

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*, patógeno modelo en el estudio de interacciones bacterianas con plantas leñosas

Cayo Ramos (Área de Genética, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, 29071-Málaga, crr@uma.es)

Enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* y patógenos relacionados en árboles frutales y otras plantas leñosas

Las bacterias gram-negativas pertenecientes al complejo formado por *Pseudomonas syringae* y especies relacionadas, como *Pseudomonas savastanoi* y *Pseudomonas amygdali*, constituyen un grupo de patógenos de plantas de gran importancia económica y agrícola. Aunque la taxonomía de este complejo bacteriano es actualmente confusa y no está completamente resuelta, resultados de hibridaciones ADN-ADN han establecido la división del complejo en 9 genomoespecies, en las que se incluyen al menos 10 especies diferentes de *Pseudomonas* y 60 patovares (pv.) de *P. syringae* que difieren en su rango de hospedador (GARDAN *et al.*, 1999), la mitad de los cuales aproximadamente, infectan árboles frutales u otras plantas leñosas o arbustos (Tabla 1).

P. syringae y sus parientes cercanos causan enfermedades en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas herbáceas y leñosas, utilizando para ello una ingente variedad de factores de virulencia responsables de la aparición de los síntomas característicos de cada enfermedad, tales como toxinas, fitohormonas y proteínas efectoras secretadas a través del sistema de secreción tipo III (T3SS). Durante los últimos años, la sistemática, ecología, genética, biología molecular y genómica del complejo *P. syringae* han sido revisadas y discutidas por una gran cantidad de autores, sin embargo, la mayoría de los esfuerzos en la investigación de este grupo de bacterias se han centrado en las enfermedades causadas en plantas herbáceas, quedando muy atrás la comprensión y capacidad de controlar las enfermedades causadas por *Pseudomonas* en árboles frutales y arbustos. Además de las elevadas pérdidas económicas que ocasionan y su complejo control, las enfermedades bacterianas de frutales suponen una enorme preocupación para los viveros de todas las regiones productoras del mundo, debido fundamentalmente a que las infecciones sistémicas conllevan con frecuencia la muerte de árboles jóvenes y patrones utilizados para injertos.

Sin lugar a duda, los avances en el entendimiento de las enfermedades causadas por el complejo *P. syringae* en plantas herbáceas, incluyendo la planta modelo *Arabidopsis*, resultan relevantes para nuestra comprensión de las enfermedades de árboles frutales, y viceversa. El establecimiento de sistemas modelos para el estudio sistemático de la interacción de una bacteria patógena con un frutal, así como su comparación con los modelos ampliamente utilizados de interacciones con herbáceas, aportaría datos novedosos y relevantes en el entendimiento de otras interacciones de bacterias patógenas con plantas

Especie y patovar ^a	Hospedador	
	Especie	Nombre Común
Genomoespecie 1		
<i>P. s. pv. aceris</i>	<i>Acer sp.</i>	Arce
<i>P. s. pv. dysoxylis</i>	<i>Dysoxylum spectabile</i>	Kohekohe
<i>P. s. pv. papulans</i>	<i>Malus sylvestris</i>	Manzano silvestre
Genomoespecie 2		
<i>P. s. pv. aesculi</i>	<i>Aesculus indica</i>	Castaño de Indias
<i>P. s. pv. ciccaroniei</i>	<i>Ceratonia siliqua</i>	Algarrobo
<i>P. s. pv. dendropanacis</i>	<i>Dendropanax trifidus</i>	Dendropanax
<i>P. s. pv. eriobotryae</i>	<i>Eriobotrya japonica</i>	Nispero
<i>P. s. pv. hibisci</i>	<i>Hibiscus japonica</i>	Hibisco
<i>P. s. pv. mori</i>	<i>Morus alba</i>	Morera
<i>P. s. pv. morsprunorum</i>	<i>Prunus domestica</i>	Ciruelo
	<i>Prunus cerasus</i>	Guindo
<i>P. s. pv. myricae</i>	<i>Myrica rubra</i>	Yangmei
<i>P. s. pv. photiniae</i>	<i>Photinia glabra</i>	Photinia
<i>P. s. pv. ulmi</i>	<i>Ulmus sp.</i>	Olmo
<i>P. amygdali</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	Almendo
<i>P. ficuserectae</i>	<i>Ficus erecta</i>	Ficus
<i>P. meliae</i>	<i>Melia azedarach</i>	Árbol del paraíso
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	Fresno
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>	<i>Nerium oleander</i>	Adelfa
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>Olea europaea</i>	Olivo
Genomoespecie 3		
<i>P. s. pv. passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Maracuyá
<i>P. s. pv. persicae</i>	<i>Prunus persicae</i>	Melocotonero
<i>P. s. pv. philadelphii</i>	<i>Philadelphus coronarius</i>	Celinda
<i>P. s. pv. ribicola</i>	<i>Ribes aureum</i>	Golden currant
<i>P. s. pv. viburni</i>	<i>Viburnum sp.</i>	Viburnum
Genomoespecie 4		
<i>P. s. pv. garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Planta del café
Genomoespecie 5		
<i>P. s. pv. tremae</i>	<i>Trema orientalis</i>	Trema
Genomoespecie 8		
<i>P. s. pv. actinidae</i>	<i>Actinidia chinensis</i>	Kiwi
<i>P. avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i>	Avellano
<i>P. s. pv. theae</i>	<i>Thea sinensis</i>	Árbol del té

