



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario

**"Participación de las proteínas
del sistema de secreción tipo III de
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*,
Hpa1 y HrpE, en la interacción planta-patógeno"**

Lic. Germán G. Sgro

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Natalia Gottig
Co-directora: Dra. Jorgelina Ottado

Rosario, Argentina

Año 2014

“Participación de las proteínas del sistema de secreción tipo III de Xanthomonas axonopodis pv. citri, Hpa1 y HrpE, en la interacción planta-patógeno”

Germán Gustavo Sgro

Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET) dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R., durante el período comprendido entre los meses de abril de 2009 y marzo de 2014, bajo la dirección de la Dra. Natalia Gottig y la Dra. Jorgelina Ottado.

Quisiera agradecer en primer lugar a las doctoras Natalia Gottig y Jorgelina Ottado, por su dirección en este trabajo de tesis, por brindarme las herramientas para llevarlo a cabo, y por todos los aportes, en lo laboral y también personal, realizados en estos últimos 5 años de mi vida;

al Dr. Chuck Farah de la Universidad de San Pablo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su incansable voluntad para enseñar (y aprender), y por su excelente persona;

a Flor, Bet, Ceci y Tama, por compartir un lugar ajeno y querer transformarlo en propio, por su buena onda, y por sus amistades tan necesarias dentro y fuera del trabajo;

a Rodrigo y Sonia, por estar siempre dispuestos a *ver algo más* en el microscopio, y pasar lindos momentos juntos. A Seba, por su ayuda y predisposición con la cámara de plantas;

a la gente del bloque cero del IQ, Raphael, Diorge, Alexandre, Gabriel, Layara, Ilda y Camila, por darme su ayuda, su amistad y los excelentes momentos que pasamos juntos. Especialmente a Germán, Cristiane y Roberto por su ayuda en los trabajos diarios dentro del laboratorio, y por sus consejos siempre útiles;

a Clau, Lilo y Vivi, por su buena onda, y por acompañarme no sólo a mí, sino a todos los que dependemos de ellas para poder hacer, día a día, un mejor trabajo de laboratorio;

al resto del IBR, becarios e investigadores que acompañaron mi pasaje por el instituto, con quienes compartí no sólo protocolos, sino también experiencias, historias y consejos muy importantes para mí, especialmente a Lautaro y Telma;

a Martín, por ser un excelente amigo y una persona excepcional;

a Carlos, Angel, Fede, Javi, Mauro, Rafa, Nawu, Mati, Edu, Juanjo, Gabi y Julián, por permitirme crecer como persona compartiendo momentos inolvidables;

a mi familia, a mis padres por ser los dos pilares que sostienen mi vida entera, por acompañarme a través de todos los momentos con un entusiasmo contagiante, y por enseñarme a seguir adelante. A mi hermana Victoria porque, quizás sin querer, fue el timón que marcó el rumbo a lo largo de mi vida;

y especialmente a Virginia, por su hermosa persona, por su amor y cariño, por estar siempre a mi lado, y por enseñarme mucho más de lo que siempre creí aprender.

“Aquel que quiere permanentemente llegar más alto tiene que contar con que algún día le invadirá el vértigo. ¿Qué es el vértigo? ¿El miedo a la caída? Pero ¿por qué tenemos vértigo en un mirador provisto de una valla segura? El vértigo es algo diferente del miedo a la caída. El vértigo significa que la profundidad que se abre ante nosotros nos atrae, no seduce, despierta en nosotros el deseo de caer, del cual nos defendemos espantados.”

Milan Kundera

Parte de los resultados que se presentan en este trabajo de tesis han sido dados a conocer en:

Publicaciones en revistas científicas internacionales:

- Sgro G.G., Ficarra F.A., Dunger G., Scarpeci T.E., Valle E.M., Cortadi A., Orellano E.G., Gottig N. y Ottado J. (2012). Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to pathogen virulence. *Molecular Plant Pathology*. 13, 1047-1059.

Publicaciones en congresos nacionales e internacionales:

- Sgro G.G., Dunger G., Orellano E.G., Ottado J. y Gottig N. Analysis of a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* harpin protein in host and non-host plants. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2009, Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Sgro G.G., Dunger G., Orellano E.G., Gottig N. y Ottado J. Análisis de Hpa1, una proteína harpin de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. IV Jornadas de Ciencia y Tecnología (JCyT). Noviembre 2010, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Sgro G.G., Dunger G., Orellano E.G., Gottig N. y Ottado J. Study of the role of a harpin from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Diciembre 2010, Puerto Madryn, Chubut, Argentina.
- Sgro G.G., Ficarra F.A., Gottig N. y Ottado J. Participación de la proteína Hpa1 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en el proceso patogénico. XII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Diciembre 2011, Rosario, Santa Fe, Argentina.

- Sgro G.G., Ficarra F.A., Gottig N. y Ottado J. Analysis of structural features of a Hrp-Associated harpin from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Octubre 2012, Mendoza, Mendoza, Argentina.
- Sgro G.G., Gottig N. y Ottado J. Hpa1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, approach into the structural features of this harpin protein. IX Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGe). Agosto 2013, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Índice	
Abreviaturas	6
Anglicismos	9
1. Introducción	11
1.1. Las plantas y su interacción con otros organismos	11
1.1.1. Interacción planta-patógeno y los modelos que la describen	13
1.1.2. Mecanismos de inmunidad en las plantas	15
1.2. Cancrosis de los Cítricos	21
1.3. El género <i>Xanthomonas</i>	25
1.3.1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , el agente causal de la Cancrosis de los Cítricos	26
1.3.2. El ciclo infeccioso de Xac	28
1.4. Los sistemas de secreción bacterianos y su importancia	30
1.5. El SST3 y el cluster <i>hrp</i>	34
1.5.1. Morfología del SST3 y del cluster <i>hrp</i>	35
1.5.2. Regulación de la expresión de los genes <i>hrp</i> en fitopatógenos	38
1.6. HrpE, la subunidad principal del SST3	41
1.7. Proteínas harpin, un sólo nombre para una gran familia	45
2. Objetivos	51
2.1. Objetivo general	51
2.2. Objetivos específicos	51
3. Materiales y métodos	53
3.1. Cultivo bacteriano	53
3.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	53
3.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento utilizados	55
3.2. Material vegetal y métodos de crecimiento	57
3.3. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	58
3.3.1. Técnicas básicas de ADN recombinante	58
3.3.2. Preparación de ADN genómico de Xac	58

3.3.3. Oligonucleótidos	59
3.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	61
3.4.1. Construcción de los vectores de expresión	61
3.4.2. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	61
3.4.3. Preparación de extractos proteicos y purificación de proteínas recombinantes	62
3.5. Métodos analíticos de proteínas	64
3.5.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	64
3.5.2. Electrotransferencia de proteínas hacia membrana de nitrocelulosa y detección con anticuerpos	64
3.5.3. Análisis por filtración en gel	65
3.5.4. Análisis por espectroscopía de masas	65
3.5.5. Análisis por espectroscopía de dicroísmo circular	66
3.5.6. Tinción y espectroscopía con rojo congo	66
3.5.7. Tinción y birrefringencia con rojo congo	67
3.5.8. Ensayo de cinética utilizando Thio-T	67
3.6. Técnicas de microscopía	68
3.6.1. Microscopía de tejido de cítricos	68
3.6.2. Microscopía para visualización de estructuras bacterianas en medio de cultivo	68
3.6.3. Microscopía <i>in vivo</i> de hojas de cítricos infectadas	68
3.7. Construcción de la cepa mutante <i>XacΔhpa1</i> y su cepa complementada	69
3.7.1. Construcción de la cepa mutante <i>XacΔhpa1</i>	69
3.7.2. Construcción de la cepa complementada <i>XacΔhpa1c</i>	69
3.8. Conjugación bacteriana	70
3.9. Infiltración de hojas	71
3.9.1. Infiltración con muestras proteicas	71
3.9.2. Infección de hojas	71
3.10. Ensayo de <i>priming</i>	72
3.10.1. Ensayo de <i>priming</i> en plantas de naranja	72
3.10.2. Ensayo de <i>priming</i> en plantas de tomate y pimiento	72
3.11. Toma y procesamiento de muestras para recuento de bacterias	73
3.12. Tinciones	74

3.12.1. Ensayo de muerte celular (Azul de Tripán)	74
3.12.2. Ensayo de producción de ROS con 3'-3'Diaminobencidina (DAB)	74
3.12.3. Tinción de calosa	74
3.12.4. Ensayo de inducción con gen reportero GUS	75
3.13. Ensayo de liberación de iones	76
3.14. Análisis transcripcional	77
3.14.1. Extracción de ARN de plantas con TRIzol®	77
3.14.2. Extracción de ARN bacteriano con TRIzol®	77
3.14.3. Extracción de ARN bacteriano a partir de hojas infectadas	78
3.14.4. Reacción de retrotranscripción	78
3.14.5. Cuantificación por RT-PCR	78
3.14.6. Cuantificación por qRT-PCR	79
3.15. Ensayo de dos híbridos en levaduras	81
3.15.1. Medios de cultivo para cepas de levaduras	81
3.15.2. Clonado de genes y análisis de dos híbridos en levaduras	81
3.15.3. Primer transformación de levaduras	81
3.15.4. Prueba de autoactivación	82
3.15.5. Segunda transformación de levaduras	82
3.15.6. Selección de colonias, extracción de ADN y secuenciación	82
3.16. Producción de anticuerpos policlonales	84
3.17. Ensayo de secreción a través del SST3	85
3.18. Análisis de datos	86
4. Resultados y discusión - Capítulo 1	
Caracterización funcional de la proteína Hpa1	88
4.1. Análisis, clonado y expresión de la proteína Hpa1 de Xac	88
4.2. Caracterización de la respuesta hacia Hpa1 de Xac en plantas no hospedadoras y hospedadoras	90
4.2.1. Análisis de los fenotipos en plantas no hospedadoras y hospedadoras en respuesta a Hpa1 de Xac	90
4.2.2. Análisis de muerte celular y de la producción de peróxido de hidrógeno en plantas no hospedadoras	93
4.2.3. Análisis de liberación de iones en plantas no hospedadoras	95
4.2.4. Análisis de la deposición de calosa	96

4.3	Análisis de la expresión transcripcional de genes de defensa en respuesta a Hpa1	98
4.3.1.	Análisis de expresión de genes a través de qRT-PCR	98
4.3.2.	Análisis de expresión de genes a través de ensayos bioquímicos <i>in planta</i>	99
4.4.	Hpa1 altera la morfología de las hojas de cítricos	101
4.5.	Análisis de la inducción de <i>priming</i> en plantas hospedadoras por Hpa1	103
4.6.	Análisis <i>in planta</i> de la expresión de <i>hpa1</i> , y su función en la virulencia de Xac	105
4.6.1.	Expresión del gen <i>hpa1</i> dentro y fuera de la planta	105
4.6.2.	Análisis de función de <i>hpa1</i> a través de la mutante Xac Δ <i>hpa1</i>	107
4.6.3.	Análisis de función a través del agregado ectópico de Hpa1	109
4.7.	Caracterización y análisis del efecto de Hpa1 sobre células bacterianas en medio de cultivo	111
4.8.	Caracterización del efecto de Hpa1 sobre células bacterianas dentro del tejido de hojas de cítricos	114
4.9.	Hpa1 de Xac es secretada de forma dependiente del SST3	116
4.10.	Discusión	117
5.	Resultados y discusión - Capítulo 2	
	Caracterización molecular de la proteína Hpa1	124
5.1.	Análisis de Hpa1 por filtración en gel	124
5.2.	Determinación de la estructura secundaria de Hpa1 y estabilidad frente a pH a través de dicroísmo circular	126
5.3.	Hpa1 es capaz de formar fibras de tipo amiloides <i>in vitro</i>	130
5.4.	Cinética de formación de fibras de Hpa1 <i>in vitro</i>	134
5.5.	Estabilidad de Hpa1 frente a la temperatura seguida a través de dicroísmo circular	138
5.6.	Análisis de la capacidad de formación de fibras de las regiones amino terminal y carboxilo terminal de Hpa1	141
5.7.	Contribución de las regiones amino terminal y carboxilo terminal de Hpa1 a la inducción de HR en plantas no hospedadoras, formación de canchros y agregación bacteriana	144
5.8.	Discusión	148

