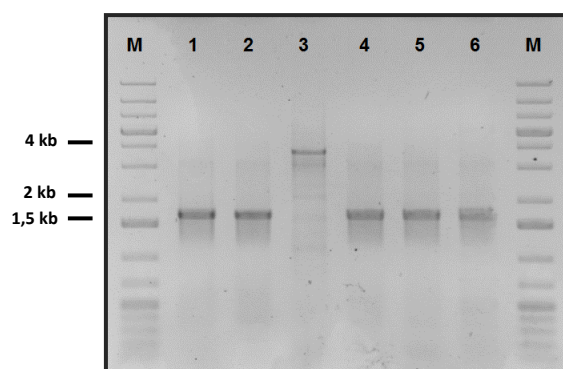


Figura III.39. Gel de agarosa en el que se muestra el resultado de la amplificación por PCR de la región de ADN que contiene el gen *mntH* en distintas cepas de *X. ampelinus*: WT (1), WT-pHMI (2), Av23 (3) y 3 clones diferentes de la cepa Av23/pHMI-*mntH* (4, 5 y 6). M: marcador de 1kb *DNA Ladder Plus*.

La cepa silvestre genera amplificación de una banda de 1,6 kb (tamaño correspondiente a la zona amplificada por la pareja de cebadores empleada), al igual que la cepa silvestre con el plásmido pHMI. Este es el tamaño esperado si en el genoma se encuentra el gen original, tal y como se vio en el apartado anterior. Sin embargo, a partir del mutante Av23 se amplificó un fragmento mayor (3,6 kb) que correspondería a la suma del fragmento de 1,6 kb conteniendo el transposón (2 kb). Los 3 clones de la cepa Av23/pHMI-*mntH* contienen una copia del gen original y la interrumpida, por lo que deberían dar 2 bandas, de 1,6 y 3,6 kb. En el gel se distingue únicamente la más pequeña, correspondiente al gen original, pero no la grande. Esto no es extraño considerando la débil amplificación obtenida de la banda de 3,6 kb del mutante Av23. En el caso de los clones de la cepa Av23/pHMI-*mntH* parece que los oligos amplifican eficazmente el fragmento de 1,6 kb, pero son incapaces de amplificar el fragmento de 3,6 kb en la misma reacción. Para comprobar que estos clones de la cepa Av23/pHMI-*mntH* realmente contenían en su genoma una copia del transposón en medio de la secuencia de *mntH*, se amplificaron las regiones anterior y posterior al transposón, evitando así las posibles

interferencias que éste pudiese generar. Se hicieron dos reacciones, una para cada región (Figura III.40). La amplificación de la región anterior se realizó con los oligonucleótidos *bmntH1* y R6KAN-2 RP-1 (específico del transposón), y la de la región posterior con los oligonucleótidos KAN-2 FP-1 (específico del transposón) y *bmntH2*. El tamaño del producto de amplificación correspondiente sería 1100 y 550 pb, respectivamente.

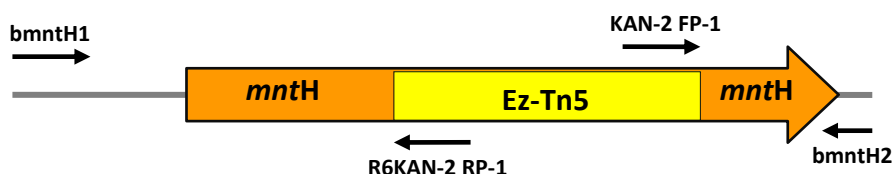


Figura III.40. Esquema de la localización de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las regiones de ADN externas al transposón Ez-Tn5, localizadas corriente arriba y corriente abajo del mismo.

El resultado de estas amplificaciones se muestra en la Figura III.41. El ADN del mutante Av23 y de los clones de la cepa Av23/pHMI-*mntH* produjo amplificación de los tamaños esperados, lo que confirma la interrupción del gen en estas cepas. No se observan estas bandas en los carriles correspondientes a la cepa silvestre y a la portadora del plásmido pHMI, puesto que contienen el gen intacto.

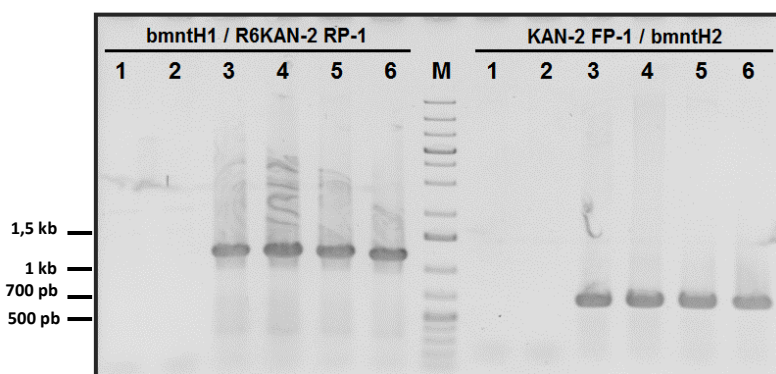


Figura III.41. Amplificación por PCR de las regiones de ADN externas al transposón, en las que se localiza el gen *mntH* en distintas cepas de *X. ampelinus*: WT (1), WT-pHMI (2), Av23 (3) y Av23/pHMI-*mntH* (4, 5 y 6). *bmntH1* / R6KAN-2 RP-1: amplificación del fragmento anterior al transposón. KAN-2 FP-1 / *bmntH2*: amplificación del fragmento posterior al transposón. M: marcador de 1kb *DNA Ladder Plus*.

III.4.4.7.3. Ensayo de inoculación sobre hojas de vid. Determinación del nivel de virulencia en función del grado de necrosis foliar

Se realizaron infecciones sobre hojas de vid desarrolladas *in vitro* con las cepas de *X. ampelinus* que son objeto de análisis (WT, WT-pHMI, Av23 y 3 clones de Av23/pHMI-*mntH*) para determinar las diferencias en la virulencia de cada una de ellas. Se inocularon 10 hojas con cada cepa, además de un control negativo con glicerol 20%. Los daños fueron visibles transcurridos 7 días desde la infección. Los efectos patogénicos son más evidentes en la cepa

silvestre y en la portadora del plásmido pHMI. El mutante Av23 no manifestaba signos de virulencia, mientras que si se le introduce el gen *mntH* sí producía daños en la hoja, aunque en menor grado que la cepa silvestre (Figura III.42).

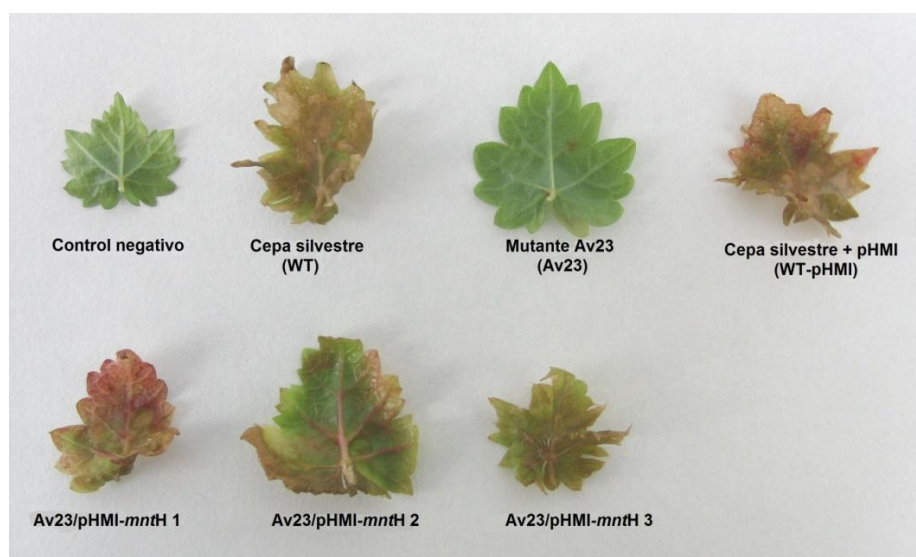


Figura III.42. Daños producidos en las hojas de vid inoculadas con las cepas indicadas. Se muestra una de las diez hojas infectadas con cada tipo de *X. ampelinus*.