^aP. s., *Pseudomonas syringae*; pv., patovar

Tabla 1. Clasificación en genomoespecies de bacterias patógenas de plantas leñosas pertenecientes al complejo *Pseudomonas syringae*.

leñosas y frutales, así como permitiría abordar cuestiones aún sin resolver, tales como los genes requeridos por *P. syringae* y patógenos relacionados para infectar y sobrevivir en tejidos leñosos, el papel del T3SS y sus efectores en este tipo de interacciones, las posibles diferencias en el papel de las toxinas entre enfermedades de plantas leñosas y herbáceas, los aspectos evolutivos de la adaptación a hospedadores leñosos, los mecanismos implicados en la inducción de síntomas característicos de plantas leñosas (excrecencias y tumores en troncos y ramas, entre otros) o la aplicación y explotación de los mecanismos

de resistencia a patógenos descritos en plantas herbáceas a árboles frutales (Kennelly et al., 2007). En los apartados siguientes, se resumen los resultados obtenidos y perspectivas derivadas de la utilización del sistema *P. savastanoi* pv. *savastanoi*-olivo como modelo de interacción bacteriana con un huésped leñoso.

El cultivo *in vitro* de olivo como sistema modelo en el estudio de la tuberculosis

Los síntomas característicos de la tuberculosis del olivo, causada por *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, consisten en la formación de tumores, conocidos comúnmente como verrugas, en troncos, ramas, brotes y, con menor frecuencia e intensidad, en las hojas, raíces y frutos de las plantas infectadas. La forma de los tumores es generalmente redondeada, y su tamaño puede variar desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros de diámetro (Figura 1). La tuberculosis afecta a todas las regiones donde se cultiva el olivo, encontrándose diseminada por más de 35 países distribuidos por los 5 continentes. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad son difíciles de estimar, debido a los numerosos factores que influyen en la gravedad de los síntomas, aunque datos recientes de infecciones artificiales procedentes del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) indican que la producción de olivos enfermos de tuberculosis es sensiblemente inferior a la de los olivos sanos (QUESADA et al., 2010a). Entre los métodos más utilizados para el control de esta enfermedad, destaca la utilización de productos químicos de origen cúprico, habiéndose observado experimentalmente una reducción significativa en el número de tumores en plantas tratadas con respecto a los controles sin tratar (QUESADA et al., 2010b).