6. Resultados y discusión - Capítulo 3	
Estudios sobre HrpE, la proteína mayoritaria del Pilus Hrp	155
6.1. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas pilinas Hrp de fitopatógenos	155
6.2. Expresión y purificación de la proteína HrpE de Xac	160
6.3. Caracterización del efecto de HrpE de Xac en plantas no hospedadoras y hospedadoras	165
6.3.1. Determinación del efecto de HrpE de Xac en plantas no hospedadoras y hospedadoras	165
6.3.2. Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno	167
6.3.3. Análisis de la deposición de calosa	169
6.4. Análisis de la expresión transcripcional de genes involucrados en respuestas de defensa de plantas en presencia de HrpE	171
6.5. HrpE induce <i>priming</i> en plantas hospedadoras y no hospedadoras	176
6.6. Rol de HrpE en la interacción bacteria-bacteria	181
6.7. Estrategia para la obtención de plantas resistentes a la Cancrosis de los Cítricos	183
6.7.1. Introducción	183
6.7.2. Producción de anticuerpos contra HrpE	184
6.7.3. Análisis <i>in vivo</i> de los anticuerpos contra HrpE	185
6.8. Discusión	190
7. Resultados y discusión - Capítulo 4	
Estudios e identificación de proteínas de <i>C. sinensis</i> blanco de HrpE y Hpa1	196
7.1. Identificación de interacciones entre proteínas de Xac y de hojas de plantas de naranja	196
7.2. Análisis de las interacciones entre HrpE y proteínas de <i>Citrus sinensis</i>	204
7.3. Análisis de las interacciones entre Hpa1 y proteínas de <i>Citrus sinensis</i>	210
7.4. Discusión	221
8. Conclusiones	224
9. Resumen	229
10. Referencias bibliográficas	232

Abreviaturas

3AT: 3-amino-1,2,4-triazol

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

Ap: ampicilina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

avr: avirulencia

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

CD: dicroísmo circular

Cm: cloranfenicol

CR: rojo congo

CTAB: bromuro de cetil trimetil amonio

cv: cultivar

DAB: 3'-3'diaminobencidina

DEPC: dietilpirocarbonato

DNAsa I: desoxirribonucleasa I

dNTP: desoxirribonucleótido 5'-trifosfato

DO: densidad óptica

dpi: días post infiltración

EDTA: ácido etilendiamin tetracético

EGTA: ácido etilenglicol tetracético

EPS: exopolisacárido

ETI: inmunidad disparada por elicitores

FPLC: equipamiento para realizar ensayos de cromatografía líquida

g: unidad de fuerza centrífuga

Gn: gentamicina

HCl: ácido clorhídrico

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetonosulfónico

hpa: hrp-asociado

HR: respuesta hipersensible

hrc: hrp-conservado

hrp: HR y patogenicidad
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa: kilodalton, equivale a 1000 Daltons
Kn: kanamicina
kpb: kilopares de bases, equivale a 1000 pb
LB: medio Luria-Bertani
LPS: lipopolisacárido
M: molar
MA: medio Mínimo A
ME: membrana externa
MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MI: membrana interna
ml: mililitro, equivale a una milésima parte de litro
mM: milimolar, equivale a una milésima parte de molar
Mpb: mega pares de bases, equivalen a 1000000 de pares de bases
NaCl: cloruro de sodio
NB: medio Nutrient Broth
NBT: cloruro de nitroazul de tetrazolio
ng: nanogramos, equivale a una milmillonésima parte de gramo
nm: nanometro
ORF: marco abierto de lectura
PAMPS: patrones moleculares asociados a patógenos
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa
PIP: promotor inducible en planta
PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro, inhibidor de proteasas
PTI: inmunidad disparada por PAMPs
pv: patovar
R: resistencia
ROS: especies reactivas del oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
SB: medio Silva-Buddenhagen
SDS: dodecil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE: electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

Sp: espectinomicina

SST1: sistema de secreción tipo uno

SST2: sistema de secreción tipo dos

SST3: sistema de secreción tipo tres

SST4: sistema de secreción tipo cuatro

SST5: sistema de secreción tipo cinco

SST6: sistema de secreción tipo seis

TAE: *buffer* Tris-Acetato-EDTA

Thio-T: Tioflavina T

Tris: tris-(hidroximetil)aminometano

UFC: unidad formadora de colonias

UV: ultravioleta

XVM2: medio definido mimetizador del apoplasto vegetal

X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-1*H*-indol-3-il-β-D-glucopiranosidurónico

μg: microgramo, equivale a una millonésima parte de gramo

μl: microlitro, equivale a una millonésima parte de litro

μM: micromolar, equivale a una millonésima parte de molar

Anglicismos

Biofilm: ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios tipos de microorganismos asociados a una superficie viva o inerte.

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón. Es una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, y tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de otras sustancias.

Cluster: es un conjunto o agrupamiento de dos o más genes que codifican productos similares o relacionados funcionalmente.

Pellet: sedimento obtenido en el fondo de un tubo luego de la centrifugación.

Pixel: la menor unidad homogénea en color que forma parte de una imagen digital, ya sea esta una fotografía, un fotograma de vídeo o un gráfico.

Priming: es la inducción de una respuesta de defensa en plantas, previa al contacto con un organismo patógeno.

Quorum sensing: detección de quórum o autoinducción, es un mecanismo por el cual un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolla comportamientos sociales coordinados.

Western blot: es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, a través de la unión de anticuerpos.

Introducción

1. Introducción

1.1. Las plantas y su interacción con otros organismos

Debido a su incapacidad de movilización, las plantas están sujetas a lo largo de su vida a realizar todas las actividades metabólicas en un espacio limitado, debiendo enfrentarse posiblemente a condiciones ambientales desfavorables tales como la limitación o exceso de agua, nutrientes y radiación, y las temperaturas extremas, entre otras, afectando todas estas globalmente su desarrollo (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Por otro lado, las plantas también se relacionan con otros organismos vivos, tales como bacterias, hongos, nematodos, protozoarios, virus e insectos, ya que proporcionan un atractivo depósito de nutrientes y nicho ecológico para los mismos. Estas interacciones pueden ser beneficiosas o no para la planta; considerándose en las primeras al organismo como simbiótico, y las últimas como patogénico (Agrios, 2004). De esta manera, un organismo patógeno de plantas, o fitopatógeno, está definido como uno tal que, para completar parte o todo su ciclo de vida, crece a expensas de la planta produciendo un efecto perjudicial sobre la misma (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

En la mayoría de las plantas superiores la colonización por patógenos conduce a una diversa variedad de enfermedades, las que pueden llegar a ser muy severas para las primeras. Sin embargo, la enfermedad es más la excepción que la regla. Esto se debe principalmente a que las condiciones ambientales desfavorables hacen que el patógeno muera antes de que comience a desarrollarse el proceso de infección. Además, muchas de las especies de plantas son incapaces de cubrir los requerimientos nutricionales del microorganismo atacante, o las plantas atacadas poseen barreras estructurales preformadas o producen compuestos tóxicos impidiendo la colonización de sus tejidos. La primer barrera que poseen las plantas contra los microorganismos es una capa cuticular laxa, la que genera una protección pasiva al ataque de patógenos no especializados y está compuesta por ceras. Los compuestos antimicrobianos preformados mejor caracterizados pertenecen a las clases de las saponinas y los glucosinolatos. En todas estas situaciones en las que los microorganismos no logran proliferar, las plantas son consideradas como no hospedadoras.

En algunos casos, y por diferentes motivos, algunos microorganismos logran atravesar estas barreras de resistencia de las plantas, presentando nuevos escenarios en los que las plantas son consideradas como hospedadoras. Si la planta ha desarrollado mecanismos que le permiten reconocer al microorganismo y desencadenar respuestas de defensa específicas para limitar el crecimiento del mismo, el microorganismo se define como patógeno avirulento y la interacción se denomina incompatible. Si por el contrario la planta no ha desarrollado mecanismos que le permiten reconocer al microorganismo, entonces se produce la enfermedad, y se dice que el patógeno es virulento y la interacción es compatible (Agrios, 2004).

Dentro del último grupo definido, los patógenos virulentos pueden agruparse en tres clases diferentes dependiendo de la estrategia que emplean para interactuar con la planta hospedadora (Agrios, 2004). Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse sólo en los tejidos vivos de los hospedadores son llamados biotróficos, por ejemplo algunas bacterias y hongos que colonizan el apoplasto vegetal. Estos patógenos necesitan mantener las células hospedadoras vivas y emplean para ello mecanismos de invasión sumamente sutiles. Los patógenos biotróficos presentan un rango de hospedador reducido, y las distintas cepas de estos patógenos se han adaptado generalmente a una línea específica de una determinada especie de plantas. Un ejemplo lo constituye el hongo *Uromyces fabae*, el cual produce una estructura de alimentación muy sofisticada denominada haustoria, la que penetra la membrana de las células hospedadoras estableciendo una interfase de intercambio de nutrientes y agua con la misma (Voegelé y Mendgen, 2003; Mendgen y Hahn, 2002). Otro grupo de patógenos virulentos, los denominados necrotróficos, necesariamente producen la muerte de las células hospedadoras obteniendo de esta forma los nutrientes a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y bacterias fitopatógenas, los cuales muchas veces utilizan diferentes toxinas y enzimas líticas capaces de degradar el tejido de la planta para facilitar la invasión (Choquer *et al.*, 2007). Un ejemplo de los patógenos necrotróficos es el hongo *Botrytis cinerea*, el cual es menos especializado generando enfermedad en más de 200 especies de plantas hospedadoras (Choquer *et al.*, 2007). El tercer grupo de clasificación de patógenos virulentos, lo conforman los microorganismos que poseen características intermedias entre los anteriores, y se denominan hemibiotróficos. Los integrantes de este grupo inicialmente se desarrollan manteniendo las células vegetales vivas pero, en una

etapa tardía de la infección, el patógeno mata a las células de la planta (Agrios, 2004). Ejemplos de este grupo son las especies de hongos *Magnaporthe grisea* y *Phytophthora infestans* (Mendgen y Hahn, 2002).

1.1.1. Interacción planta-patógeno y los modelos que la describen

En el primer cuarto del siglo XX Harold Flor demostraría, a través de experimentos genéticos, que la herencia de la inmunidad de las plantas frente a patógenos, así como la habilidad del patógeno para causar enfermedad, estaba controlada por pares de genes correspondientes (Flor, 1942). En el año 1955 Harold Flor planteó una hipótesis que por mucho tiempo fue la única opción lógica para darle explicación al comportamiento de las plantas frente a un patógeno. Si bien sus trabajos se centraron principalmente estudiando la interacción entre plantas de lino y el patógeno fúngico *Melampsora lini* pv. *lini*, en los años siguientes se describieron interacciones entre plantas y patógenos de especies diferentes a las estudiadas inicialmente por Flor. El factor genético de la planta fue denominado como gen de resistencia (*R*), mientras que el factor genético del patógeno que determinaba la imposibilidad de causar enfermedad se denominó gen de avirulencia (*Avr*). Una planta que produce una proteína R es resistente frente a una cepa patogénica que produce la proteína Avr correspondiente (Figura 1.1); esta relación fue denominada Gen por Gen (Flor, 1955).

		Genotipo de la planta hospedadora	
		<i>R</i>	<i>r</i>
Genotipo del patógeno	<i>avr</i>	<i>R / avr</i> Hay desarrollo de la enfermedad	<i>r / avr</i> Hay desarrollo de la enfermedad
	<i>Avr</i>	<i>R / Avr</i> No hay desarrollo de la enfermedad	<i>r / Avr</i> Hay desarrollo de la enfermedad

Figura 1.1. Interacción Gen por Gen. Diagrama general planteado por Harold Flor para explicar la resistencia o susceptibilidad de las plantas frente a sus patógenos.

Originalmente se concibió que cuando no existía desarrollo de la enfermedad, la resistencia era conferida por una interacción directa entre las proteínas R y Avr (Keen, 1990), lo que era sostenido por varios trabajos científicos donde se observó la resistencia mediada por interacciones físicas y directas específicas entre estos dos tipos de proteínas (Dahlbeck y Stall, 1979; Dodds *et al.*, 2006). Sin embargo, otros experimentos diseñados para demostrar esta interacción directa del tipo ligando-receptor muy a menudo mostraron resultados negativos. Esto llevó a plantear modificaciones que permitieron comprender mejor la situación. Una de estas modificaciones permitió formular lo que se llamó Hipótesis de la Guarda, la cual establece que las proteínas R de alguna forma monitorean el estado de diversos componentes del hospedador, los cuales son blancos de acción de las moléculas del patógeno (van der Biezen y Jones, 1998). Este modelo plantea que las moléculas de los patógenos tienen funciones intrínsecas para promover la virulencia de los mismos, requiriendo de la modulación de los componentes del hospedador, los que se convierten así en blancos de virulencia. En lugar de la presencia de la molécula secretada por el patógeno, es la manipulación del blanco del hospedador lo que es sentido por las proteínas R (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006). El mecanismo indirecto de percepción de los efectores postulado por la Hipótesis de la Guarda explica cómo múltiples efectores pueden ser percibidos por una sola proteína R, lo que permite un repertorio relativamente pequeño de genes R para detectar la amplia diversidad de agentes patogénicos que atacan a las plantas (Dangl y Jones, 2001). Por lo tanto, las moléculas provenientes del patógeno que inicialmente se denominaron factores de avirulencia, son en realidad, factores de virulencia, por lo que actualmente se acuñó el término efectores para su denominación (Bent y Mackey, 2007; Boller y Felix, 2009). Implícita en esta hipótesis esta la noción de que el blanco del efector vigilado es indispensable para la función de la virulencia de la proteína efectora en la ausencia de la proteína R afín. Ejemplos clásicos de estos blancos de efectores vigilados son RIN4 y PBS1 de *Arabidopsis thaliana*, y RCR3 y Pto de tomate (Jones y Dangl, 2006).