A fin de cuantificar de manera más exacta el nivel de virulencia, se determinó el nivel de necrosis de las hojas infectadas a través de la medida de la conductividad de una solución acuosa resultante de la incubación de fragmentos de hojas (*electrolyte leakage assay*). Ambas variables están relacionadas, ya que se supone que la liberación de electrolitos de las células vegetales es proporcional al grado de lisis celular producido por el patógeno.

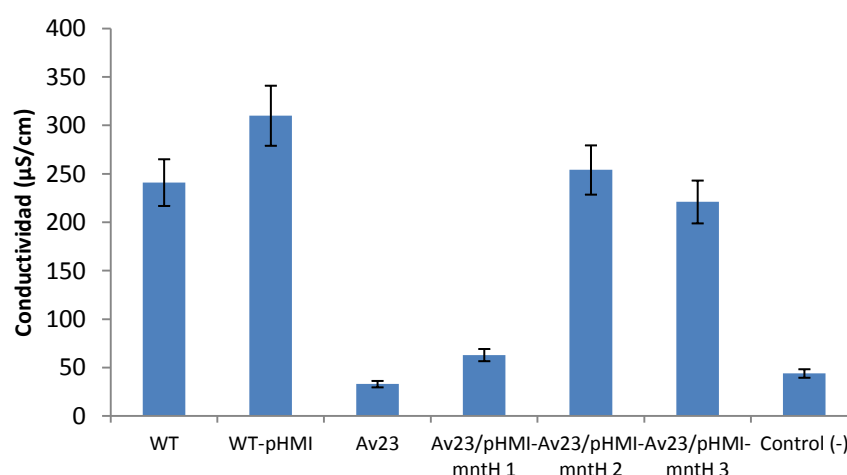


Figura III.43. Representación gráfica de la conductividad medida en hojas de vid inoculadas con la cepa silvestre (WT), cepa silvestre conteniendo el plásmido pHMI (WT-pHMI), mutante avirulento Av23 (Av23) y mutante avirulento Av23 conteniendo el gen *mntH* integrado en el plásmido pHMI (Av23/pHMI-*mntH*). Los resultados mostrados corresponden a la media de 3 experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar.

Los datos obtenidos tras la medida de la conductividad se muestran en la Figura III.43. En ella se puede comprobar como la conductividad es mayor en aquellas hojas inoculadas con cepas que contienen el gen *mntH* intacto (cepa silvestre y cepa WT-pHMI). Por el contrario, el nivel más bajo de conductividad corresponde al mutante Av23. Sin embargo, el valor de conductividad aumenta claramente cuando el mutante Av23 es complementado con una copia del gen *mntH*. Estos datos confirman lo observado anteriormente en el ensayo visual en hojas, que la virulencia es mayor en cepas que presentan una copia intacta del gen *mntH*, mientras que su interrupción da origen a un mutante avirulento. Se corrobora así la importancia del gen *mntH* de *X. ampelinus* en patogénesis y virulencia.

III.4.4.7.4. Ensayo de sensibilidad a cationes

El estudio de la sensibilidad a cationes de las cepas de *X. ampelinus* tiene como objetivo conocer el posible papel de MntH en el transporte de diferentes cationes divalentes. Se llevó a cabo inoculando placas de medio LPGA suplementado de forma individual con 0,1 y 1 mM de cloruro de calcio, cloruro de cobalto, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de hierro, sulfato de níquel, cloruro de zinc, sulfato de cobre y sulfato de cadmio. Sobre estas placas se hicieron inoculaciones con los cultivos de cada cepa y también con diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}).

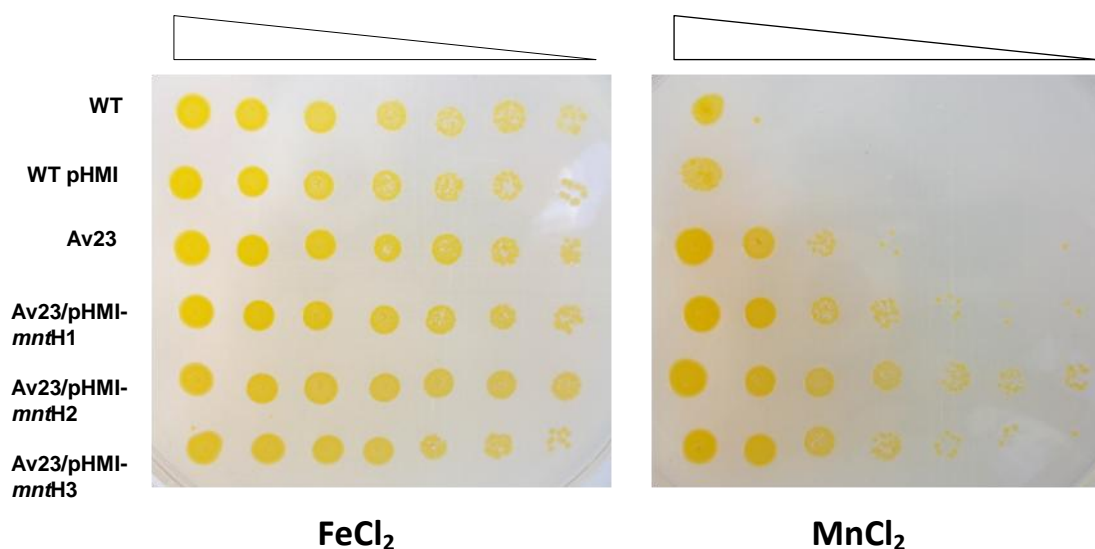


Figura III.44. Ensayo de sensibilidad a cationes. Se muestran las imágenes de las placas con medio LPGA suplementado con FeCl_2 y con MnCl_2 . En cada fila se inoculó con una cepa diferente, en concentraciones decrecientes de izquierda a derecha, desde el cultivo sin diluir hasta la dilución 10^{-6} .

En muchas de las placas no hubo crecimiento y, a partir de la dilución 10^{-1} , sólo se observó en las placas suplementadas con Fe y con Mn a una concentración 1 mM (Figura III.44). Al añadir FeCl_2 aparecen colonias hasta en la dilución mayor de cualquiera de los

cultivos. En cambio, en la placa con MnCl_2 , sólo crecen hasta la dilución 10^{-6} los clones de la cepa Av23/pHMI-*mntH*. El mutante Av23 deja de crecer en la dilución 10^{-3} y la cepa silvestre sólo crece en el cultivo sin diluir.

Estos resultados sugieren una especificidad de MntH por Mn, ya que no se ve afectado el crecimiento en presencia de Fe ni se observan diferencias entre cepas. Algo más paradójicas resultan las diferencias entre cepas al suplementar con Mn, esperándose un mayor crecimiento de la cepa silvestre frente a las demás que tienen afectado el gen *mntH*, o incluso similar, según se ha visto en otras bacterias (Runyen-Janecky y col., 2006; Anderson y col., 2009; Hohle y O'Brian, 2009). Las cepas que peor crecen son la cepa silvestre (WT) y la cepa silvestre transformada con el plásmido pHMI. Estos datos sugieren que la concentración empleada de Mn es tóxica cuando la proteína MntH funciona correctamente. Por el contrario, la sensibilidad del clon Av23 es menor, como era de suponer por su deficiencia en el transporte de Mn. Sin embargo, resulta llamativo el crecimiento de los clones Av23/pHMI-*mntH*1, 2 y 3, incluso a las más bajas diluciones, ya que cabría esperar que el comportamiento de estas cepas fuese similar a la cepa silvestre.

III.4.4.7.5. Determinación de los niveles intracelulares de Mn, Fe y Cu

Seguidamente se realizó la medida de los niveles intracelulares de los cationes Mn^{+2} , Fe^{+2} y Cu^{+2} . Se pusieron cultivos por duplicado de cada cepa, suplementando una de las réplicas con 0,15 mM del catión correspondiente. Siguiendo el procedimiento descrito, se determinó la concentración ión metálico en el espectrómetro de absorción atómica (Figura III.45).