Recientemente, se ha establecido un sistema modelo de estudio de la tuberculosis del olivo, basado en la inoculación del patógeno en plantas de olivo micropropagadas *in vitro* (RODRÍGUEZ-MORENO et al., 2008). Previamente, y en base a un análisis tanto fenotípico como genético de una colección de 30 aislados de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* de distinta procedencia, se seleccionó el aislado NCPPB 3335, cepa modificable genéticamente y capaz de generar los síntomas característicos de la tuberculosis tanto en plantas de olivo leñosas como en plantas micropropagadas *in vitro* (PÉREZ-MARTÍNEZ et al., 2007; PÉREZ-MARTÍNEZ et al., 2008). La inoculación de NCPPB 3335 en este sistema *in vitro*, permite la realización de ensayos reproducibles de una forma rápida, reduciendo el tiempo de aparición de síntomas de 3 meses, tiempo necesario para que se induzcan síntomas visibles en plantones de 2 años de edad, a 15 días. Además, este sistema permite monitorizar a tiempo real la fase endofítica de la bacteria, marcada con la proteína verde fluorescente (GFP), así como visualizar las estructuras histológicas vegetales en cortes transversales del tejido tumoral, utilizando tinciones específicas, microscopía de epifluorescencia, láser confocal o electrónica de barrido (RODRÍGUEZ-MORENO et al., 2009). La integración de todas estas técnicas, resulta una herramienta muy potente para el estudio detallado del comportamiento que presentan mutantes del patógeno en genes de interés (Figura 1).

El genoma de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335: igual pero diferente

La era genómica del complejo *P. syringae*, iniciada en 2003 con la secuenciación del genoma completo y plásmidos de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (mancha bacteriana del tomate, infecta también *Arabidopsis*), y seguida en 2005 por los genomas completos de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (mancha parda de la judía) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (grasa de la judía), se encuentra actualmente en expansión creciente tras el abaratamiento de las técnicas de secuenciación

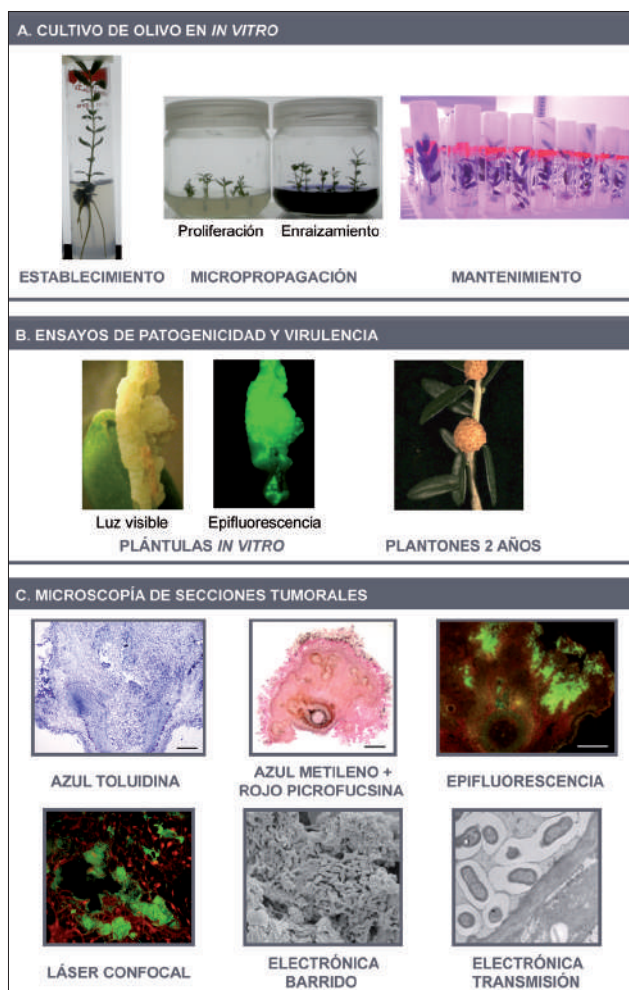


Figura 1. El cultivo *in vitro* de olivo como sistema modelo en el estudio de la tuberculosis. **A.** Las plantas de olivo (*Olea europaea* L.) utilizadas derivan de la micropropagación *in vitro* de una planta procedente de una semilla de la variedad Arbequina. La micropropagación se realiza en medio DKW con ácido indolbutírico (IBA) y benciladenina (proliferación) o IBA (enraizamiento). El mantenimiento se lleva a cabo en medio DKW sin hormonas. **B.** Síntomas inducidos por *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 en plántulas micropropagadas *in vitro* 28 días después de la inoculación (d.p.i.) y en plantones de olivo de la misma variedad 9 meses después de la aclimatación a suelo (120 d.p.i.). **C.** Visualización microscópica de secciones transversales de tumores inducidos por NCPPB 3335 en plántulas de olivo micropropagadas *in vitro*.

masiva. Estos tres genomas completos, se utilizan generalmente como plantillas para el ensamblaje de los borradores de los genomas de otras cepas, estando registrados en NCBI, a día de hoy, un total de 21 genomas pertenecientes a cepas del complejo *P. syringae* (<http://www.pseudomonas-syringae.org/>).