En los últimos años, han surgido nuevos datos sobre efectores reconocidos indirectamente que son incompatibles con la descripción original de la Hipótesis de la Guarda. Ahora está bien documentado que muchos efectores de patógenos tienen múltiples objetivos en el hospedador y que proteínas guardianas clásicas son a menudo prescindibles para las actividades de virulencia de efectores en plantas que

carecen de la proteína R. Nuevos datos sobre blancos adicionales de las proteínas AvrPto y AvrBs3, impulsaron a proponer el concepto de que algunos de los blancos del hospedador actúan como señuelos para detectar efectores de patógenos a través de las proteínas R (Zhou y Chai, 2008; Zipfel y Rathjen, 2008). En este sentido, se han intentado desarrollar estas ideas bajo un nuevo modelo más consistente con la mayor parte de los datos descritos hasta el momento. Este nuevo modelo, llamado Modelo del Señuelo es coherente con el conocimiento actual de la evolución de las interacciones planta-patógeno (van der Hoorn y Kamoun, 2008). A pesar de este nuevo enfoque para la comprensión de las interacciones entre las plantas y sus patógenos, la Hipótesis de la Guarda sigue siendo el más difundido y utilizado.

1.1.2. Mecanismos de inmunidad en las plantas

Las plantas carecen de un sistema inmune adaptativo como el que se encuentra presente en los animales; es por ello, que sus variadas respuestas de defensa inducibles son llamadas colectivamente como inmunidad innata. Basados en las interpretaciones y explicaciones de los modelos y modificaciones planteados en la sección anterior, las respuestas de defensa de una planta al ataque por un microorganismo pueden ser diferenciadas entre la llamada defensa basal, y la defensa específica o mediada por genes R. Estas dos respuestas de defensa pueden ser distinguidas experimentalmente por diferentes ensayos, pero muestran algunas características similares y pueden involucrar mecanismos moleculares comunes.

Las respuestas de defensa basales ocurren en estadíos tempranos de la interacción entre planta y patógeno (aproximadamente 10 minutos posteriores al contacto), y representan los mecanismos utilizados por la planta para frenar la infección antes de que el patógeno se establezca en la misma. La inducción de la inmunidad basal de las plantas está orquestada por dos barreras de defensa. La primera está conformada por las defensas pasivas dadas por la cutícula cerosa y los compuestos antimicrobianos preformados, que constituyen la primer línea de defensa basal efectiva contra la mayoría de los patógenos potenciales (Dangl y Jones, 2001; Hann y Rathjen, 2007; Lipka *et al.*, 2008). La segunda está basada en el reconocimiento de componentes microbianos denominados patrones moleculares asociados al microorganismo, MAMPs (del inglés, Microorganism-Associated

Molecular Patterns), o PAMPs (del inglés, Pathogen-Associated Molecular Patterns) en caso de que el microorganismo sea patagénico, mediante diversos receptores PRRs (del inglés, Pattern Recognition Receptors) que reconocen estos patrones, y que se encuentran localizados en la superficie de las células vegetales. Los M/PAMPs están altamente conservados entre un amplio grupo de microorganismos, y normalmente no se encuentran presentes en el organismo hospedador (Iriti y Faoro, 2007). Ejemplos de M/PAMPs de bacterias Gram negativas son el lipopolisacárido (LPS) siendo el mayor constituyente de la membrana externa bacteriana, la flagelina (flg) que es subunidad proteica del flagelo, y la quitina u oligómeros de quitosan que conforman la pared celular de los hongos (Ingle *et al.*, 2006; Schwessinger y Zipfel, 2008; Iriti y Faoro, 2009).

El reconocimiento de estas estructuras por parte de los receptores PRRs activa una respuesta inmune, llamada Inmunidad Inducida por PAMPs, PTI (del inglés PAMP-Triggered Immunity) y se caracteriza principalmente por el incremento del pH extracelular causado por un rápido eflujo de iones potasio, un alto incremento en los niveles de calcio y etileno, la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos, MAPK (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase), la producción de especies reactivas del oxígeno, ROS (del inglés Reactive Oxigen Species), la expresión de numerosos genes de defensa, y el engrosamiento de la pared celular por deposición de calosa sobre la misma (Asai *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004; Boller y Felix, 2009; Nguyen *et al.*, 2010). Esta resistencia de las plantas a la mayoría de los patógenos se denomina resistencia no hospedadora. Se ha postulado la existencia de dos tipos de resistencia no hospedadora, la de tipo I que no resulta en una muerte celular visible y la de tipo II, en la que se produce la muerte celular programada o Respuesta Hipersensible (HR, del inglés Hypersensitive Response) (Mysore y Ryu, 2004; Oh *et al.*, 2006). Un ejemplo de resistencia no hospedadora sin desarrollo de HR la constituyen los genes *Cf* de tomate que, en condiciones de alta humedad, dan resistencia a esta planta frente al hongo *Cladosporium fulvum* (Hammond-Kosack *et al.*, 1996).

La muerte celular puede deberse a un programa de muerte celular regulado, o a la necrosis producida por los compuestos tóxicos y radicales libres que sintetizan las mismas células vegetales. La Respuesta Hipersensible es una forma particular de muerte celular programada rápida alrededor y en el sitio inicial de infección, que tiene como objetivo final la inhibición de la proliferación del patógeno. En las células

afectadas se sintetizan especies reactivas del oxígeno como H₂O₂; óxido nítrico que inhibiría la enzima catalasa y otras enzimas detoxificadoras de ROS; calosa, lignina, y otros compuestos que fortifican la pared celular; fitoalexinas y otros compuestos antimicrobianos; hormonas vegetales, como etileno y ácido salicílico; etc. (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Shirasu y Schulze-Lefert, 2003). La HR se visualiza como manchas necróticas en el sitio de ingreso del patógeno y comienza a las pocas horas del contacto con el patógeno (Nimchuk *et al.*, 2003; Greenberg y Yao, 2004). De acuerdo con Mysore y Ryu, en la resistencia no hospedadora de tipo I el patógeno no puede superar las barreras preformadas ni las respuestas de defensa inducidas por factores generales del patógeno u otras PAMPs. En la respuesta no hospedadora de tipo II el patógeno es capaz de superar las defensas preformadas (Mysore y Ryu, 2004). La resistencia de la planta a un determinado patógeno sin HR, sugiere que la HR puede ser el resultado del estadio final de la respuesta de resistencia cuando es alcanzado un determinado nivel celular de señales de estrés y defensa (Morel y Dangl, 1997). En las interacciones que ocurren entre patógenos biotróficos obligados con las células de la planta, la muerte celular privaría al patógeno del acceso a nutrientes y un entorno donde proliferar. En interacciones con patógenos necrotróficos o hemibiotróficos, el rol de la HR está menos claro, ya que estos patógenos pueden obtener nutrientes a partir de células muertas de la planta.

Los patógenos exitosos son capaces de superar la PTI por medio de efectores secretados que suprimen las respuestas de defensa PTI, lo que resulta en la nueva susceptibilidad hacia el patógeno. En bacterias patógenas, las proteínas efectoras son inyectadas en la célula vegetal a través del Sistema de Secreción Tipo III (SST3) (Hueck, 1998; Schechter *et al.*, 2004; Büttner y Bonas, 2002). Los efectores son factores de virulencia bacterianos que modifican proteínas de la planta con el objeto de interferir con el reconocimiento a nivel de la membrana plasmática o mediante la secreción de otras proteínas efectoras dentro del citosol de las células vegetales. Esto último, probablemente altera la señalización de resistencia o la manifestación de la respuesta de defensa por parte de la planta. Las proteínas efectoras liberadas dentro de la célula vegetal pueden tener actividad enzimática. Estas enzimas, son las responsables de modificar las proteínas del hospedador potenciando la acción virulenta del patógeno o evadiendo la detección de los sistemas de defensa de la planta (Bent y Mackey, 2007; Boller y Felix, 2009).

Por su parte, las plantas han respondido evolutivamente a estos efectores a través el desarrollo de las proteínas R citoplásmicas que reconocen (la presencia o actividad) de efectores individuales (Thomma *et al.*, 2011). Las proteínas R pueden ser receptores transmembrana con o sin dominio quinasa, quinasas citosólicas o proteínas citosólicas que posean dominios de unión a nucleótidos (NBS, del inglés Nucleotide Binding Sequences). Excepto las quinasas citosólicas, todas tienen repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés Leu^cin^e-Rich Region), que participan en las interacciones proteína-proteína (Innes, 2004). Análisis de secuencias muestran que las superficies de los dominios LRR que hacen contacto con los ligandos se encuentran en un proceso de diversificación, consistente con la idea de que estos dominios son los que interactuarían con las proteínas del patógeno (Innes, 2004). Dentro de las proteínas R, las que poseen dominios NBS-LRR son el mayor grupo y se pueden subdividir en dos clases: las TIR-NBS-LRR, con dominios similares a los receptores Toll de *Drosophila melanogaster* e Interleuquina 1 (I-1) de humanos; y las CC-NBS-LRR, que contienen un dominio CC (del inglés, Coiled-Coil). Generalmente los genes R están organizados en grupos de familias multigénicas (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Estas proteínas probablemente se pliegan y mantienen un estado competente para la señalización gracias a la acción de chaperones y co-chaperones citosólicos (Schulze-Lefert, 2004), que además asistirían el ensamblado de las proteínas R en complejos multiméricos para el reconocimiento de factores del patógeno.

El reconocimiento de los efectores por parte de las proteínas R activa otra respuesta inmune, llamada Inmunidad Inducida por Efectores, ETI (del inglés Effector-Trigge^red Immunity). Típicamente, la propensión para desencadenar la respuesta de defensa ETI es específica de la cepa o raza del agente patogénico y se asocia también con la HR, y la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, del inglés Systemic Acquired Resistance) en el hospedador (Thomma *et al.*, 2011). Esta última, inicia respuestas de defensa en tejidos distales del foco de infección, confiriendo una resistencia de amplio espectro para el posterior ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004; Glazebrook, 2005). De esta forma, la respuesta hospedadora o mediada por genes R comparte algunos mecanismos con la respuesta de tipo no hospedadora, como la HR o la síntesis de ROS, pero se diferencia porque depende de genes de resistencia *R* (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006; Mysore y Ryu, 2004). Otra característica de las respuestas ETI reside en que las mismas se

producen más rápido y son más prolongadas y robustas que las producidas en la PTI (Tao *et al.*, 2003; Jones y Dangl, 2006; Tsuda y Katagiri, 2010).

Como resultado de la presión de selección, las cepas del agente patogénico han evolucionado, o bien perdiendo o alterando el efector que es reconocido, o adquiriendo nuevos efectores para suprimir la respuesta ETI. Por otro lado, los receptores de las plantas han evolucionado, o bien reconociendo los efectores obvios, o reconociendo los efectores nuevos, resultando nuevamente en la recuperación de la respuesta ETI. Esto predice que el sistema co-evoluciona con una continua selección de nuevas cepas patogénicas que superan la respuesta ETI y nuevas plantas que reviertan esta pérdida (Thomma *et al.*, 2011). Un modelo co-evolutivo que muestra sencillamente esto, fue planteado por Jones y Dangl en el año 2006, y es conocido como Modelo de Zigzag (Figura 1.2). De acuerdo con este modelo, los fitopatógenos discriminan dos fases de la inmunidad de las plantas: PTI desencadenada por PAMPs y ETI desencadenada por los efectores, existiendo entre estas etapas o fases las llamadas ETS (del inglés Effector-Triggered Susceptibility), en las cuales los efectores desarrollados por el patógeno no tienen proteínas que los contrapongan, obteniendo nuevamente una ventaja sobre las defensas de la planta (Jones y Dangl, 2006). A pesar de esta distinción entre los tipos de defensa PTI y ETI, la evidencia acumulada indica que no todos los inductores de defensa microbianos pueden ajustarse de acuerdo con esta clasificación; mientras algunos efectores se encuentran ampliamente distribuidos, algunos PAMPs se encuentran pobremente conservados o contribuyen a la virulencia del patógeno. Como los efectores podrían desencadenar respuestas de defensa y los PAMPs podrían ser requeridos para la virulencia, no se pueden clasificar los componentes singulares exclusivamente dentro de estos dos términos (Thomma *et al.*, 2011). Por lo tanto, recientemente se ha propuesto que no se puede mantener estrictamente la diferencia entre M/PAMPs y efectores, ni entre proteínas PRRs y proteínas R, y por lo tanto tampoco pueden mantenerse estrictamente entre PTI y ETI, indicando que más acorde a lo observado es la existencia de un proceso continuo entre PTI y ETI. En apoyo a esta última idea, se ha argumentado que la resistencia de la planta está determinada por receptores de inmunidad que reconocen ligandos apropiados a fin de activar las defensas, cuya amplitud estaría determinada por el nivel requerido para una inmunidad efectiva (Thomma *et al.*, 2011).