Los resultados muestran que, una vez suplementado el medio de cultivo con el catión correspondiente, el que se acumula en mayor cantidad es el Fe^{+2} , de entre los 3 analizados en el ensayo. Sin embargo, comparando las distintas cepas, es la acumulación de Mn^{+2} intracelular la que se ve más afectada por la interrupción del gen *mntH*, puesto que el incremento de concentración en el mutante Av23 (0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) supone tan sólo un 7,2% del aumento en la cepa silvestre (2,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El comportamiento de los clones del mutante complementado con este gen es variable, oscilando el incremento entre un 8,8 y un 26%, respecto a la WT. En cualquier caso, se puede ver como en los clones Av23/pHMI-*mntH* 1, 2 y 3, los niveles intracelulares de Mn^{+2} son considerablemente mayores cuando la cepa se crece en presencia de Mn^{+2} (0,71, 0,30 y 0,57 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente) que en ausencia del mismo (0,15, 0,11 y 0,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente). En el caso del mutante Av23, los datos de concentración intracelular de este catión en ausencia (0,26 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y en presencia de Mn^{+2} (0,41 $\mu\text{g}/\text{ml}$) muestran que hay una cierta acumulación de Mn^{+2} , pero lejos del incremento experimentado

por las otras cepas ensayadas. Estos resultados indican que existe una cierta complementación del gen *mntH*, aunque en ningún caso se recupera el nivel normal de actividad del gen en la cepa silvestre.

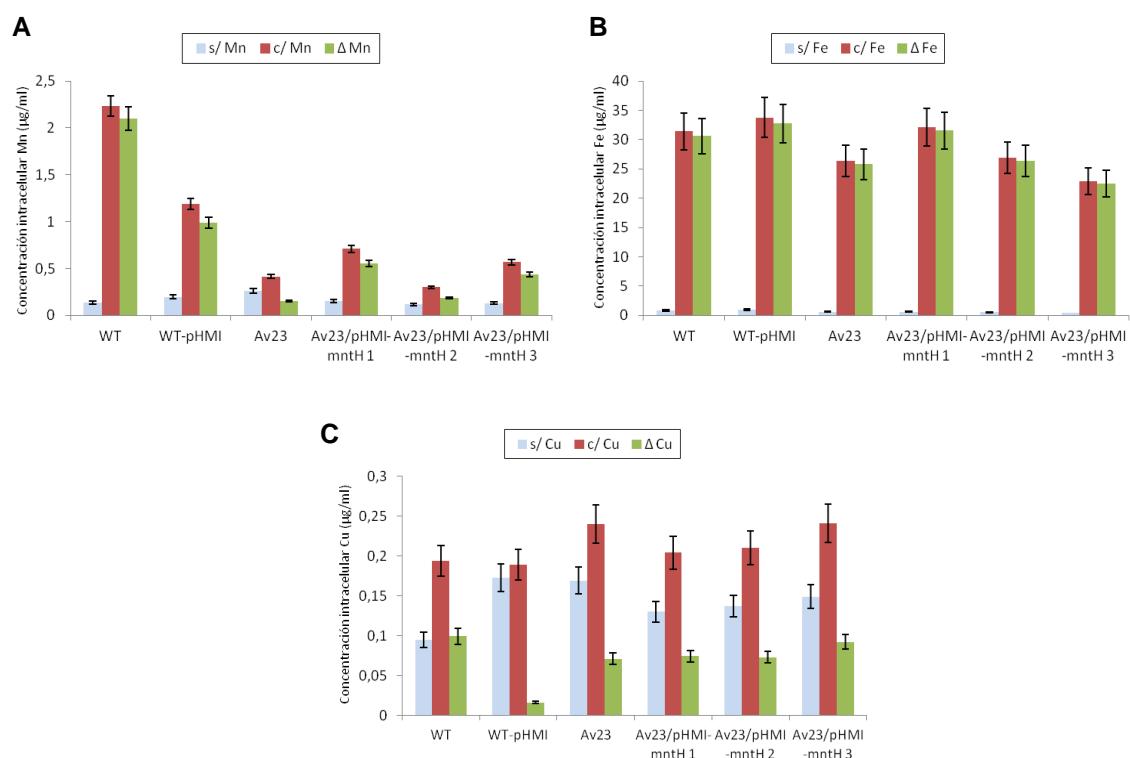


Figura III.45. Concentración intracelular (µg/ml) de Mn^{+2} (A), Fe^{+2} (B) y Cu^{+2} (C) en cepas de *X. ampelinus*. Se representa la concentración en los cultivos sin suplementar (s/), en los suplementados (c/) y la diferencia entre ambas concentraciones (Δ). Las barras indican la desviación estándar.

En cuanto a la acumulación de los otros cationes, las diferencias entre WT y el mutante Av23 no son tan acusadas. En el caso de Fe^{+2} el mutante acumula un 84,3% en comparación a la WT, y un 71,7% cuando se suplementa el medio con Cu^{+2} . Los clones portadores de *mntH* en el plásmido pHMI presentan concentraciones de estos metales con valores que oscilan entre los del mutante y el silvestre.

Por tanto, se puede afirmar que el contenido intracelular de Fe^{+2} y Cu^{+2} no se ve afectado por la mutación de *mntH*, mientras que los niveles intracelulares de Mn sí que se ven notablemente reducidos en las cepas mutantes. El análisis de los datos revela el importante papel de *mntH* en el transporte de Mn^{+2} , elemento por el que parece tener más especificidad frente a Fe^{+2} o Cu^{+2} .

III.4.4.7.6. Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno

Según diversas publicaciones, la expresión de *mntH* es inducida por exposición al peróxido de hidrógeno (Kehres y col., 2002; Runyen-Janecky y col., 2006; Perry y col., 2012),

mientras que la mutación de este gen implica un aumento en la sensibilidad a este compuesto (Kehres y col., 2000; Anjem y col., 2009; Champion y col., 2011). Para determinar el efecto de la interrupción del gen *mntH* en *X. ampelinus* se desarrolló un ensayo de sensibilidad a H_2O_2 .

Suspensiones celulares de cada una de las cepas fueron tratadas con 10mM de H_2O_2 durante 15 minutos. Diluciones de estas suspensiones, además de otras sin tratar que sirvieron como control, se sembraron en placas de medio LPGA para hacer el recuento del número de bacterias viables (Figura III.46). Una vez contabilizadas se calculó el porcentaje de mortalidad en función de las células crecidas a partir del cultivo control y del expuesto a H_2O_2 .

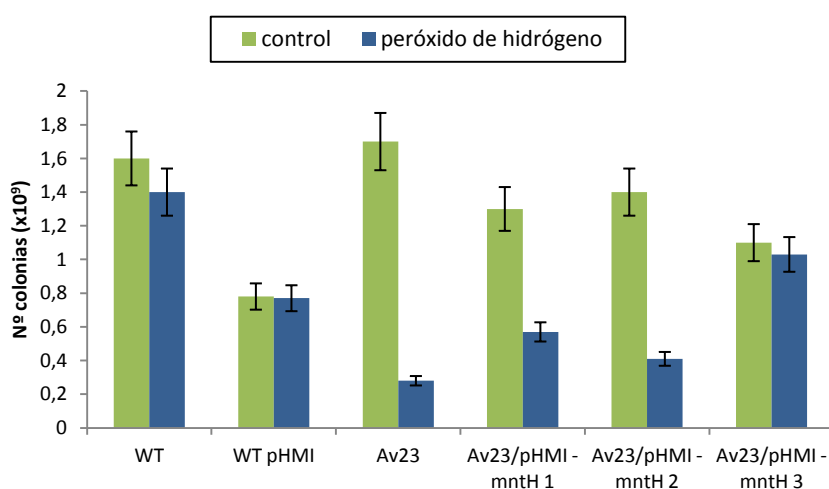


Figura III.46. Representación gráfica del resultado del ensayo de sensibilidad a H_2O_2 con las distintas cepas de *X. ampelinus*. Los valores se refieren a nº de células contabilizadas por ml de suspensión. Las barras indican la desviación estándar.

La cepa más sensible a la exposición al H_2O_2 es el mutante Av23, que presenta una muy baja tasa de supervivencia (16,8%), seguida de los clones Av23/pHMI-*mntH* 1 y 2 (29,1% y 42,9%). En cambio, las cepas WT, WT-pHMI y el clon Av23/pHMI-*mntH* 3 son más resistentes al efecto oxidativo del H_2O_2 , con tasas de viabilidad celular de 88,4%, 99% y 92,1%, respectivamente. La carencia funcional de *mntH* en estas cepas guarda relación con la sensibilidad al estrés oxidativo provocado por el H_2O_2 , tal y como se ha observado en otras especies. Esta menor resistencia al estrés podría estar relacionada con la función del Mn^{+2} como cofactor de enzimas detoxificantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa. En ausencia de MntH, los niveles intracelulares de Mn^{+2} serán menores, afectando a este tipo de enzimas protectoras contra el estrés oxidativo, y aumentando la sensibilidad de la célula a las especies reactivas del oxígeno.