En 2010, la colaboración de varios grupos españoles (Universidad de Málaga, Universidad Pública de Navarra, Centro Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid e Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias) con la *University of Wisconsin* (Madison, USA), permitió generar y analizar bioinformáticamente el primer borrador del genoma de un aislado del complejo *P. syringae* patógeno de plantas leñosas: *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (RODRÍGUEZ-PALENZUELA et al., 2010). Muy recientemente, se ha publicado también la secuencia completa de los tres plásmidos nativos

presentes en esta cepa, proyecto liderado por la Universidad Pública de Navarra en colaboración con otros grupos españoles y la *Michigan State University* (USA) (BARDAJI *et al.*, 2011). Aunque el 98,6 % del genoma de NCPPB 3335 es similar al de las cepas del complejo *P. syringae* patógenas de plantas herbáceas secuenciadas previamente, en este genoma existen 12 regiones variables de al menos 10 Kb, ausentes en el resto de las cepas. En la región variable VR8, se localizaron los operones *antABC* y *catBCA*, implicados en otras *Pseudomonas* en la degradación de antranilato y catecol, respectivamente. Estos genes, se localizaron en el plásmido pCAR1 de *Pseudomonas resinovorans*, bacteria que coloniza la resina de plantas leñosas. Estos resultados indican que la región VR8 podrían ofrecer una ventaja selectiva para el crecimiento de *P. savastanoi* en huéspedes leñosos, y por tanto, podrían contribuir en la definición del espectro de huésped de esta bacteria y de otros patógenos de plantas leñosas. De hecho, ambos operones también se han localizado en los genomas recientemente secuenciados de *P. syringae* pv. *aesculi*, pv. *morsprunorum* y pv. *actinidiae*, bacterias patógenas del castaño de indias, el cerezo y el kiwi, respectivamente.

El análisis bioinformático detallado del genoma de NCPPB 3335 identificó otro conjunto de factores que podrían contribuir a la supervivencia de este patógeno en un huésped leñoso, como por ejemplo un grupo de 30 genes codificadores de posibles efectores T3SS, de los cuales 11 son específicos de NCPPB 3335. Además, en esta cepa los genes relacionados con la biosíntesis de ácido indol-3-acético (IAA) a partir del triptófano (*iaaM* e *iaaH*) se encuentran duplicados, al igual que el gen *iaaL*, implicado en *P. savastanoi* pv. *nerii* en la biosíntesis del derivado IAA-lisina. El análisis detallado de la secuencia de los dos parálogos *iaaL* en varias cepas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* reveló que, uno de ellos, contiene un número variable de repeticiones en tandem del trinucleótido TAC, que se mantiene estable tras la propagación de las cepas en plantas de olivo (MATAS *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta la variabilidad en la secuencia de estos alelos, se ha desarrollado un método que permite la diferenciación de aislados de este patógeno mediante *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), método que ha supuesto recientemente el registro de una patente (ref. P201000535) por inventores de la Universidad de Málaga y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

La disponibilidad de un gran número de borradores de genomas del complejo *P. syringae*, así como la genómica comparativa de los mismos, contribuirá en gran medida al entendimiento de los mecanismos que gobiernan la infección bacteriana de huéspedes leñosos, sin embargo, el entendimiento de la dinámica génica y evolutiva de este grupo de bacterias es dependiente de la generación de genomas cerrados de alta calidad pertenecientes a cepas patógenas de plantas leñosas, estando en proyecto actualmente el cierre de la secuencia del genoma de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, lo que permitiría establecer a esta bacteria como un modelo de investigación internacional y un genoma de referencia (proyectos financiados por el Plan Nacional del MICINN, ref. AGL2011-30343-C02-01 y AGL2011-30343-C02-02).