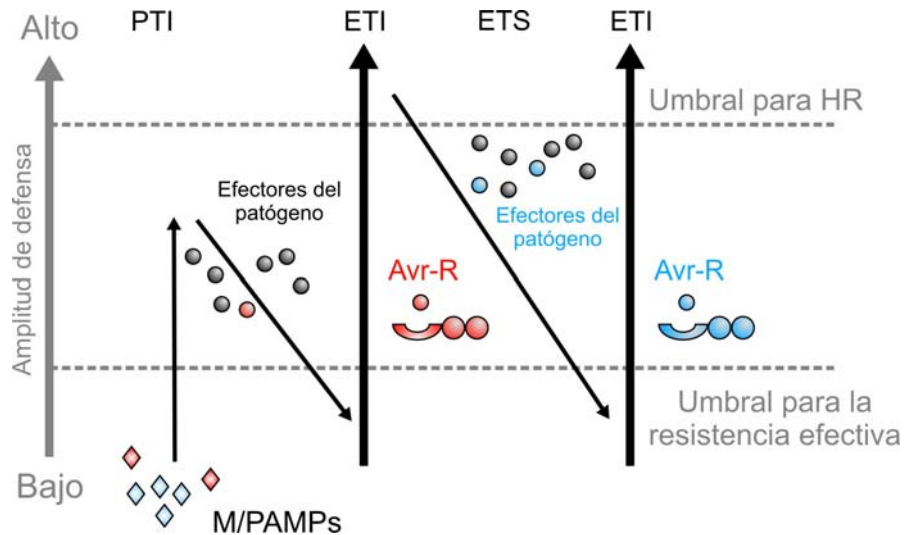


Figura 1.2. Modelo de Zigzag que ilustra el rendimiento cuantitativo del sistema inmune de las plantas. En este esquema, la amplitud máxima de la resistencia a enfermedades o la susceptibilidad es proporcional a $PTI + ETS + ETI$. En la fase 1, las plantas detectan a los microorganismos/patógenos asociados a través de patrones moleculares (M/PAMPs, diamantes rojos) a través de proteínas PRRs para activar la inmunidad activada por PAMPs (PTI). En la fase 2, los patógenos exitosos poseen efectores que interfieren con la PTI, lo que resulta en la susceptibilidad activada por efectores (ETS). En la fase 3, una proteína efectora (indicado en rojo) es reconocida por una proteína NB-LRR, produciendo la inmunidad activada por efector (ETI), una versión amplificada de PTI que a menudo sobrepasa un umbral para la inducción de la muerte celular hipersensible (HR). En la fase 4, se seleccionan las cepas de patógenos que han perdido el efector rojo, y tal vez ganados nuevos efectores a través del flujo horizontal de genes (en azul), estos pueden ayudar a los agentes patógenos para reprimir la ETI. Esta selección favorece las plantas cuyos nuevos alelos NB-LRR pueden reconocer uno de los efectores de reciente adquisición, resultando de nuevo en el desarrollo de ETI.

Adaptado de: Jones y Dangl, 2006.

1.2. Cancrosis de los Cítricos

La Cancrosis de los Cítricos es una enfermedad que afecta al género *Citrus* en todo el mundo y produce grandes daños económicos. Fue registrada por primera vez en la India y Java a mediados del siglo XIX (Graham *et al.*, 2004). En Sudamérica se encontró primero en Brasil y posteriormente en otros países de la región, incluyendo la Argentina en 1933, donde la enfermedad es considerada endémica desde 1990. En nuestro país esta enfermedad fue introducida en el litoral argentino, desde donde se expandió rápidamente hacia las zonas más productoras de cítricos. Su origen preciso nunca pudo ser trazado, pero su aparición fue coincidente con la difusión mundial de la enfermedad. La intensidad de la enfermedad varía en cada plantación de acuerdo con la susceptibilidad de la variedad y el manejo, y además cambia en cada campaña de acuerdo a las condiciones ambientales (SENASA, www.senasa.gov.ar).

En muchos países está sujeta a estrictos programas de cuarentena y erradicación, que incluyen la remoción y destrucción de los árboles afectados, y todos aquellos que están a una distancia determinada (aproximadamente 30 metros), por ser considerados expuestos a la enfermedad (Stall *et al.*, 1980; Graham *et al.*, 2004). En Argentina, en comparación con otras plagas, la pérdida de productividad debido a la Cancrosis de los Cítricos es relativamente baja, y el costo de los tratamientos de control adicionales no es en general significativo. La pérdida económica más importante es causada por las restricciones cuarentenarias impuestas por países libres de la enfermedad a los frutos provenientes de áreas afectadas, lo que limita considerablemente las posibilidades de exportación y expansión del mercado (SENASA, www.senasa.gov.ar).

Algunas medidas preventivas hacia la enfermedad incluyen: la aplicación de bactericidas a base de cobre en forma de aerosol, lo que reduce la población bacteriana en la superficie de las hojas debido a la falta de un sistema de eliminación de este ión metálico en la bacteria; y la desinfección de las maquinarias y ropa de los trabajadores, para evitar la dispersión de material contaminado con las bacterias a través de grandes distancias (Graham *et al.*, 2004). En función de la situación que las distintas zonas productoras de cítricos del país presentan respecto de las problemáticas fitosanitarias, se elaboran programas y planes pilotos específicos, conjuntamente a cargo del SENASA, el INTA, Universidades, gobiernos

provinciales, municipios y asociaciones de productores de cítricos (SENASA, www.senasa.gov.ar).

Se han descrito diferentes tipos de cancrrosis a lo largo de todo el mundo. Dado que los síntomas suelen ser similares, la identificación y separación de estas formas entre sí se basa en el rango de hospedadores y otras características fenotípicas y genotípicas de las cepas patogénicas. De esta forma, se pueden clasificar básicamente en:

- **Cancrosis A o Cancrosis Asiática:** causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, es por lejos la forma de esta enfermedad más diseminada en el mundo, y también la más grave ya que afecta a todos los tipos de cítricos (incluyendo híbridos).
- **Cancrosis B:** causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*, es una enfermedad cancrótica de menor importancia que afecta plantas de limón en Argentina, Paraguay y Uruguay. El limomero mexicano, el naranjo agrio y el pomelo también son susceptibles.
- **Cancrosis C:** también causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*, fue identificada en 1970 en plantas de limonero mexicano en San Pablo, Brasil, pero rara vez se ha encontrado desde entonces. El único otro hospedador natural conocido para esta bacteria es el naranjo agrio.
- **Cancrosis E o Cancrosis de Vivero:** descubierta en plantas de citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) de viveros en el estado de Florida en 1984. Aunque las lesiones en las hojas, tallos y frutos no se desarrollaron, la cepa se nombró *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa E. Más tarde, la enfermedad se renombró como “Mancha Bacteriana de los Cítricos” y la bacteria reclasificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*.

Todos los cultivares de cítricos son susceptibles a la cancrrosis, variando entre éstos el grado de sensibilidad (Gottwald *et al.*, 2002). Gran cantidad de especies de cítricos, variedades y cruza se estudiaron y en ninguna existió un nivel importante de resistencia cuando se inocularon con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. La resistencia mínima observada, si así lo fue, se correlacionó con el tamaño y el número de estomas disponibles para permitir la entrada de las bacterias en la planta por el viento y/o la lluvia (Gottwald *et al.*, 1993). En la Tabla 1.1 se detallan algunas

especies y variedades de cítricos, y su grado de susceptibilidad o resistencia a las bacterias (Gottwald *et al.*, 2002).

Clasificación	Cultivar de cítrico
Altamente resistente	<u>Calamondin</u> (<i>C. mitus</i>); <u>Kinotos</u> (<i>Fortunella spp.</i>)
Resistente	<u>Mandarinas</u> (<i>C. reticulata</i>) Ponkan, Satsuma, Tankan
Menos susceptible	<u>Tangerinas, Tangelos</u> (híbridos de <i>C. reticulata</i>) Cravo, Dancy, Emperador, Fremont, entre otras; <u>Naranjas dulces</u> (<i>C. sinensis</i>) Berna, Coco, Pera y Valencia, entre otras; <u>Naranja agria</u> (<i>C. aurantium</i>)
Susceptible	<u>Naranjas dulces</u> (<i>C. sinensis</i>) Hamlin, Marrs, Navels, Parson Brown, Piralima, Rubí, Earlygold, Tarocco; <u>Tangerinas, Tangelos</u> Clementine, Orlando; <u>Pomelo</u> (<i>C. grandis</i>); <u>Limas</u> (<i>C. latifolia</i>) Tahití; <u>Citrumelos</u> (híbridos de <i>P. trifoliata</i>)
Altamente susceptible	<u>Pomelo</u> (<i>C. paradisi</i>); <u>Lima mexicana</u> (<i>C. aurantiifolia</i>); <u>Limonos</u> (<i>C. limon</i>)

Tabla 1.1. Susceptibilidad/resistencia relativa a la Cancrosis de los Cítricos de cultivares y especies comerciales de cítricos Adaptado de: Gottwald *et al.*, 2002.

Las condiciones medioambientales tales como temperatura, humedad relativa, viento y lluvia condicionan la intensidad de la infección (Canteros, 1998), siendo la temperatura óptima para el desarrollo de esta entre 20 °C y 30 °C (Koizumi, 1977). Se ha encontrado además, que todos los tejidos aéreos (con crecimiento sobre la tierra) y que se encuentran durante la última mitad de la fase de expansión de crecimiento son más susceptibles al establecimiento y desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad se caracteriza a simple vista por síntomas como lesiones eruptivas pequeñas de entre 2 a 10 mm, circulares y con el aspecto de ampolla mojada que crecen dentro de pústulas esponjosas blancas o amarillas en el comienzo de la infección. Los márgenes de las lesiones muestran un aspecto húmedo y a menudo están rodeadas por halos cloróticos (Brunings y Gabriel, 2003). Luego, estas pústulas se oscurecen a coloraciones canela claro a marrón y engrosan formando un cancro marrón, corchoso y rugoso al tacto (Figura 1.3). Las

lesiones pueden hallarse en ambas superficies de hojas jóvenes, vástagos y en frutos en desarrollo. En los frutos los canchros son más profundos pero no llegan a penetrar la cáscara, aunque la muerte del tejido vegetal facilita el ingreso de hongos que aceleran el proceso de putrefacción. En árboles muy infectados puede ocurrir defoliación y abscisión prematura de los frutos (Brunings y Gabriel, 2003).



Figura 1.3. Efectos característicos encontrados en frutos, tallos y hojas de plantas de naranja afectadas por Xac, se pueden apreciar las lesiones causadas por la enfermedad en cada uno de estas estructuras vegetales.
Fuente: www.fundecitrus.com.br/

El agua de lluvia transportada con el viento es el principal medio de dispersión de la bacteria, observándose que vientos con una velocidad mayor o igual a 8 metros por segundo ayudan en la penetración de la bacteria a través de los poros estomáticos o heridas provocadas por tormentas o insectos, como ser el Minador de los Cítricos (*Phyllocnistis citrella*). El tamaño del poro estomático es crítico en la resistencia a la entrada de la bacteria; observándose que la estructura del estoma influye en ésta. La infección también depende de diferencias en la formación de la cutícula de las células guarda y diferencias estructurales del estoma (Stall *et al.*, 1982). Por otra parte, se encontró que en hojas jóvenes (de entre dos y tres semanas de edad), la cavidad frontal del poro estomático se encuentra abierta, mientras que en hojas maduras presenta una estrecha abertura entre los bordes de la cutícula de las células guardas (Stall *et al.*, 1982).

1.3. El género *Xanthomonas*

El género *Xanthomonas* comprende bacterias Gram negativas, aeróbicas obligadas, y pertenecientes al grupo de las γ -proteobacterias. Estas bacterias poseen forma de bacilos, midiendo entre los 0,2 y 0,6 μm de diámetro y entre los 0,8 y los 2,9 μm de largo (Swings y Civerolo, 1993; Moreira *et al.*, 2005). Presentan típicamente un único flagelo polar, y poseen una temperatura óptima de crecimiento de entre 25 °C y 30 °C (Bradbury, 1984). Son usualmente de color amarillo, origen del nombre del género, debido a la producción del pigmento xantomonadina de ese color que poseen unido a la membrana (Jenkins y Starr, 1985). Otra característica común entre las especies pertenecientes al género es la habilidad para formar colonias mucoides cuando son crecidas en medios de cultivos suplementados con glucosa. Este fenotipo resulta de la producción de grandes cantidades del polisacárido extracelular (EPS) conocido como xantano, el cual se genera por la actividad de los productos del operón *gum* (Katzen *et al.*, 1996). Este EPS es un pentámero repetido compuesto de dos subunidades de glucosa, dos subunidades de manosa y una subunidad de ácido glucurónico, y contiene algunas modificaciones tales como la acetilación (Ielpi *et al.*, 1993; Coplin y Cook, 1990).

Poseen una amplia distribución ambiental causando enfermedades en varias especies vegetales. Más de 124 especies de monocotiledóneas y 268 dicotiledóneas son hospedadores de especies de *Xanthomonas*, aunque también existen otro grupo de especies que, si bien proporcionan un nicho, no son hospedadoras de las bacterias de este género (Leite *et al.*, 1994). Ejemplos de especies de plantas hospedadoras lo constituyen especies de árboles frutales, solanáceas, brasicáceas y cereales (Hayward, 1993).