III.4.4.7.7. Ensayo de medida de actividad catalasa y superóxido dismutasa

Las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) forman parte de la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo. Estas enzimas eliminan peróxido de hidrógeno y aniones superóxido, respectivamente, además de impedir la formación de radicales hidroxilo de elevado poder oxidante. El papel de dichas enzimas es importante a la hora de proteger a bacterias patógenas de las especies reactivas del oxígeno, producidas por el hospedador durante la infección, y por ello se asocian a mecanismos de virulencia. Sus actividades pueden verse afectadas si no hay transporte de Mn^{+2} hacia el interior celular, ya que es un importante cofactor en las reacciones catalizadas por estas enzimas (Makui y col., 2000; Runyen-Janecky y col., 2006). Teniendo en cuenta la función transportadora de MntH, se determinó la actividad de cada una de estas enzimas en las cepas de *X. ampelinus* analizadas.

Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, se obtuvieron los extractos celulares y se cuantificó la concentración de proteínas. La actividad catalasa se midió en un espectrofotómetro a 240 nm inmediatamente después de añadir 20 μ l de sobrenadante del extracto a 500 μ l de H_2O_2 10,6 mM en tampón fosfato. A partir de los datos obtenidos en el espectrofotómetro se calculó la actividad enzimática específica (AEE). La determinación de la actividad SOD se realizó empleando el kit comercial *SOD determination kit* (Sigma), basado en un método colorimétrico. Se prepararon reacciones por triplicado, tanto para blancos como para muestras, y se midió su absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm. Con estos valores se calculó la actividad enzimática de la SOD. Los datos de actividad de ambas enzimas se muestran en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Actividades catalasa y superóxido dismutasa de las distintas cepas analizadas de *X. ampelinus*.

	WT	WT-pHMI	Av23	Av23/pHMI- <i>mntH</i> 1	Av23/pHMI- <i>mntH</i> 2	Av23/pHMI- <i>mntH</i> 3
AEE catalasa (U/mg proteína)	46990,55	84998,01	65415,36	148616,37	265602,58	174802,02
Actividad SOD (U/mg proteína)	33,73	37,36	31,38	28,15	53,25	40,98
Concentración proteína (mg/ml)	3,14	2,80	3,38	3,42	1,78	2,50

El ensayo realizado con las cepas de estudio de *X. ampelinus* muestra una elevada actividad catalasa en los clones de la cepa Av23/pHMI-*mntH* respecto a las demás cepas. La menor actividad de esta enzima corresponde a la cepa silvestre, siendo incluso más baja que en el mutante Av23. Considerando que este mutante resultó ser el más sensible al peróxido de hidrógeno en el ensayo anterior, cabría esperar que la actividad catalasa fuese menor que la cepa WT. Este resultado podría indicar un posible efecto protector del Mn^{+2} frente al peróxido de hidrógeno independiente de la actividad catalasa (Kehres y col., 2000).

La actividad SOD medida en la cepa mutante es algo menor que en la cepa silvestre y que en esta misma cepa conteniendo el vector pHMI. Esta actividad en los clones del mutante complementado con pHMI-*mntH* es variable, siendo en algunos clones mayor y en otros menor que el dato obtenido para la cepa parental. Según lo observado en otras bacterias (Anderson y col., 2009), debería producirse una disminución más acusada en la actividad SOD del mutante avirulento Av23, ya que tiene afectado el gen del transportador MntH, que aporta el cofactor necesario para enzimas de este tipo, como SodA. Se desconoce si las SOD presentes en *X. ampelinus* requieren de Mn^{+2} para su actividad, al igual que SodA, o si es otro catión el que actúa como cofactor. En este caso, la mutación de *mntH* y la actividad SOD podrían no tener relación alguna.



Discusión general

Xylophilus ampelinus es una bacteria fitopatógena que produce la enfermedad conocida como necrosis bacteriana de vid y está considerada como organismo de cuarentena (lista EPPO A2). Esta condición de microorganismo de cuarentena hace que su control sea un objetivo prioritario, existiendo obligatoriedad de declaración de cualquier foco.

El aislamiento de esta bacteria es dificultoso y los estudios existentes son escasos, lo cual ha provocado que en muchos viñedos no se haya podido confirmar su presencia, llegando a confundirse los síntomas con los de otras enfermedades como la excoriosis o siendo atribuidos a otros patógenos como *Erwinia vitivora*. Por ello hay que considerar con cautela los datos de distribución de la enfermedad así como los de su posible erradicación.

La necrosis bacteriana ha causado cuantiosas pérdidas económicas en distintas regiones, tanto a nivel europeo como mundial. La comunidad más afectada por esta enfermedad en España ha sido Aragón, aunque también se ha detectado en otros puntos de la Península. Ante la inexistencia de métodos eficaces para combatir la necrosis bacteriana, los pasos deben dirigirse a profundizar en el conocimiento de su agente causal.

Los escasos estudios sobre *X. ampelinus* a lo largo de todos estos años han estado encaminados principalmente a conseguir el desarrollo de un método rápido y eficaz para la identificación de esta bacteria (Erasmus y col, 1974; Botha y col., 2001; Dreo y col., 2007). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales este microorganismo lleva a cabo su acción patógena.

Este escenario previo propició que los objetivos de este trabajo se centrasen en detectar e identificar posibles factores de patogenicidad asociados a *Xylophilus ampelinus* y su grado de virulencia, aunque sin olvidar la necesaria caracterización a diferentes niveles de esta bacteria.

Los primeros trabajos realizados pretendieron establecer las condiciones de cultivo más adecuadas, así como definir su cinética de crecimiento, constituyendo el punto de partida de los experimentos que se realizaron con posterioridad. Coincidiendo con la información aportada por publicaciones anteriores (Willems y Gillis, 2006), se pudo confirmar que *X. ampelinus* es una bacteria de crecimiento lento, cuya temperatura óptima de cultivo es 24 °C y que forma colonias pigmentadas de color amarillo en medio NA, medio GYCA y medio LPGA.

Uno de los aspectos que más información aportó al estudio de este patógeno fue la caracterización proteómica, a pesar de que varias de las proteínas analizadas (14 proteínas

intracelulares y 14 proteínas extracelulares) no pudieron ser detectadas. La ausencia de datos de secuencia del genoma de esta bacteria dificultó dicha identificación. El análisis del proteoma intracelular mostró una elevada proporción de proteínas implicadas en metabolismo y en transporte celular, constituyendo un tercio del total identificado. De acuerdo con las metas de este trabajo, se puso especial atención en la detección de proteínas posiblemente relacionadas con funciones en defensa celular y virulencia (10% del total), como por ejemplo proteínas encargadas de proteger a las células frente al estrés oxidativo o el estrés térmico, así como proteínas de membrana afectadas en la interacción con la planta. Además, se identificaron otras proteínas, no incluidas en este grupo funcional, cuya actividad está relacionada con factores de virulencia, como el caso del regulador transcripcional PecS, que se encarga de la coordinación de genes implicados en patogénesis (Hommais y col., 2008).

Por otro lado, la mitad de las proteínas extracelulares identificadas tienen funciones regulatorias, de tratamiento del ADN o de interacción con el medio. Sin embargo, no se hallaron proteínas cuyas funciones estén de alguna manera relacionadas con factores de virulencia, a excepción de dos peptidil-prolil isomerasas (Reffuveille y col., 2012). La explicación puede estar en el elevado número de proteínas cuya función biológica es desconocida (21%).

Este estudio proteómico permitió identificar una posible proteína implicada en virulencia hasta el momento no descrita en *X. ampelinus*: la proteína TolB. Para el aislamiento del gen *tolB*, codificante de esta proteína, fue fundamental contar con una librería genómica de *X. ampelinus*. Por un lado, posibilitó la caracterización de *tolB*, gen muy conservado en *X. ampelinus* y en especies próximas filogenéticamente. A partir de la secuencia de nucleótidos de *tolB* se pudo saber que, en *X. ampelinus*, TolB está formada por 439 aminoácidos con una masa molecular teórica de 46,8 kDa, y una estructura tridimensional de aspecto globoso. Además, por otro lado, se localizaron y caracterizaron otros genes adyacentes que podrían estar relacionados de alguna manera con *tolB*. Este es el caso del gen codificante de la proteína Pal, que está ligada física y funcionalmente con TolB (Bouveret y col., 1995).