Identificación de nuevos factores de virulencia en *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Desde los años 60 del pasado siglo, es conocido que el desarrollo completo de los tumores inducidos por *P. savastanoi* pv. *savastanoi* en olivo es dependiente de la síntesis bacteriana y liberación de fitohormonas (auxinas y citoquininas) en el tejido vegetal. Posteriormente, se ha determinado que este proceso es también dependiente de la funcionalidad del T3SS (SISTO *et al.*, 2004; PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010) y de la biosíntesis de N-acil-homoserina lactonas (HOSNI *et al.*, 2011),

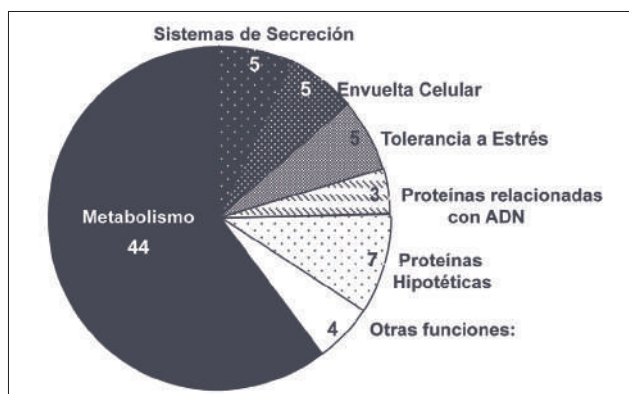


Figura 2. Clasificación en grupos funcionales de los genes afectados en mutantes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 seleccionados mediante *Signature Tagged Mutagenesis*. La selección se llevó a cabo en plántulas de olivo micropropagadas *in vitro*.

moléculas implicadas en la regulación de la expresión de genes dependiente de densidad celular (*quorum sensing*). Con el objetivo de identificar otros genes de este patógeno que podrían resultar relevantes en el proceso de infección de plantas leñosas, se ha llevado a cabo una estrategia de análisis genómico funcional, *signature tagged mutagenesis* (STM), utilizando para ello una colección de mutantes generados en la cepa modelo NCPPB 3335. El análisis en masa de estos mutantes se realizó en plantas de olivo micropropagadas *in vitro* (ISABEL M. MATAS, Tesis Doctoral, Universidad de Málaga, Diciembre 2010). Tras dos rondas de multiplicación *in planta*, se seleccionaron 73 mutantes STM, afectados en un total de 58 genes diferentes. El análisis de las secuencias interrumpidas por el transposón en cada uno de estos mutantes ha permitido reconstruir la red metabólica requerida por *P. savastanoi* pv. *savastanoi* para su multiplicación y supervivencia dentro de los tejidos de olivo, así como identificar nuevos genes de virulencia en esta bacteria fitopatógena, como por ejemplo los sistemas de secreción tipo II y tipo IV, una batería de genes relacionados con la tolerancia y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un conjunto de genes posiblemente implicados en la biosíntesis de la pared celular o en la regulación de los niveles intracelulares de di-GMPc (Figura 2). El análisis funcional de los genes identificados mediante esta estrategia, ayudará a definir con más detalle el proceso de la infección de olivo por *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, así como aportará datos relevantes para el entendimiento de la interacción de otras bacterias patógenas con huéspedes leñosos.

Agradecimientos: Mi más sincero agradecimiento a la directiva de la SEF por haber seleccionado nuestra aportación para su presentación en la celebración de su 30 aniversario. A todos los que contribuyen o han contribuido a este trabajo en la Universidad de Málaga (I. Pérez-Martínez, L. Rodríguez-Moreno, I.M. Matas, L. Lambertsen, I. Aragón, P. Castañeda, M.G. Castillo, A. Moreno, T. Duarte), en la Universidad Pública de Navarra (L. Bardaji, I. de Cárdenas, J. Murillo), en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (J.M. Quesada, R. Peñalver, M.M. López), en el CBGP-Universidad Politécnica de Madrid (P. Rodríguez-Palenzuela, E. López-Solanilla, M. Antúnez), en el IFAPA-Centro de Churriana-Málaga (A. Barceló, I. Vidoy), en la *Michigan State University*-USA (G.W. Sundin) y en la *University of Wisconsin*-USA. Financiación: proyectos MICINN AGL2008-55311-C02-01 y AGL2008-55311-C02-02, cofinanciados con FEDER, y proyecto Junta de Andalucía P08-CVI-03475.