Dentro del género *Xanthomonas* hay más de 140 variedades patogénicas (patovares) diferentes (Hayward, 1993). La clasificación se diversifica más aún al describir la especificidad de raza (o variedad), la que es determinada por los genes de avirulencia (Leach y White, 1996). Estas bacterias, causan una gran variedad de síntomas en las plantas incluyendo necrosis, cancrrosis, puntos y manchas, afectando a diversas partes de las plantas, incluyendo hojas, tallos y frutos (Leyns *et al.*, 1984). Los miembros del género *Xanthomonas* se agruparon inicialmente en especies separadas tomando como base su rango de hospedadores, pero según la nomenclatura clásica más tarde la mayoría de las especies se fusionaron en la única

especie *Xanthomonas campestris*, una de las especies más estudiadas del género, y fueron subgrupadas en diferentes patovares (Dye y Lelliott, 1974; Starr, 1981). Debido a varias reclasificaciones taxonómicas, la nomenclatura de las aproximadamente 19 especies actuales y más de 140 patovares sigue siendo objeto de debate en la actualidad (Schaad *et al.*, 2000; Vauterin *et al.*, 2000; Rademaker *et al.*, 2005).

1.3.1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, el agente causal de la Cancrosis de los Cítricos

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) posee todas las características del género (Figura 1.4) e infecta a plantas Rutáceas, principalmente especies del género *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*. Las especies o grupos de especies que son utilizadas como hospedadoras por este patógeno son conocidas como rango de hospedador, el cual es indicado como patovar. Xac es el agente causal de la Cancrosis de los Cítricos, reconocida en la actualidad como una de las enfermedades más peligrosas y perjudiciales para los cítricos en todo el mundo, debido a los daños en el rendimiento y calidad de la fruta, y a que actualmente no existen medidas de control eficaces contra la misma. Se sabe que el xantano no juega un rol esencial en las etapas iniciales de la Cancrosis de los Cítricos o en interacciones incompatibles entre Xac y plantas no hospedadoras, pero facilita el mantenimiento de las bacterias en la planta hospedadora, posiblemente mejorando la eficiencia de la colonización de tejidos lejanos (Dunger *et al.*, 2007).

A diferencia de otras bacterias fitopatógenas del género como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que también ingresa a la planta hospedadora a través de heridas y se esparce sistémicamente por el xilema generando putrefacción y marchitamiento (Alvarez *et al.*, 1994), las lesiones causadas por Xac quedan confinadas al sitio de ingreso de la bacteria sin convertirse sistémica.

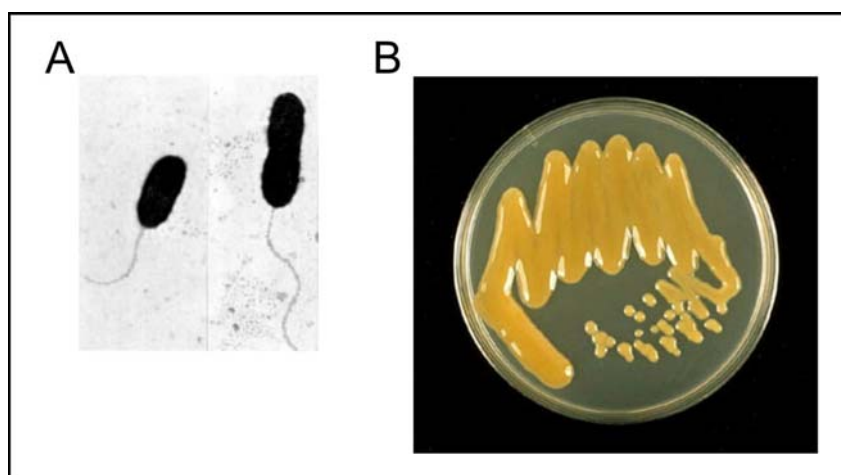


Figura 1.4. La bacteria agente causal de la Cancrosis de los Cítricos, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* tiene forma de bacilo y posee un único flagelo polar tal como se puede observar por microscopía electrónica (A). Las colonias de este género de bacterias se caracterizan por ser de color amarillas, y además tener un aspecto mucoso debido a la excesiva producción del exopolisacárido xantano (B).

Fuente: www.apsnet.org/

En 1999, debido al éxito del secuenciamiento del fitopatógeno *Xylella fastidiosa* y de la ocurrencia de infecciones en cultivos de cítricos con Cancrosis de los Cítricos, se eligió la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* para ser secuenciado su genoma; el cual se realizó por un consorcio de laboratorios de investigaciones del Estado de San Pablo, Brasil (da Silva *et al.*, 2002). De esta forma, se determinó que Xac posee un cromosoma circular de 5,1 Mpb y dos plásmidos naturales, pXAC33 (de un tamaño de 33,7 kpb) y pXAC64 (de un tamaño de 64,9 kbp). Fueron identificados un total de 4313 posibles regiones codificantes (ORFs, del inglés Open ReadinG Frames), aproximadamente 2710 ORFs poseen homología con proteínas existentes en las bases de datos, 1272 presentan homología con proteínas de función desconocida, y 331 no presentan ninguna homología con las proteínas de las bases de datos (da Silva *et al.*, 2002).

Comparaciones hechas en escala genómica con patógenos tanto de animales como de plantas identificaron la presencia de sistemas conservados para la exportación de proteínas, tal como el Sistema de Secreción Tipo III (Dunger *et al.*, 2005), mecanismos asociados a la virulencia para la obtención de hierro y estrategias de patogenicidad convergentes. De las proteínas encontradas en Xac, muchas están asociadas a la patogenicidad, virulencia y adaptación, por lo menos potencialmente. Algunos ejemplos son: las proteínas de avirulencia de la familia AvrBs3/PthA, proteínas componentes de varios sistemas de secreción bacterianos, proteínas asociadas a la degradación de la pared celular del hospedador, enzimas

envueltas en la síntesis de exopolisacárido, más de 100 enzimas posiblemente involucradas en la producción de toxinas y detoxificación, y proteínas implicadas en los mecanismos de adaptación a condiciones de crecimiento atípicas, entre muchas otras (da Silva *et al.*, 2002). Otros genes relevantes identificados en Xac son los que codifican para proteínas involucradas en la adhesión bacteriana (Gottig *et al.*, 2010), y un mimetizador de un modulador de la homeostasis de las plantas encontrado únicamente en esta especie bacteriana (Gottig *et al.*, 2008; Garavaglia *et al.*, 2010).

Como otras bacterias patógenas, Xac regula la expresión de muchos de sus genes de patogenicidad a través de moléculas de señalización que son secretadas al medio extracelular y se acumulan a medida que aumenta el número de células bacterianas o en respuesta a distintos factores ambientales (*Quorum Sensing*). Por medio de sistemas reguladores transcripcionales de dos componentes, la bacteria sensa estas moléculas de señalización difusibles y activa cascadas de transducción de señales que regulan la expresión de distintos genes (Brunings y Gabriel, 2003).

1.3.2. El ciclo infectivo de Xac

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* persiste sobre la superficie de la planta como epífita, en un estado durmiente y pasivo. Para comenzar con el ciclo infectivo (Figura 1.5), la bacteria ingresa en las plantas hospedadoras por acción de la lluvia o fuertes vientos a través de estomas o de heridas en tejidos jóvenes de hojas, frutos y vástagos. Una vez que ha ingresado, se dirige hacia el sitio de colonización y se establece en el espacio intercelular (apoplasto) del tejido meristemático y del parénquima de hojas, tallos y frutos, donde se produce el aumento (hipertrofia) y división (hiperplasia) celular en el sitio de contacto con el patógeno (Lawson *et al.*, 1989; Swarup *et al.*, 1991). Estos cambios producen una pérdida del espacio libre intercelular que pone en contacto las paredes celulares y aumenta el ingreso de agua desde el xilema por capilaridad, facilitando la dispersión dentro del tejido (Brunings y Gabriel, 2003). Posteriormente, las lesiones se elevan, engrosan y oscurecen dando como resultado el cancro característico. Finalmente, la epidermis se rompe permitiendo la salida de la bacteria hacia la superficie de la planta, que eventualmente será dispersada nuevamente por las lluvias y vientos, dando comienzo a nuevos ciclos de infección (Brunings y Gabriel, 2003). El agua de lluvia colectada desde el follaje de cítricos que presenta lesiones cancróticas puede contener entre 10^5 y 10^7 UFC/ml (Stall *et al.*, 1980; Goto, 1992).

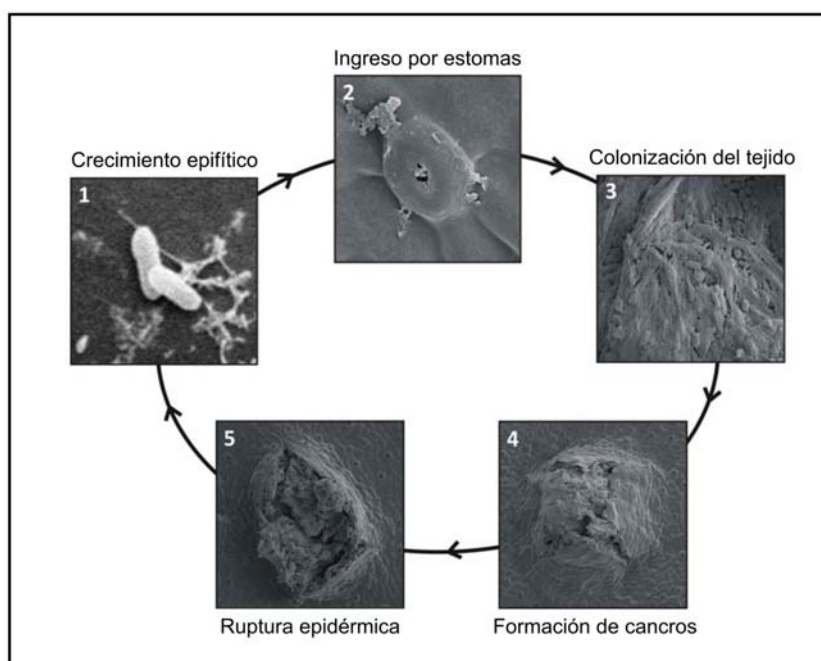


Figura 1.5. Ciclo de vida de Xac durante la Cancrosis de los Cítricos. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infecta hojas, tallos y frutos. Las bacterias persisten como epifitas sobre la superficie de la planta (1) antes de entrar a la misma principalmente a través de los estomas y heridas (2). La infección se visualiza en forma de manchas circulares en la superficie abaxial de las hojas. Las bacterias colonizan el apoplasto (3) y las lesiones se elevan, engrosan y oscurecen dando como resultado el cancro característico (4). La epidermis de la hoja se rompe como consecuencia de la hiperplasia celular inducida por el patógeno (5) permitiendo la liberación de las bacterias y su dispersión por el viento y la lluvia para iniciar un nuevo ciclo de infección. Adaptado de: Gottig *et al.*, 2010.

Es importante destacar que Xac es una bacteria incapaz de sobrevivir fuera de la lesión en la planta hospedadora por lapsos de tiempo prolongados. Las bacterias permanecen con vida en las márgenes de las lesiones en hojas y frutos hasta que éstos caen de la planta. También, se ha reportado que Xac puede vivir por años en lesiones sobre la corteza leñosa de plantas cítricas (Goto, 1992). Cuando la bacteria queda expuesta en la superficie de hojas y frutos a la acción directa de rayos solares, la bacteria muere en pocas horas por deshidratación (Graham *et al.*, 2000). En estudios previos, se determinó que Xac puede sobrevivir unos pocos días sobre el suelo, y meses si se encuentra sobre hojas en descomposición sobre el suelo (Graham *et al.*, 1989). Por otro lado, en estudios realizados sobre superficies inertes, como metal, plástico, ropa y madera procesada, indicaron que los inóculos bacterianos expuestos mueren entre 24 y 72 horas luego de la aplicación (Graham *et al.*, 2000).

1.4. Los sistemas de secreción bacterianos y su importancia

Tal vez los mecanismos más potentes y sofisticados utilizados por las bacterias para manipular su entorno son los sistemas de secreción de macromoléculas que operan en el transporte de proteínas y/o ADN, a través de la envoltura bacteriana hacia el medio extracelular. La secreción de proteínas dentro del espacio extracelular es importante para todas las bacterias, y en particular media las interacciones entre las bacterias patógenicas o simbióticas con sus hospedadores eucariotas, ya que son la primera línea en la interacción hospedador-microorganismo. Hasta la fecha, seis tipos de sistemas de secreción, Tipo I a Tipo VI han sido caracterizados en las bacterias Gram negativas. Si bien, los descubrimientos de la gran mayoría datan desde hace ya varias décadas, de otros no se tiene mucha información en la actualidad. Ellos difieren en cuanto a los mecanismos de secreción, las proteínas que lo componen y los sustratos secretados (Figura 1.6).