Sabemos que TolB es una proteína periplásmica que forma parte de un complejo proteico denominado Tol-Pal, fundamental en el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular (Cascales y col., 2002). Sin embargo, se desconoce la función específica del complejo Tol-Pal, y de TolB en particular, aunque son varios los autores que relacionan esta proteína con la virulencia de microorganismos patógenos (Bowe y col., 1998; Dubuisson y col., 2005).

Un método muy utilizado en el estudio de las funciones de los genes es la mutagénesis. Concretamente, la técnica de interrupción génica por doble recombinación fue la elegida para tratar de obtener más información acerca del papel de TolB en *X. ampelinus*. Esta técnica permite generar mutaciones dirigidas en pauta de lectura, minimizando los posibles efectos polares que la mutación puede causar en los genes adyacentes. A través de este método se intentó conseguir mutantes del gen *tolB*, los cuales presentarían una copia deletada del gen en lugar de la original, y que fueron seleccionados en presencia de sacarosa y en ausencia de kanamicina gracias al sistema de selección proporcionado por el plásmido *pk18mobsacB*, utilizado para generar la delección de *tolB* en el genoma de *X. ampelinus*.

Los supuestos mutantes obtenidos, una vez analizados por diferentes técnicas, resultaron ser portadores de la copia original del gen *tolB*. Por lo tanto, no se obtuvieron mutantes por doble recombinación o éstos no eran viables. Este resultado no resulta extraño considerando que, según algunos trabajos llevados a cabo en otras especies bacterianas (Dubuisson y col., 2005; Yeh y col., 2010), el complejo Tol-Pal es esencial para la viabilidad de la célula, de tal forma que los efectos de las mutaciones en alguno de sus componentes resultan letales para el microorganismo. No obstante, en un trabajo de Bowe y col. (1998), a través de la técnica de mutación al azar mediante inserción de transposón, consiguieron un mutante de *Salmonella typhimurium* con el gen *tolB* afectado, que presentaba atenuación de su virulencia. Este resultado mostraría una posible vía hacia la obtención de mutantes de *tolB* mediante técnicas que requieren menos manipulación del microorganismo, aunque presenta el inconveniente de no poder dirigir la mutación hacia el gen de interés.

Existe una gran limitación en cuanto al desarrollo de técnicas eficaces para la modificación genética de *X. ampelinus*, no sólo por la escasez de estudios previos al respecto, sino también porque este tipo de manipulaciones suelen afectar a la viabilidad de este microorganismo.

La puesta a punto de la técnica de mutagénesis mediante la introducción en la célula de un transposoma comercial (Goryshin y col., 2000) ha permitido obtener un sistema útil para el aislamiento de cepas mutantes estables de *X. ampelinus* con una eficiencia de transformación elevada.

Asimismo, se ha desarrollado un método sencillo, rápido y fiable para la evaluación de la virulencia, basado en la inoculación de hojas de vid de plantas desarrolladas *in vitro*. Los daños producidos por las cepas virulentas son visibles después de 10 días desde la infección, y se caracterizan normalmente por necrosis y decoloración en las zonas marginales de la hoja. La

cuantificación de la necrosis foliar provocada por el patógeno se pudo realizar con éxito a través del ensayo *electrolyte leakage assay*, consistente en la medida de la conductividad de una solución acuosa resultante de la incubación de fragmentos de hojas (Ottman y col. 2009).

El análisis de los mutantes hipervirulentos y avirulentos, obtenidos mediante inserción del transposón, permitió identificar los genes afectados y establecer su posible relación con la virulencia de *X. ampelinus*. Por un lado, la inserción del transposón en la posible región promotora de un gen que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR dio lugar a un mutante hipervirulento (Hv3). Esta familia de proteínas controlan diversos genes, entre ellos los que regulan la virulencia en bacterias patógenas (Maddocks y Oyston, 2008). El hecho de que la interrupción de este gen origine un aumento de la virulencia hace pensar en el posible papel de este regulador como represor de alguna ruta relacionada con el proceso de patogénesis. Otro mutante hipervirulento (Hv32) presentaba interrumpido un gen codificante de la proteína de repetición YD, un dipéptido muy conservado formado por repeticiones en tándem de tirosina-aspartico y que forma parte de las proteínas de la familia Rhs (Kung y col., 2012). Las proteínas de repetición YD tienen un importante papel en las interacciones de la bacteria con las células eucariotas del hospedador, además de funciones de inhibición del crecimiento en el contacto célula-célula, característica común en esta familia de proteínas (Koskiniemi y col., 2013). La inserción del transposón en el gen codificante de esta proteína podría, por tanto, traducirse en una pérdida de su función inhibidora del crecimiento, aumentando su capacidad de invasión del hospedador. Sin embargo, la inactivación de la tirosina fosfatasa produce un fenotipo avirulento (mutante Av16). Se sabe que esta enzima está implicada en virulencia (Alfano y Collmer, 2004), aunque se desconoce su función exacta.

El mutante que mostró menor virulencia, de entre los ensayados en hojas de vid de plantas desarrolladas *in vitro*, fue el mutante avirulento Av23, el cual presentaba interrumpido el gen *mntH*, codificante de la proteína transportadora de Mn^{+2} MntH. Esta proteína se localiza en la membrana citoplasmática de diversas bacterias y es homóloga de la familia de proteínas de eucariotas NRAMP, que transportan Fe^{+2} y Mn^{+2} principalmente (Kehres y col., 2000). La adquisición de Mn^{+2} resulta necesaria para el crecimiento bacteriano y el mantenimiento de la homeostasis celular de este catión, además de tener un papel fundamental en virulencia y ser un importante cofactor en una gran variedad de enzimas, algunas de ellas protectoras contra el estrés oxidativo como la catalasa y la superóxido dismutasa.

Los resultados de este trabajo han confirmado que el gen *mntH* de *X. ampelinus* codifica la proteína MntH. Según los estudios de homología realizados, es una proteína muy

conservada, característica común en las proteínas de la familia NRAMP. Además, se ha comprobado que la interrupción del gen *mntH* produce una disminución en la capacidad de acumulación de Mn^{+2} intracelular frente a otros cationes divalentes, lo que demuestra que MntH es un transportador de Mn^{+2} en *X. ampelinus*.

Diversas publicaciones han puesto de manifiesto la importancia del gen *mntH* y del Mn^{+2} en la virulencia de patógenos de células animales (Zaharik y col., 2004; Papp-Wallace y Maguire, 2006; Anderson y col., 2009; Champion y col., 2011; Perry y col., 2012), pero también de fitopatógenos (Li y col., 2011). En *X. ampelinus* se ha podido demostrar que la interrupción del gen *mntH* produce una acusada disminución en su virulencia, la cual recupera niveles de la cepa silvestre cuando se introduce una copia del gen *mntH* en la cepa mutante mediante el vector plasmídico pHMI. Se confirma así, por tanto, el relevante papel del Mn^{+2} en la virulencia de *X. ampelinus*.

El ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno permitió corroborar en *X. ampelinus* lo que ya se había observado en otras especies, que la mutación del gen *mntH* implica una disminución en la tolerancia a las especies reactivas del oxígeno generadas por el hospedador en respuesta a la infección (Kehres y col., 2000; Champion y col., 2011). El mutante Av23 mostró una acusada disminución de su viabilidad frente a la cepa silvestre tras su exposición al H_2O_2 , mientras que la introducción del gen *mntH* en el mutante aumentó su tolerancia a este compuesto. Varios autores mantienen que el peróxido de hidrógeno induce la expresión del gen *mntH* a través de la proteína reguladora OxyR (Runyen-Janecky y col., 2006; Anjem y col., 2009; Perry y col., 2012). Se ha sugerido desde hace tiempo (Kehres y col., 2000; Runyen-Janecky y col., 2006) el papel protector del Mn^{+2} frente al peróxido de hidrógeno. En los últimos años se ha puesto en duda esta capacidad detoxificadora del Mn^{+2} sobre las especies que producen estrés oxidativo. Según los estudios de Anjem y col. (2009), se necesitarían unos elevados niveles intracelulares de Mn^{+2} para llevar a cabo una detoxificación biológicamente significativa de especies reactivas del oxígeno por parte de este metal. El Mn^{+2} actúa como cofactor de la catalasa y de la superóxido dismutasa (SodA), enzimas protectoras frente al peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, respectivamente. Sin embargo, las actividades de estas enzimas no se vieron afectadas en el mutante Av23, lo cual indica, por un lado, que no dependen de la funcionalidad del gen *mntH* para su actividad en *X. ampelinus* y, por otro, que no están relacionadas con el aumento de la sensibilidad al H_2O_2 que mostró el mutante. El Mn^{+2} parece tener, por tanto, una función protectora indirecta del peróxido de hidrógeno, no dependiente de la actividad enzimática de la catalasa y de la superóxido dismutasa.