BIBLIOGRAFÍA

- BARDAJI L, PÉREZ-MARTÍNEZ I, RODRÍGUEZ-MORENO L, RODRÍGUEZ-PALENZUELA P, SUNDIN GW, RAMOS C, MURILLO J.** (2011) *Sequence and role in virulence of the three plasmid complement of the model tumor-inducing bacterium Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi NCPPB 3335*. PLoS ONE 6 (10): e25705.
- GARDAN L, SHAFIK H, BELOUIN S, BROCH R, GRIMONT F, GRIMONT PAD.** (1999) *DNA relatedness among the pathovars of Pseudomonas syringae and description of Pseudomonas tremiae sp. nov. and Pseudomonas cannabina sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959)*. Int. J. Sys. Bacteriol. 49: 469-478.
- HOSNI T, MORETTI C, DEVESCOVI G, SUÁREZ-MORENO ZR, FATMI M, GUARNACCIA C, PONGOR S, ONOFRI A, BUONAURO R, VENTURI V.** (2011) *Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease*. ISME J. doi:10.1038/ismej.2011.65 [en prensa].
- KENNELLY MM, CAZORLA FM, DE VICENTE A, RAMOS C, SUNDIN GW.** (2007) *Pseudomonas syringae diseases of fruit trees. Progress toward understanding and control*. Plant Dis 91: 4-17.
- MATAS IM, PÉREZ-MARTÍNEZ I, QUESADA JM, RODRÍGUEZ-HERVÁ JJ, PENYALVER R, RAMOS C.** (2009) *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi contains two iaaL paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat*. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1030-1035.
- PÉREZ-MARTÍNEZ I, RODRÍGUEZ-MORENO L, MATAS IM, RAMOS C.** (2007) *Strain selection and improvement of gene transfer for genetic manipulation of P. savastanoi isolated from olive knots*. Res. Microbiol. 158: 60-67.
- PÉREZ-MARTÍNEZ I, ZHAO Y, MURILLO J, SUNDIN GW, RAMOS C.** (2008) *Global genomic analysis of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi plasmids*. J. Bacteriol. 190: 625-635.
- PÉREZ-MARTÍNEZ I, RODRÍGUEZ-MORENO L, LAMBERTSEN L, MATAS IM, MURILLO J, TEGLI S, JIMÉNEZ AJ, RAMOS C.** (2010) *Fate of a Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi type III secretion system mutant in olive plants (Olea europaea L.)*. Appl. Environ. Microbiol. 76: 3611-3619.
- QUESADA JM, PENYALVER R, PÉREZ-PANADÉS J, SALCEDO CI, CARBONELL EA, LÓPEZ MM.** (2010a) *Dissemination of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi populations and subsequent appearance of olive knot disease*. Plant Pathol. 59: 262-269.
- QUESADA JM, PENYALVER R, PÉREZ-PANADÉS J, SALCEDO CI, CARBONELL EA, LÓPEZ MM.** (2010b) *Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi populations and for improving subsequent control of olive knot disease*. Crop Protection 29: 1413-1420.
- RODRÍGUEZ-MORENO L, BARCELÓ-MUÑOZ A, RAMOS C.** (2008) *In vitro analysis of the interaction of Pseudomonas savastanoi pvs. savastanoi and nerii with micropropagated olive plants*. Phytopathology 98: 815-822.
- RODRÍGUEZ-MORENO L, JIMÉNEZ AJ, RAMOS C.** (2009) *Endopathogenic lifestyle of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi in olive knots*. Microb. Biotechnol. 2: 476-488.
- RODRÍGUEZ-PALENZUELA P, MATAS I, MURILLO J, LÓPEZ-SOLANILLA E, BARDAJI L, PÉREZ-MARTÍNEZ I, RODRÍGUEZ-MOSKERA ME, PENYALVER R, LÓPEZ MM, QUESADA JM, BIEHL BS, PERNA NT, GLASNER JD, CABOT EL, NEENO-ECKWALL E, RAMOS C.** (2010) *Annotation and overview of the Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts*. Environ. Microbiol. 12: 1604-1620.
- SISTO A, CIPRIANI MG, MOREA M.** (2004) *Knot formation caused by Pseudomonas syringae subsp. savastanoi on olive plants is hrp-dependent*. Phytopathology 94: 484-489.