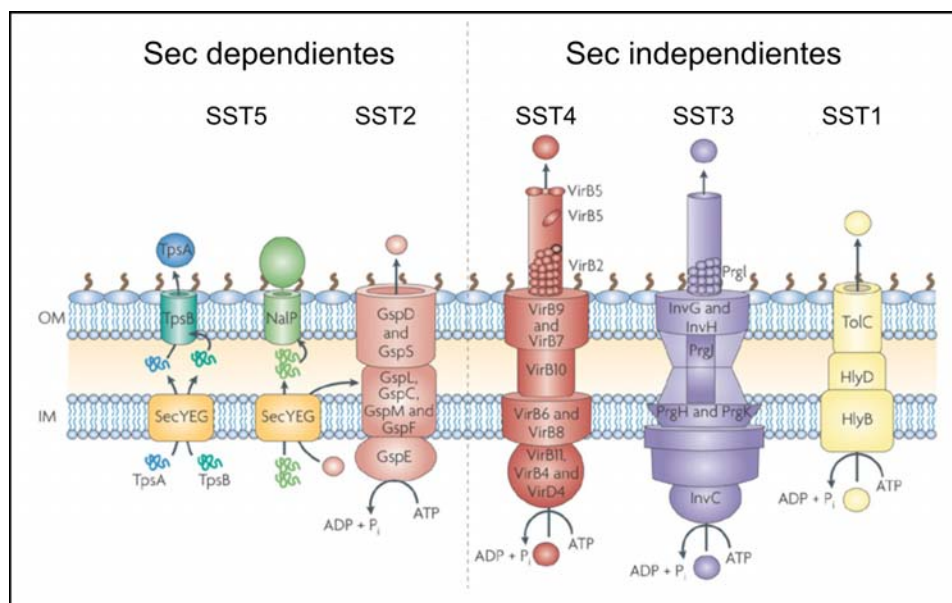


Figura 1.6. Esquema representativo de los distintos sistemas de secreción de macromoléculas encontradas en bacterias. Se muestran los componentes de cada uno, además de una división entre los Sistema Sec dependientes e independientes. No se muestra el Sistema de Secreción Tipo VI. Adaptado de Fronzes *et al.*, 2009.

Los Sistemas de Secreción Tipo III, IV y VI se destacan de los otros porque permiten la translocación de macromoléculas en el interior de las células blanco, donde puede realizar funciones que promuevan la supervivencia bacteriana y, a

menudo poner en peligro la salud de los hospedadores, tanto animales como plantas.

Los Sistemas de Secreción Tipo I (SST1s) son sistemas simples, tripartitos que facilitan el paso de proteínas de diferentes tamaños a través de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas. Se componen de un casete de unión a ATP (ABC, del inglés ATP Binding Cassette) transportador o un antiportador de protón, una proteína adaptadora ubicada entre la membrana interna y la membrana externa, y un poro en la membrana externa. Ellos secretan sustratos en un sólo paso sin la necesidad de un intermediario periplásmico estable. Los SST1s están involucrados en la secreción de citotoxinas pertenecientes a la familia de proteínas RTX (del inglés, Repeats-in-Toxin), de proteínas de la capa superficial celular, proteasas, lipasas, bacteriocinas y proteínas de adquisición de grupos hemo (Omori e Idei, 2003). No se ha demostrado que este sistema de secreción contribuya a la virulencia en especies del género *Xanthomonas* (Büttner y Bonas, 2010).

Los Sistemas de Secreción Tipo II (SST2s) son máquinas multicomponentes que utilizan un mecanismo de dos pasos para la translocación. Durante el primer paso, el efector de la proteína precursora se transloca a través de la membrana interna por el Sistema Sec o la vía Tat (del inglés Twin-arginine translocation) (Voulhoux *et al.*, 2001). Una vez en el periplasma, la proteína efectora se transloca por el SST2 a través de la membrana externa. El translocón SST2 consiste en 12 a 16 proteínas componentes (Filloux, 2010) que se encuentran en ambas membranas bacterianas, citoplasma y periplasma. Los SST2s son conocidos por secretar muchas enzimas que degradan la pared de las células vegetales como celulasas, xilanasas, lipasas y proteasas, entre otros. Cada especie tiene su conjunto único de enzimas, que ayudan a degradar los componentes de la pared celular de las plantas, por lo tanto ayudando en la patogénesis (Jalan *et al.*, 2001). Se ha demostrado que varios sustratos de SST2 no sólo afectan la virulencia sino que también inducen respuestas de defensa de las plantas. El SST2 y sus sustratos son controlados por reguladores del SST3 (Guo *et al.*, 2011).

Los Sistemas de Secreción Tipo III (SST3s), también llamados inyectisomas, median un mecanismo de secreción en un sólo paso y son utilizados por muchos agentes patogénicos tanto de animales como de plantas, incluyendo especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, las especies de *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) y Enterohemorrágica (EHEC), y *Pseudomonas*

aeruginosa. Los SST3s translocan las proteínas efectoras al citoplasma de la célula eucariota del hospedador en una manera Sistema Sec independiente. Los SST3s están genéticamente, estructuralmente y funcionalmente relacionados con la estructura flagelar bacteriana (Cornelis y van Gijsegem, 2000). Están compuestos de más de 20 proteínas diferentes, que forman una gran estructura supramolecular que atraviesa la envoltura de célula bacteriana (Cornelis y van Gijsegem, 2000; Galán y Wolf-Watz, 2006). Existen una gran variedad de trabajos donde se detalla y remarca la importancia de este sistema de secreción en la patogenicidad de la especie (Dunger *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2005).

Los Sistemas de Secreción Tipo IV (SST4s) son sistemas versátiles que se encuentran en las bacterias Gram negativas y Gram positivas y que secretan una amplia gama de sustratos fuera de la célula bacteriana, desde proteínas individuales a complejos proteína-proteína y proteína-ADN. Estos sistemas de transporte se pueden dividir en tres grupos: los sistemas de conjugación, los sistemas para capturar y exportar ADN, y los sistemas de translocación de efectores (Cascales y Christie, 2003; Álvarez-Martínez y Christie, 2009). Contribuyen a la plasticidad de los genomas de bacterias y son vehículos importantes para la difusión de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (de la Cruz y Davies, 2000). La translocación de efectores en el citoplasma de células eucariotas a través de este sistema es esencial para la virulencia de varios patógenos, incluyendo a *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis* y *Leptospira pneumophila*. Los genes que codifican los componentes estructurales del SST4 están generalmente dispuestos en un único locus. En *Agrobacterium tumefaciens*, son un total de 12 proteínas, donde todas, excepto una, son esenciales para la función correcta del sistema (Berger y Christie, 1994).

Los Sistemas de Secreción Tipo V (SST5s) incluyen autotransportadores y sistemas de secreción de dos componentes (en inglés, Two-partner Secretion System). Los SST5s translocan sustratos en dos pasos (Henderson *et al.*, 2004). Las proteínas autotransportadoras son proteínas multidominio que son secretadas como proteínas precursoras a través de la membrana interna en un proceso dependiente del Sistema Sec. Posteriormente, el dominio translocador de la proteína se inserta en la membrana externa y facilita la localización en la superficie del dominio pasajero. En los sistemas de secreción de dos componentes, una proteína translocadora (TpsB) media la secreción de la proteína efectora (TpsA) a través de

la membrana externa. Más de 700 proteínas con funciones que incluyen la auto-agregación, adhesión, invasión, citotoxicidad, propagación célula a célula y proteólisis utilizan estos sistemas secreción para atravesar las membranas tanto interior y exterior durante un proceso sencillo de dos pasos (Henderson y Nataro, 2001; Mazar y Cotter, 2007).

Los Sistemas de Secreción Tipo VI (SST6s) fueron descubiertos recientemente en varios patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* Enteroagregativa, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*. Los SST6s son sistemas multicomponentes que pueden estar compuestos por entre 12 y 25 subunidades proteicas, y transportan efectores a diversos tipos de células, tanto procariontas como eucariotas, participando en la competencia entre las bacterias y en la patogénesis. Recientemente se han publicado trabajos acerca de su arquitectura completa y su función (Russell *et al.*, 2014; Coulthurst, 2013; Zoued *et al.*, 2014).

Xac posee diversos sistemas de secreción de proteínas, entre los que se encuentran los de Tipo I, II, III, IV y V. Un grupo de genes localizados en el cromosoma de Xac codifican para un SST1; y otros dos grupos de genes codifican para el SST2 (van Sluys *et al.*, 2002). En su genoma, Xac cuenta además con los genes de cluster *hrp* que codifican para el SST3. Distintas mutantes de Xac en este sistema de secreción no producen enfermedad en plantas hospedadoras, ni HR en plantas no hospedadoras indicando que en Xac este sistema es esencial para la patogenicidad (Dunger *et al.*, 2005). Se han encontrado dos grupos de genes que estarían relacionados con la biosíntesis y regulación del SST4 (da Silva *et al.*, 2002; Alegria *et al.*, 2004). Este sistema, también media la transferencia intercelular de macromoléculas y moléculas efectoras (Souza *et al.*, 2011; Christie y Vogel, 2000). El análisis del genoma de Xac reveló que existen dos SST4, uno localizado en el plásmido pXAC64 y el otro en el cromosoma principal, aunque este último se encuentra incompleto (Alegria *et al.*, 2004). El SST4 o de conjugación esta localizado en pXAC64 y es necesario para la transferencia de plásmidos que poseen un sitio de movilización u *oriT* (Alegria *et al.*, 2004). Con respecto al SST5 presente en el genoma de Xac, se ha demostrado la funcionalidad de este sistema en la secreción de adhesinas que cumplen un rol muy importante en los estadíos iniciales de infección del patógeno (Gottig *et al.*, 2009).

1.5. El SST3 y el cluster *hrp*

La comunicación a nivel molecular entre una bacteria y la célula hospedadora durante las interacciones simbióticas o parasitarias generalmente es llevada a cabo por proteínas secretadas por la bacteria. La clave para la mayoría de las interacciones patógeno-hospedador es el SST3 presente en la gran mayoría de las bacterias Gram negativas, patógenas tanto de plantas como de animales.

A través de los años, el análisis genético de los factores de virulencia bacterianos demostró que las bacterias patogénicas muchas veces son diferenciadas de las no patogénicas por la presencia de genes específicos de la patogenicidad que están organizados en islas/grupos/clusters de genes que han sido adquiridos en el transcurso de la evolución por transferencia horizontal de genes. El cluster *hrp* (del inglés, hypersensitive response and pathogenicity) es un grupo de aproximadamente 20-25 genes que codifican para la máquina supramolecular que conforma el SST3 (Hueck, 1998, Tampakaki *et al.*, 2004). En los fitopatógenos, los genes *hrp* son importantes determinantes de la patogenicidad. Son necesarios para la capacidad de multiplicarse en plantas susceptibles y causar enfermedades, como también son los responsables de inducir la HR en plantas no hospedadoras u hospedadoras que presentan resistencia (Büttner y Bonas, 2002). El SST3 les permite a las bacterias inyectar proteínas efectoras al citoplasma de las células eucarióticas hospedadoras, estando presente en patógenos animales como: varias especies de los géneros *Yersinia* y *Chlamydia*, *Shigella flexneri*, *S. typhimurium*, *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *P. aeruginosa*; y de plantas como varias especies de los géneros *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Rhizobium* (Hueck, 1998). La mayoría de las proteínas que componen el SST3 están localizadas en la membrana interna de la célula bacteriana, siendo muchas de ellas homólogas del sistema flagelar bacteriano (Blocker *et al.*, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004).

El SST3 siempre fue estudiado por pertenecer estrictamente a las bacterias patogénicas. La identificación de genes de este sistema en bacterias simbióticas, como los rizobios del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Mesorhizobium loti* fue por lo tanto inesperado (Marie *et al.*, 2001). Los rizobios captan el nitrógeno del aire fijándolo en las plantas leguminosas en las que forman nódulos. En la especie *Rhizobium* NGR234, la inducción de la formación de nódulos es co-regulada con la expresión de genes del SST3, sugiriendo que las proteínas secretadas vía SST3, Nops (del inglés, Nodulation proteins), contribuyen en la

simbiosis (Viprey *et al.*, 1998). Dependiendo de la planta hospedadora, la inactivación de los genes del SST3 puede causar un aumento o una disminución del número de nódulos. Curiosamente, el SST3 también está involucrado en la determinación del rango de hospedadoras de los rizobios (Marie *et al.*, 2001; Schmeisser *et al.*, 2009).

El descubrimiento de los mecanismos subyacentes de la patogenicidad bacteriana es un gran foco de investigación, tanto para el desarrollo de aplicaciones prácticas (nuevos diagnósticos y antibióticos), como también para elucidar las interacciones entre las bacterias y las células hospedadoras, a nivel molecular.

1.5.1. Morfología del SST3 y del cluster *hrp*

El SST3 de patógenos es visto como un dispositivo único de transferencia de proteínas, por poseer características valiosas: (I) es capaz de inyectar diversos sustratos y proteínas a través de las dos membranas bacterianas y de la membrana eucariótica, directamente al citosol del hospedador; (II) es activado cuando el patógeno inicia el contacto con las células del hospedador; (III) es capaz de funcionar *in vitro* bajo condiciones apropiadas que mimeticen parámetros claves del ambiente hospedador (Tampakaki *et al.*, 2004).