Además de la activación transcripcional dependiente de peróxido de hidrógeno mediada por la proteína OxyR, la expresión del gen *mntH* está regulada en algunas especies por la proteína MntR (Que y Helmann, 2000; Kehres y col., 2002). Esta proteína es un represor transcripcional del gen *mntH* en presencia de Mn^{+2} . El análisis de la región genómica de *X. ampelinus* en la que se localiza *mntH* permitió localizar el gen *mntR*, codificante de la proteína MntR. La presencia de este gen y de una hipotética zona de unión de la proteína MntR revela una probable regulación de *mntH* a través de MntR en *X. ampelinus*.

- **Perspectivas futuras**

El estudio de los factores de patogenicidad de *X. ampelinus* y su influencia en las variables celulares ofrece una amplia diversidad de aspectos sobre los que profundizar. Este trabajo ha centrado su atención en algunos de ellos, contribuyendo a mejorar el conocimiento general sobre esta bacteria, proponiendo herramientas y mostrando caminos sobre los que seguir. Las particulares características de *X. ampelinus* y sus componentes celulares han limitado las aspiraciones de algunos de los estudios realizados. No obstante, esto plantea nuevos retos a la hora de abordar futuras investigaciones sobre el complejo entramado de mecanismos que se ponen en marcha cuando tiene lugar la interacción patógeno-hospedador.

En este trabajo se ha localizado e identificado la proteína de membrana TolB. Sin embargo, el papel que tiene en la célula y los mecanismos a través de los cuáles afecta a la virulencia siguen siendo desconocidos. Del complejo que forma TolB con otras proteínas de membrana, sólo se ha identificado la proteína Pal, aunque es probable que alguno de los otros componentes proteicos también esté presente, así como sus posibles reguladores. Es el caso de las proteínas TolQ, TolR y TolA, necesarias para la infección por parte de diversos patógenos. Lograr técnicas que resulten efectivas para la delección de los genes codificantes de estas proteínas no sólo permitiría acercarse al conocimiento de sus funciones, sino también conseguir posibles cepas mutantes no dañinas para la planta.

El papel de la proteína MntH en el transporte de Mn^{+2} y su implicación en la virulencia de *X. ampelinus* ha quedado confirmado a la vista de los resultados obtenidos. Los mecanismos a través de los cuales el Mn^{+2} afecta a la intensidad de la virulencia constituyen un desconocido aspecto a abordar, que podría dar a paso a interesantes averiguaciones sobre posibles rutas e interacciones en las que podría tener un rol relevante. Las evidencias de una altamente probable regulación de MntH por parte de MntR llevan a plantearse si la proteína

reguladora OxyR podría actuar como activador de la expresión de MntH en *X. ampelinus*, tal y como sucede en otras especies bacterianas.

La finalidad del estudio de esta bacteria fitopatógena ha sido profundizar en el conocimiento de los factores de patogenicidad y los mecanismos de su virulencia, para en un futuro poder desarrollar alguna estrategia de control a fin de minimizar los daños que produce en la vid, por lo que resultaría fundamental que se siguiese trabajando en esta dirección.



Conclusiones

1. *Xylophilus ampelinus* puede ser transformada eficazmente mediante electroporación.
2. El análisis del proteoma intracelular de *X. ampelinus* en las condiciones ensayadas se ha revelado como una estrategia eficaz para la detección de proteínas implicadas en defensa celular y virulencia.
3. La introducción por electroporación en *X. ampelinus* de un transposoma es un método eficiente para la obtención de mutantes.
4. Se ha puesto a punto un método de inoculación de hojas de vid de plantas desarrolladas *in vitro* que permite evaluar la virulencia de distintos aislados de forma sencilla, rápida y fiable.
5. La interrupción del gen *mntH* en el mutante avirulento Av23 provoca una notable reducción de la capacidad para acumular Mn^{+2} en el interior celular, por lo que dicha proteína constituye el transportador mayoritario para la captación de Mn^{+2} .
6. La interrupción del gen *mntH* ocasiona una notable disminución de la virulencia de *X. ampelinus*, lo que implica que la proteína codificada es un factor de patogenicidad.
7. La interrupción del gen produce un aumento de la sensibilidad al peróxido de hidrógeno en *X. ampelinus*.
8. Las actividades enzimáticas catalasa y superóxido dismutasa no se ven afectadas cuando el gen *mntH* está inactivado.



Bibliografía

A

- Abergel, C., Bouveret, E., Claverie, J.M., Brown, K., Rigal, A., Lazdunski, C., Bénédicti, H.** (1999). Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure* 7(10): 1291-1300.
- Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Alfano, J.R. y Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 385-414.
- Alonso-Hearn, M., Eckstein, T.M., Sommer, S., Bermudez, L.E.** (2010). A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun.* 16(4): 235-247.
- Anderson, E.S., Paulley, J.T., Gaines, J.M., Valderas, M.W., Martin, D.W., Menscher, E., Brown, T.D., Burns, C.S., Roop, R.M. II.** (2009). The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for *Brucella abortus* 2308 in experimentally infected mice. *Infect. Immun.* 77: 3466-3474.
- Anjem, A., Varghese, S., Imlay, J.A.** (2009). Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 72: 844-858.

B

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2nd edition. (2005).
- Battle, A., Laviña, A., Kuszala, C., Clair, D., Larrue, J., Boudon-Padieu, E.** (1997). Detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine in northern Spain. *Vitis* 36(4): 211-212.
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S., Lloubès, R.** (1998). *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 180: 4872-4878.
- Birnboim, H.C. y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513-1523.
- Bodero, M.D., Pilonieta, M.C., Munson, G.P.** (2007). Repression of the inner membrane lipoprotein NlpA by Rns in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189: 1627-1632.
- Botha, W.J., Serfontein, S., Greyling, M.M., Berger, D.K.** (2001). Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 50(4): 515-526.
- Bouveret, E., Derouiche, R., Rigal, A., Lloubès, R., Lazdunski, C., Benedetti, H.** (1995). Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 11071-11077.

Bouveret, E., Rigal, A., Lazdunski, C., Benedetti, H. (1998). Distinct regions of the colicin A translocation domain are involved in the interaction with TolA and TolB proteins upon import into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27: 143-157.

Bowe, F., Lipps, C.J., Tsolis, R.M., Groisman, E., Heffron, F., Kusters, J.G. (1998). At least four percent of *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect. Immun.* 66: 3372-3377.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Breidenstein, E.B.M., Janot, L., Strehmel, J., Fernandez, L., Taylor, P.K., Kukavica-Ibrulj, I., Gellatly, S.L., Levesque, R.C., Overhage, J., Hancock, R.E. (2012). The Lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 7(11): e49123.

Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B.E., Karlin, S. (1992). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *PNAS* 89: 2002-2006.

Byng, G.S., Johnson, J.L., Whitaker, R.J., Gherna, R.L., Jensen, R.A. (1983). The evolutionary pattern of aromatic amino acid biosynthesis and the emerging phylogeny of pseudomonad bacteria. *J. Mol. Evol.* 19: 272-282.

C

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333.

Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, J., Lazzaroni, J.C., Lloubes, R. (2002). Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J. Bacteriol.* 184: 754-759.

Champion, O.L., Karlyshev, A., Cooper, I.A.M., Ford, D.C., Wren, B.W., Duffield, M., Oyston, P.C.F., Titball, R.W. (2011). *Yersinia pseudotuberculosis* *mntH* functions in intracellular manganese accumulation, which is essential for virulence and survival in cells expressing functional Nramp1. *Microbiology* 157: 1115-1122.

Chatterjee, S., Almeida, R.P.P., Lindow, S. (2008). Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella Fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 243-71.

Clarke, L. y Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic *Col El* hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9(1): 91-92.

Clavel, T., Germon, P., Vianney, A., Portalier, R., Lazzaroni, J.C. (1998). TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol. Microbiol.* 29: 359-367.

Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., Cellier, M.F.M. (2004). Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *J. Biol. Chem.* 279(5): 3318-3326.

D

- Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugarret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B., Dubordieu, D.** (2001). Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis* 40: 93-99.
- De Vos, P. y De Ley, J.** (1983). Intra and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 487-509.
- Dreo, T., Seljak, G., Janse, J.D., van der Beld, I., Tjou-Tam-Sin, L., Gorkink-Smits, P., Ravnikar, M.** (2005). First laboratory confirmation of *Xylophilus ampelinus* in Slovenia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 149-155.
- Dreo, T., Gruden, K., Manceau, C., Janse, J.D., Ravnikar, M.** (2007). Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathol.* 56: 9-16.
- Do Amaral, A.M., Toledo, C.P., Baptista, J.C., Machado, M.A.** (2005). Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. *Fitopatologia Brasileira* 30: 292-294.
- Dubuisson, J.F., Vianney, A., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lazzaroni, J.C.** (2005). Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology* 151: 3337-3347.

E

- EPPO/CABI.** (1997). *Xylophilus ampelinus*. In: *Quarentine Pest for Europe*, 2nd edition. pp. 1162-1165. CAB International, Wallingford (GB).
- EPPO.** *Xylophilus ampelinus*. (2009). *OEPP/EPPO Bulletin* 39: 403-412.
- Erasmus, H.D., Mathee, F.N., Louw, H.A.** (1974). A comparison between plant pathogenic species of *Pseudomonas* and *Erwinia* with special reference to the bacterium responsible for bacterial blight of wines. *Phytophilactica* 6: 11-18.
- Escobar, M.A. y Dandekar, A.M.** (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. Review. *TRENDS in Plant Science* 8(8): 380-386.

F

- Feinberg, A.P. y Volgestein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1): 6-13.
- Fernández-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carbú, M., Camafeita, E., López, J.A., Cantoral, J.M., Jorrín, J.** (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* 6: S88-S96.

Figurski, D.H. y Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76(4): 1648-1652.

Fortney, K.R., Young, R.S., Bauer, M.E., Katz, B.P., Hood, A.F., Munsson, R.S. Jr, Spinola, S.M. (2000). Expression of peptidoglycan-associated lipoprotein is required for virulence in the human model of *Haemophilus ducreyi* infection. *Infect. Immun.* 68: 6441-6448.

Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A, Olsen, G.J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(8): 2461-2470.

G

Gaspar, J.A., Thomas, J.A., Marolda, C.L., Valvano, M.A. (2000). Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol. Microbiol.* 38: 262-275.

Gerding, M.A., Ogata, Y., Pecora, N.D., Niki, H., de Boer, P.A. (2007). The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 63: 1008-1025.

Godlewska, R., Wisniewska, K., Pietras, Z., Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2009). Peptidoglycan – associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol. Lett.* 298: 1-11.

Goryshin, I.Y., Jendrisak, J., Hoffman, L.M., Meis, R., Reznikoff, W.S. (2000). Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat. Biotechnol.* 18: 97-100.

Grall, S. y Manceau, C. (2003). Colonization of *Vitis vinifera* by a green fluorescence protein-labeled, *gfp*-marked strain of *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis of grapevine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4): 1904-1912.

Grall, S., Roulland, C., Guillaumès, J., Manceau, C. (2005). Bleeding sap and old wood are the two main sources of contamination of merging organs of vine plants by *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12): 8292-8300.

Grasso, S., Moller, W.J., Refatti, E., Magnano Di San Lio, G., Granata, G. (1979). The bacterium *Xanthomonas ampelina* as causal agent of a grape decline in Sicily. *Rivista di Patologia Vegetale*. Series IV 15: 91-106.

H

Han, J.I., Choi, H.K., Lee, S.W., Orwin, P.M., Kim, J., Laroe, S.L., Kim, T.G., O'Neil, J., Leadbetter, J.R., Lee, S.Y., Hur, C.G., Spain, J.C., Ovchinnikova, G., Goodwin, L., Han, C. (2011). Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *J. Bacteriol.* 193(5): 1183-1190.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557-580.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli* DNA cloning: a practical approach. Ed. Glover, D.M. IRL Press. Oxford. 109-135.
- Heilpern, A.J. y Waldor, M.K.** (2000). CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the tolQRA gene products. *J. Bacteriol.* 182: 1739-1747.
- Hellman, J., Roberts, J.D. Jr, Tehan, M.M., Allaire, J.E., Warren, H.S.** (2002). Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein is released into the bloodstream in gram-negative sepsis and causes inflammation and death in mice. *J. Biol. Chem.* 277: 14274-14280.
- Héritier, J.** (1983). La nécrose bactérienne dans l'Aude. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales* 106: 50-56.
- Hohle, T.H. y O'Brian, M.R.** (2009). The *mntH* gene encodes the major Mn²⁺ transporter in *Bradyrhizobium japonicum* and is regulated by manganese via the Fur protein. *Mol. Microbiol.* 72: 399-409.
- Holmes, D.S. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* 114(1): 193-197.
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligor, S., Expert, D., Nasser, W., Reverchon, S.** (2008). PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 190: 7508-7522.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrepf, H.** (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Innes Foundation. Norwich.

I

- Ikeda, J., Janakiraman, A., Kehres, D.G., Maguire, M.E., Slauch, J.M.** (2005). Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar typhimurium by MntR and Fur. *J. Bacteriol.* 187: 912-922.
- Innes, R.W., Hirose, M.A., Kuempel, P.L.** (1988). Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J. Bacteriol.* 170: 3793-3802.

J

- Jackson, R.S.** (2008). Fermentation: Biochemistry of alcoholic fermentation. In: *Wine Science: Principles and applications*. Academic Press. London.
- Jami, M.S., García-Estrada, C., Barreiro, C., Cuadrado, A.A., Salehi-Najafabadi, Z., Martín, J.F.** (2010). The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting

strain to a versatile cell factory for White biotechnology. *Molecular & Cellular Proteomics* 9: 2729-2744.

K

Kamoun, S. y Kado, C.I. (1990). A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J. Bacteriol.* 172: 5165-5172.

Kehres, D.G., Zaharik, M.L., Finlay, B.B., Maguire, M.E. (2000). The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* 36: 1085-1100.

Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M., Maguire, M.E. (2002). Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *mntH* transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *J. Bacteriol.* 184: 3151-3158.

Koskiniemi, S., Lamoreux, J.G., Nikolakakis, K.C., t'Kint de Roodenbeke, C., Kaplan, M.D., Hayes, C.S. (2013) Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *PNAS* 110: 7032-7037.

Kung, V.L., Khare, S., Stehlik, C., Bacon, E.M., Hughes, A.J., Hauser, A.R. (2012). An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *PNAS* 109: 1275-1280.

L

Lazzaroni, J.C., Germon, P., Ray, M.C., Vianney, A. (1999). The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 191-197.

Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Lee, G.B., Hahn, J.H. (2004). Insertional transposon mutagenesis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KXO85 by electroporation. *Plant Pathol. J.* 20(3): 229-233.

Letain, T.E. y Postle, K. (1997). TonB protein appears to transducer energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 24: 271-283.

Li, Y. y Schellhorn, H.E. (2007). Rapid kinetic microassay for catalase activity. *J. Biomol. Tech.* 18(4): 185-187.

Li, C., Tao, J., Mao, D., He, C. (2011). A novel manganese efflux system, YebN, is required for virulence by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS ONE* 6(7): e21983.

Llamas, M.A., Ramos, J.L., Rodriguez-Herva, J.J. (2000). Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J. Bacteriol.* 182: 4764-4772.