Estudios por microscopía electrónica revelaron la morfología del aparato del SST3 de patógenos animales, como *E. coli* Enteropatógena. Para los patógenos de plantas solamente la parte extracelular del aparato pudo ser visualizada (Sekiya *et al.*, 2001; He y Jin, 2003). Este aparato es llamado inyectisoma o complejo aguja en patógenos animales, y Pilus Hrp en patógenos vegetales. Estructuralmente, el complejo de patógenos animales está compuesto por un tubo largo, hueco en el centro, con una longitud que va desde los 120 nm a los micrómetros y 6 a 8 nm de diámetro, posee dos dominios distinguibles: uno es la porción que se proyecta hacia el exterior desde la superficie con aspecto de aguja, y el otro dominio es una base cilíndrica que asegura la estructura a las membranas externa e interna de la bacteria (Figura 1.7) (Galán y Collmer, 1999; Galán y Wolf-Watz, 2006). Como se comentó anteriormente, el SST3 tiene características estructurales similares a las encontradas en el sistema flagelar bacteriano (Figura 1.7). Estudios de divergencia génica de los genes del sistema flagelar y del SST3, condujeron a la conclusión de que los dos sistemas son antiguos y derivados de un único ancestro común (Gophna *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2005).

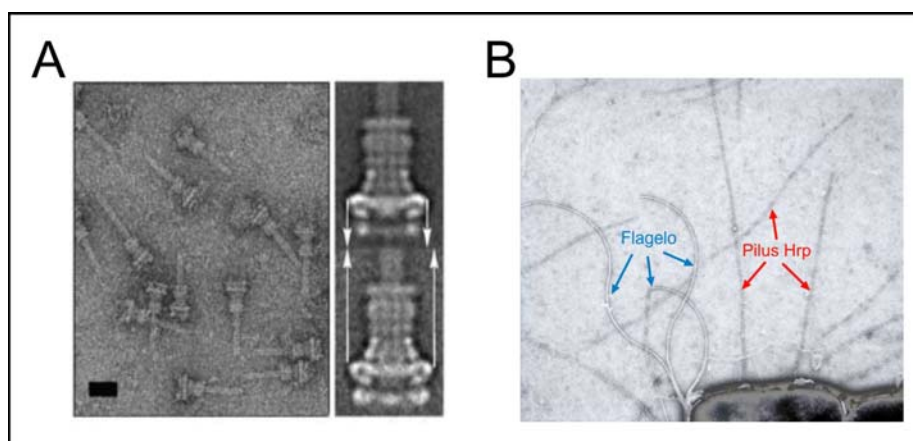


Figura 1.7. (A) Criomicroscopía electrónica que indica la organización estructural detallada del complejo aguja de *S. typhimurium*. (B) Organización filamentosa del SST3 del fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300. Se indican los dos tipos de filamentos: flagelo (azul) y Pilus Hrp (rojo). Adaptado de: Marlovits *et al.*, 2004; He y Jin, 2003.

El SST3 está conservado en cuatro de los mayores géneros de bacterias patógenas de plantas: *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* y *Erwinia*. En *Xanthomonas*, el cluster de genes *hrp* contiene 6 operones, llamados *hrpA* a *hrpF*, aunque también se suelen incluir algunos genes flanqueantes. Un subconjunto de los genes del cluster *hrp* son conservados en patógenos tanto de animales como de plantas; sus genes son comúnmente llamados *hrc* (*hrp* conservados), y son componentes básicos del sistema STT3, tanto de la membrana interna como externa de la bacteria (Bogdanove *et al.*, 1996a; Tampakaki *et al.*, 2004). Estos genes poseen también homología con el aparato de exportación específico del flagelo y están relacionados con eventos tempranos en la biogénesis del mismo (Aizawa, 2001; Tampakaki *et al.*, 2004). Además de los genes *hrc*, el cluster *hrp* está compuesto por genes llamados específicamente *hrp*, encontrados únicamente en cada patógeno particular; por lo general estos genes son lo que conforman el canal por el que se secretan o translocan los efectores, o generan la especificidad hacia un hospedador determinado. Por lo tanto, estos genes suelen tener un grado de identidad estructural básica, y no suelen ser tan conservados. Por último, se encuentran los genes *hpa* (*hrp* asociados), que codifican para proteínas que si bien contribuyen a la patogenicidad y a la inducción de HR en plantas no hospedadoras, no son esenciales para la interacción patogénica entre la bacteria y la planta (Büttner y Bonas, 2006).

Del análisis de secuencia de ADN de Xac se deduce que en esta especie, este agrupamiento génico tiene un tamaño de aproximadamente 23 kpb, y está

compuesto por 25 genes, que van desde *hpa2* a *hpaF*; y que en su totalidad codifica 9 proteínas Hrp, 9 proteínas Hrc y 6 proteínas Hpa, y un ORF no caracterizado aún (da Silva *et al.*, 2002). Las funciones y mecanismos particulares de proteínas Hpa están siendo esclarecidos en los últimos años (Figura 1.8). Por otra parte, el contenido de G+C es diferente a la del resto del genoma y está flanqueado por elementos génicos móviles y genes que codifican para transposasas; todas estas características son indicativas de un evento de transferencia horizontal de genes (da Silva *et al.*, 2002; Brunings y Gabriel, 2003; Dobrindt *et al.*, 2004).

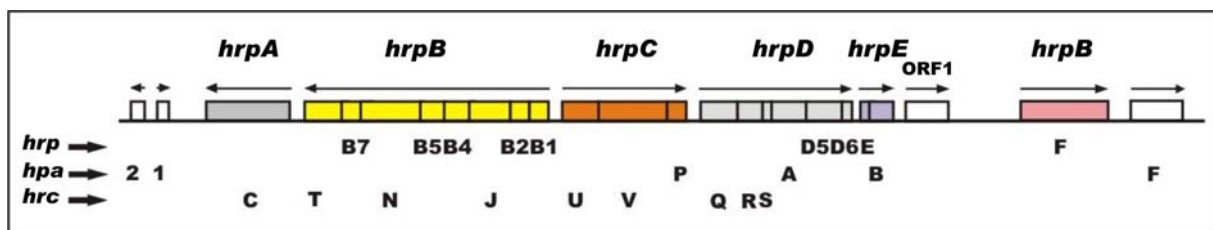


Figura 1.8. Organización del agrupamiento génico *hrp* de Xac. Las flechas indican el sentido de la transcripción para cada gen/operón. Las cajas abiertas corresponden a marcos abiertos de lectura (ORFs). Los genes *hrcC*, *hrcT*, *hrcN*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrcV*, *hrcQ*, *hrcR* y *hrcS* codifican proteínas conservadas entre los sistemas SST3; los genes *hrpB7*, *hrpB5*, *hrpB4*, *hrpB2*, *hrpB1*, *hrpC3*, *hrpD5*, *hrpD6*, *hrpF*, *hpa2*, *hpa1*, *hpaA*, *hpaB*, *hpaP* y *hpaF* codifican proteínas sólo presentes en bacterias patógenas de plantas.

Adaptado de: Dunger *et al.*, 2005.

El núcleo del sistema flagelar está constituido por un trío de proteínas de membrana altamente conservadas, FliP/Q/R, siendo sus homólogos del SST3 de fitopatógenos HrcR/S/T (Figura 1.9). Las proteínas de membrana FliA (HrcV), FliB (HrcU) y FliY (HrcQ) también son conservadas en la mayoría de los fitopatógenos (Preston *et al.*, 2005). FliI (HrcN) es la ATPasa responsable del inicio del transporte de proteínas hacia la membrana interna de la bacteria. La exportación a través de la membrana externa de la bacteria es realizada por una porina, HrcC (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003). Los homólogos de HrcC, el flagelar FlgI, y el perteneciente a *Yersinia* YscC, forman una estructura multimérica, que contiene un poro central en forma de anillo, de unos 20 nm de diámetro (Koster *et al.*, 1997). El poro formado por HrcC, probablemente está cerrado cuando no hay proteínas en tránsito, con el objetivo de evitar comprometer la membrana externa, aunque aún no son conocidos los mecanismos de apertura y cerramiento del canal. FliF (HrcJ) es otro componente del complejo proteico e interactúa con FlgI (HrcC), y posiblemente la función de este componente es la de interactuar con los componentes de la membrana interna y los

de la membrana externa, con el objetivo de estabilizar las membranas (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2005).

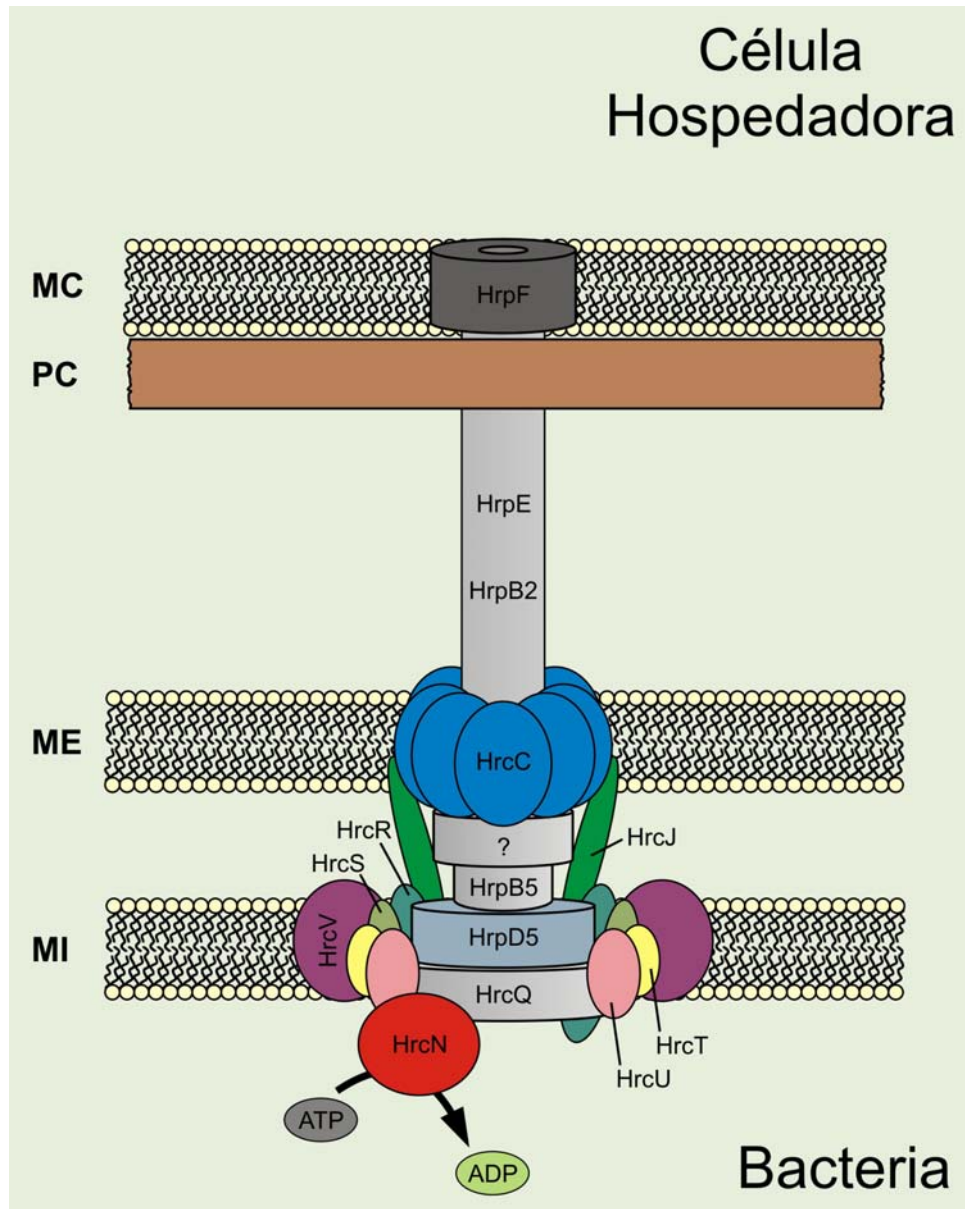


Figura 1.9. Representación esquemática del SST3 de Xac. Se detallan los nombres de los componentes que actualmente se conoce su ubicación y función. Los que aún poseen una ubicación desconocida o dudosa están indicados con un signo de interrogación (?). MC: membrana Celular; PC: Pared Celular; ME: Membrana Externa; MI: Membrana Interna. Adaptado de: Tampakaki *et al.*, 2004; Büttner y He, 2009; <http://www.genome.jp/kegg/>.

1.5.2. Regulación de la expresión de los genes *hrp* en fitopatógenos

Los genes *hrp* se inducen en estadios muy tempranos luego del contacto con el hospedador. En *P. syringae*, se observó que la expresión *in planta* de estos genes se produce 1 hora después de la infección y continúa incrementándose por al menos

6 horas luego del contacto inicial (Rahme *et al.*, 1992). Existen inductores no específicos de la expresión de los genes *hrp* encontrados en plantas que están siendo caracterizados, pero la naturaleza de la señal inductora no es clara aún.