- Llamas, M.A., Rodríguez-Herva, J.J., Hancock, R.E., Bitter, W., Tommassen, J., Ramos, J.L. (2003). Role of *Pseudomonas putida* tol-oprL gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 185: 4707-4716.
- Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., Journet, L. (2001). The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res. Microbiol.* 152: 523-529.
- López, M.M. (2004). Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*). En: *Los parásitos de la vid: Estrategias de protección razonada*. 5ª edición. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 218-219.
- López, M.M. (2004). Necrosis bacteriana (*Xylophilus ampelinus* Panagopoulos). En: *Los parásitos de la vid: Estrategias de protección razonada*. 5ª edición. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 209-214.
- López, M.M. (2004). Tuberculosis de la vid (*Agrobacterium tumefaciens* Smith y Townsend Conn). En: *Los parásitos de la vid: Estrategias de protección razonada*. 5ª edición. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 215-217.
- López, M.M., Gracia, M., Sampayo, M. (1980). Studies on *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos in Spain. Proc. 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Patras. 56-57.
- López, M.M., Gracia, M., Sampayo, M. (1987). Current status of *Xanthomonas ampelina* in Spain and susceptibility of Spanish cultivars to bacterial necrosis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 17: 231-236.
- López, M.M., Sampayo, M., Cambra, M., Salcedo, C. (1978). Detección en España de *Xanthomonas ampelina*, causante de la necrosis bacteriana de la viña. III Jornadas del Grupo de Fitopatología de la Sociedad Española de Microbiología, SEM. Valencia. 24.

M

- Maddocks, S.E. y Oyston, P.C.F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154: 3609-3623.
- Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P., Cellier, M.F.M. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* 35: 1065-1078.
- Manceau, C. (2006). Bacterial necrosis of grapevine: Biology of *Xylophilus ampelinus* and development of disease control strategies. Grapevine Crown Gall. Bologna.
- Manceau, C., Grall, S., Brin, C., Guillaumes, J. (2005). Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and Microwell plate detection system. *OEPP/EPPO Bulletin* 35: 55-60.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York.

Marcelin, H. y Novoa, D. (1983). Essais de l'action du cuivre. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales* 106: 85-88.

Marchetti, R., Guerzoni, E., Gentile, M. (1984). Research on the etiology of a new disease of grapes: sour rot. *Vitis* 23: 55-65.

Mathee, F.N., Heyns, A.J., Erasmus, H.D. (1970). Present position of bacterial blight (Vlamsiekte) in South Africa. *Deciduous Fruit Grower* 20: 81-84.

McGaha, L.A., Jackson, B., Bextine, B., McCullough, D., Morano, L. (2007). Potential Plant Reservoirs for *Xylella fastidiosa* in South Texas. *Am. J. Enol. Vitic.* 58: 3.

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York. 352-355.

Mullis, B. y Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

N

Neckers, L. y Tatu, U. (2008). Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe.* 4(6): 519-527.

O

Oscarsson, J., Karched, M., Thay, B., Chen, C., Asikainen, S. (2008). Proinflammatory effect in whole blood by free soluble bacterial components released from planktonic and biofilm cells. *BMC Microbiology* 8.

Ottmann, C., Luberacki, B., Kufner, I., Koch, W., Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H.U., Nürnberger, T., Oecking, C. (2009). A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(25): 10359-10364.

P

Panagopoulos, C.G. (1969). The disease "Tsilik marasi" of grapevine: its description and identification of the causal agent (*Xanthomonas ampelina* sp. nov.). *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki* (New Series) 9: 59-81.

Papp-Wallace, K.M. y Maguire, M.E. (2006). Manganese transport and the role of manganese in virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 187-209.

Patzer, S.I. y Hantke, K. (2001). Dual repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn²⁺ transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 4806-4813.

Perry, R.D., Craig, S.K., Abney, J., Bobrov, A.G., Kirilina, O., Mier, I.Jr., Truszczynska, H., Fetherston, J.D. (2012). Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbiology* 158: 804-815.

Prunier, J.P., Ridé, M., Lafon, R., Bulit, J. (1970). La nécrose bactérienne de la vigne. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 56: 975-982.

Q

Que, Q. y Helmann, J.D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* 35: 1454-1468.

R

Rathore, H.S. y Kahn, A.A. (2001). Fungicide and herbicide residue in water. In: *Handbook of water analysis*. CRC Press. New York.

Ravaz, L. (1895). La maladie d'Oléron. *Annales de l'École Nationale d'Agriculture, Montpellier* 9: 299-317.

Reffuveille, F., Connil, N., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Chevalier, S., Auffray, Y., Rince, A. (2012). Involvement of peptidylprolyl cis/trans isomerases in *Enterococcus faecalis* virulence. *Infect. Immun.* 80(5): 1728-1735.

Ridé, M., Ridé, S., Novoa, D. (1983). Connaissances actuelles sur la nécrose bactérienne de la vigne. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales* 106: 10-45.

Riechmann, L. y Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* 90: 351-360.

Rigal, A., Bouveret, E., Lloubès, R., Lazdunski, C., Benedetti, H. (1997). The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 7274-7279.

Runyen-Janecky, L., Dzenski, E., Hawkins, S., Warner, L. (2006). Role and regulation of the *Shigella flexneri* Sit and MntH systems. *Infect. Immun.* 74: 4666-4672.

S

Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 145: 69-73.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.

Serfontein, S., Serfontein, J.J., Botha, W.J., Staphorst, J.L. (1997). The isolation and characterization of *Xylophilus ampelinus*. *Vitis* 36(4): 209-210.

Shapiro A.L., Viñuela, E., Maizel Jr., J.V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28(5): 815-820.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3): 503-517.

Steffek, R., Reisenzein, H., Zeisner, N. (2007). Analysis of the pest risk from Grapevine flavescence dorée phytoplasma to Austrian viticulture. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37: 191-203.

Starr, M.P., Jenkins, C.L., Bussey, L.B., Andrewes, A.G. (1977). Chemotaxonomic significance of xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch. Microbiol.* 113: 1-9.

Studier, F.W. y Moffat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189(1): 113-130.

Sturgis, J.N. (2001). Organization and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 113-122.

T

Tartof, K.D. y Hobbs, C.A. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus.* 9: 12.

Tautz, D. y Renz, M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* 132(1): 14-19.

Toledo, J. (2004). Podredumbre ácida del racimo. En: *Los parásitos de la vid: Estrategias de protección razonada*. 5ª edición. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 220-222.

Toledo, J. y Albujer, E. (1984). Podredumbre ácida del racimo. *Rev Viña y Vino* 20: 11-13.

Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Van Melderen, L. (2006). Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Microbiology* 157: 701-713.

Tung, W.L. y Chow, K.C. (1995). A modified médium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* 11(4): 128-129.

Tzafira, T. y Citovsky, V. (2003). The *Agrobacterium*-plant cell interaction. Taking biology lessons from a bug. *Plant Physiology* 133: 943-947.

V

Varela, L.G., Smith, R.J., Philips, P.A. (2001). Pierce's disease. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publ. 21600.

Vines, E.D., Marolda, C.L., Balachandran, A., Valvano, M.A. (2005). Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress. *J. Bacteriol.* 187: 3359-3368.

Visser, M., Stephan, D., Jaynes, J.M, Burger, J.T. (2012). A transient expression assay for the *in planta* efficacy screening of an antimicrobial peptide against grapevine bacterial pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 54: 543-551.

W

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.

Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., Sly, L. (1999). Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 567-576.

Whitaker, R.J., Byng, G.S., Gherna, R.L., Jensen, R.A. (1981). Comparative allostery of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase as an indicator of taxonomic relatedness in pseudomonad genera. *J. Bacteriol.* 145: 752-759.

Willems, A. y Gillis, M. (2006). *Xylophilus*. *Prokaryotes* 6: 741-745.

Willems, A., Gillis, M., Kersters, K., Van den Broecke, L., De Ley, J. (1987a). The taxonomic position of *Xanthomonas ampelina*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 17: 237-240.

Willems, A., Gillis, M., Kersters, K., Van den Broecke, L., De Ley, J. (1987b). Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(4): 422-430.

Y

Yeh, Y., Comolli, L.R., Downing, K.H., Shapiro, L., McAdams, H.H. (2010). The *Caulobacter* Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and positioning of a polar localization factor. *J. Bacteriol.* 192(19): 4847-4858.

Z

Zaharik, M.L., Cullen, V.L., Fung, A.M., Libby, S.J., Choy, S.L.K., Coburn, B., Kehres, D.G., Maguire, M.E., Fang, F.C., Finlay, B.B. (2004). The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an *Nramp1*^{G169} murine typhoid model. (2004). *Infect. Immun.* 72: 5522-5525.