El control de la regulación de la cascada de expresión de los genes *hrp* varía en los diferentes patógenos. Basándose en semejanzas en la organización y regulación de genes, las regiones *hrp* de diferentes patógenos se pueden clasificar en 2 grupos: el Grupo I comprende las especies de los géneros *Erwinia*, *Pantoea* y a *P. syringae*. Por otro lado *R. Solanacearum* y las especies del género *Xanthomonas* pertenecen al Grupo II (Alfano y Collmer, 1996). La expresión de los genes *hrp* del grupo I dependen del activador HrpL, un miembro de la familia de los factores σ alternativos, que se une a un secuencia promotora conservada denominada Caja *hrp*. La expresión del gen *hrpL* está controlada por las proteínas HrpR y HrpS en *P. syringae* y por HrpS, HrpX y HrpY en *Erwinia* y *Pantoea* (Gürlebeck *et al.*, 2006) La expresión de los clusters de genes *hrp* del grupo II está muy bien estudiada en *R. solanacearum*. En esta especie, la inducción es detectada por el receptor de membrana externa PrhA y transmitido a la proteína de transmembrana PrhR y al factor σ PrhI. La activación de PrhI lleva a la expresión de los reguladores PrhJ, HrpG y HrpB, que es homólogo a HrpX de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (Brito *et al.*, 2002). En la regulación de la expresión de los genes *hrp* en *Xanthomonas* son claves las proteínas HrpG y HrpX, que son codificadas por los genes *hrpG* y *hrpX* localizados fuera del cluster *hrp*. HrpG pertenece a la familia de reguladores de respuesta del sistema de dos componentes de la familia OmpR, y controla la expresión de la proteína regulatoria HrpX y de los genes del operón *hrpA* (Wengelnik *et al.*, 1996). HrpX es un activador transcripcional de la familia AraC/XylS y regula la expresión de la mayoría de los genes *hrp* incluidos en los operones *hrpB* a *hrpF*. La expresión de los genes del operón *hrpA*, y del gen *hrpX* es independiente de HrpX (Wengelnik *et al.*, 1996).

Muchos de los genes regulados por HrpX contienen en su región promotora la llamada Caja PIP (del inglés, Plant-Induced Promoter), la cual se sabe que sirve como elemento regulatorio y sitio de unión para HrpX (Wengelnik *et al.*, 1996; Gürlebeck *et al.*, 2006). Las cajas PIP son agrupadas en dos grupos, las perfectas y las imperfectas. Las cajas PIP perfectas poseen la secuencia consenso TTCGB-N₁₅-TTCGB, mientras que las cajas imperfectas poseen una región consenso del tipo

TTCGB-N₈-TTCGB, donde B se refiere a cualquier base excepto adenina (Koebnik *et al.*, 2006).

Los genes *hrp* son también expresados cuando las bacterias son crecidas en medio mínimo (Schulte y Bonas, 1992a y b; Lindgren, 1997). Los factores que afectan la expresión de los genes *hrp* en medio mínimo son diferentes en distintas especies y patovares de fitopatógenos, y de esta manera también lo es la composición de los llamados medios mínimos inductores *hrp*.

1.6. HrpE, la subunidad principal del SST3

El Pilus Hrp de Xcv tiene un diámetro de alrededor de 8 a 10 nm, y puede alcanzar más de 2 μ m de longitud. Estas dimensiones son comparables a las de otros Pilus Hrp, aunque el diámetro parece ser ligeramente más grueso que en los casos de *P. syringae* (6 a 8 nm), de *R. solanacearum* (6,6 nm), y *E. amylovora* (8 nm) (Jin *et al.*, 2001; Roine *et al.*, 1997; van Gijsegem *et al.*, 2000). Análisis de mutantes de Xcv en el cluster *hrp* demostró que la biogénesis del pilus depende de todos los genes *hrp* y *hrc*, excepto para *hrpF*, que codifica para la proteína secretada que constituye el translocón sobre la célula eucariótica. El Pilus Hrp se alarga mediante la adición de subunidades de pilina Hrp en el extremo distal, y también sustratos del SST3 se secretan sólo a partir de la punta del pilus (Jin y He, 2001; Li *et al.*, 2002). En todos los casos estudiados, las subunidades de Pilus Hrp (pilinas) son pequeñas (6 a 11 kDa) e hipervariables, no sólo entre especies diferentes, sino también entre patovares. La pilina Hrp mejor caracterizada hasta el momento, HrpA de *P. syringae* pv. *tomato*, comparte sólo el 27% de identidad de secuencia con HrpA de *P. syringae* pv. *syringae* (Deng *et al.*, 1998).

La proteína HrpE fue identificada como la subunidad principal del Pilus Hrp de Xcv. Esta conclusión está basada en: (1) La proteína HrpE fue el componente predominante de las preparaciones de pilus, que se aisló de acuerdo con un protocolo usado previamente para la preparación de Pilus Tipo IV de *E. coli*. Además, en otro estudio se detectó a HrpE en los sobrenadantes de la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) crecida en un medio inductor del cluster *hrp*, pero no en las de un mutante en el SST3. (2) Los Pili Hrp se marcaron fuertemente por un antisuero anti-HrpE monoespecífico, visto a través del uso de inmunomicroscopía. (3) Mutaciones en *hrpE* conducen a la pérdida del Pilus Hrp, y por ende a la pérdida de la secreción y translocación de efectores, pero pueden complementarse con un cósmido que contenga el gen *hrpE* completo. (4) En base a la similitud de secuencia y orden de los genes (sintenia), el conjunto de genes *hrp* de Xcv está más estrechamente relacionada con los de *R. solanacearum*. El gen *hrpE* de Xcv es sinténico de *hrpY*, que codifica para la subunidad principal de Pilus Hrp de *R. solanacearum* (van Gijsegem *et al.*, 2000). (5) Aunque HrpE no es similar a otras subunidades de pilus de bacterias no relacionadas a las *Xanthomonas* a nivel de secuencia, comparte varias características con estas proteínas, es decir, es pequeña, se prevé que sea predominantemente α -helicoidal y con una propensión

helicoidal más alta en la región carboxilo terminal, y excepcionalmente variable a nivel de secuencia entre varias especies y patovares del mismo género (Koebnik, 2001; Weber *et al.*, 2005).

Es remarcable el hecho de que homólogos de esta proteína sólo se encuentran en otras especies de *Xanthomonas*, y la comparación de las secuencias disponibles de estas pilinas muestra una mitad amino terminal variable, en contraste con la mitad carboxilo terminal altamente conservada, donde los últimos aminoácidos son idénticos (Weber *et al.*, 2005). Estas pequeñas proteínas son muy interesantes debido a su versatilidad funcional. En primer lugar, ya que es un componente externo del SST3 debe ser secretada y por lo tanto necesita una señal de secreción. En segundo lugar, debe ensamblarse en una estructura polimérica extracelular que sea estable y lo suficientemente flexible como para atravesar la pared celular de las plantas (Hu *et al.*, 2001). En tercer lugar, el polímero debe formar un canal interior que permita el paso de las otras pilinas Hrp en sí, de la proteína translocón HrpF, y de más de 20 tipos diferentes efectores (Gürlebeck *et al.*, 2006; Thieme *et al.*, 2007).

A fin de estudiar a la proteína HrpE de Xcv en el SST3 se realizó un análisis utilizando bacterias con distintas mutaciones en *hrpE*, caracterizando las mismas con respecto a la posibilidad de secretar sustratos *in vitro* y de inducir HR en plantas resistentes, o crecimiento en plantas susceptibles. Además, se analizó la morfología del pilus por microscopía electrónica (Weber y Koebnik, 2005). Tomados en conjunto, los resultados sugieren una organización de 3 dominios en HrpE (Figura 1.10). Los primeros 17 residuos amino terminal representan un primer dominio, considerado como la secuencia señal para la secreción por el SST3, aunque se ha encontrado sin embargo, que esta secuencia señal es tolerante a algunas mutaciones, ya que inserciones antes del Trp10 no perturban la funcionalidad (Weber y Koebnik, 2005). En otros trabajos con secuencias señales del SST3 sintéticas se ha demostrado que se requiere que las mismas posean un carácter anfipático para su correcta función (Lloyd *et al.*, 2002). El segundo dominio está constituido por la región central de la proteína, y está delimitado por el residuo Arg11 hasta Asp53. Se sugiere que esta región está expuesta, en gran parte, al exterior del pilus. Esta idea es apoyada por la gran variabilidad que presenta esta región. Sin embargo, esta región también podría contribuir a la estabilidad del Pilus Hrp, ya que algunas mutaciones en ella condujeron a la producción de pili cortos. El tercer

dominio está definido por la región carboxilo terminal, a partir del residuo Glu54, y se propone que la misma está involucrada en el proceso de polimerización del pilus. Además se ha observado una alta conservación de estructuras primarias y secundarias en esta región, entre las diferentes pilinas del género *Xanthomonas* (Weber *et al.*, 2005).

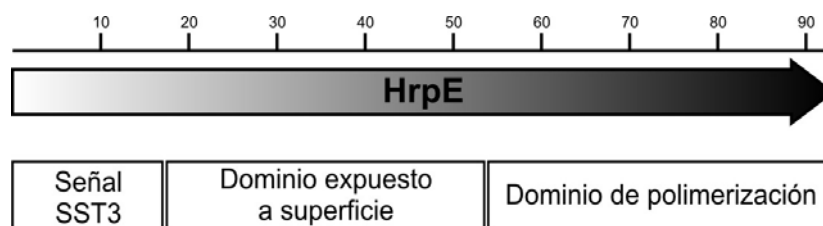


Figura 1.10. Estructura de dominios propuesta para la proteína pilina HrpE de *Xcv*, y de otras especies del género *Xanthomonas*.

Adaptado de: Weber y Koebnik, 2005.

Dentro de la estructura de operones del cluster *hrp*, el gen *hrpE* está situado corriente abajo de *hrpD6* y corriente arriba de *hpaB* (Figura 1.8). A partir de estudios de promotor con fusiones *hrp::Tn3-gus* (β -Glucuronidasa), se sabe que *hrpE* tiene un nivel basal de transcripción en medio rico y que está inducido en el medio definido XVM2 y en planta (Wengelnik y Bonas, 1996). Como se comentó anteriormente, las regiones promotoras de varios genes inducibles en la planta contienen un motivo de secuencia conservada, la Caja PIP. Cuando se analizó la región corriente arriba del codón de inicio de la traducción de *hrpE*, se determinó que no existen cajas PIP u otros elementos de secuencias promotoras. Por lo tanto, para definir el sitio de inicio transcripcional de *hrpE*, se llevaron a cabo experimentos de extensión de cebador. El mapeo de la señal más fuerte indica que la transcripción de *hrpE* se inicia en la adenosina -101 (respecto al codón de inicio de la traducción de *hrpE*) (Weber *et al.*, 2005). De esta forma, y teniendo en cuenta que el codón de stop de la traducción de *hrpD6* está 4 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de *hrpE*, el promotor del gen *hrpE* reside en el operón *hrpD* (Weber *et al.*, 2005).

A pesar la gran cantidad de estudios y trabajos científicos realizados para dilucidar el rol y los mecanismos de HrpE en el ensamblado, secreción y translocación del Pilus Hrp de diversas *Xanthomonas*, poco se conoce sobre otras posibles funciones para esta proteína pilina en las distintas interacciones planta-patógeno. Es por esto que en el presente trabajo de tesis se plantearon diversos

ensayos y análisis que permitieron ampliar estos conocimientos ahondando no sólo en los diferentes efectos que esta proteína genera en las plantas, sino también en aspectos que permitirán a futuro el desarrollo de posibles herramientas para la obtención de plantas resistentes a la Cancrosis de los Cítricos.

1.7. Proteínas harpin, un solo nombre para una gran familia

En términos generales, las harpin son proteínas ricas en glicina que carecen de residuos de cisteína, que se secretan al medio de cultivo cuando se expresa el sistema Hrp, y poseen actividad inductora de HR termoestable cuando se infiltran en las hojas de tabaco y otras plantas (Alfano y Collmer, 1997). Como es característico de las proteínas secretadas por SST3, las harpin carecen de un péptido señal amino terminal. La primera proteína harpin fue descubierta en los sobrenadantes de cultivos de células de *E. coli* que expresaban un grupo de genes *hrp* de *Erwinia amylovora* (Wei *et al.*, 1992). Debido a que mutaciones en el gen *hrpN*, codificante de la proteína harpin en *E. amylovora* disminuía fuertemente el desarrollo de HR en tabaco y la patogenicidad en frutos susceptibles de pera, inicialmente se propuso que las harpin eran las proteínas de virulencia primarias que se secretaban por el SST3 (Wei *et al.*, 1992). El análisis subsiguiente de proteínas harpin de otras bacterias reveló que las mismas difieren sustancialmente en su estructura primaria y en su contribución a las respuestas en las plantas. A pesar de que se encontraron hace más de dos décadas, las funciones de las proteínas harpin no se conocen bien, aunque en los últimos diez años ha habido un progreso significativo para dilucidar los mecanismos de sus funciones.

Desde la primera proteína harpin, HrpN de *E. amylovora*, se han caracterizado una gran cantidad de otras harpin pertenecientes a diversas bacterias patógenas Gram negativas de plantas; ejemplo son, HrpN y HrpW de especies de *Erwinia* y bacterias relacionadas (Bauer *et al.*, 1995; Gaudriault *et al.*, 1998; Kim y Beer, 1998; Shrestha *et al.*, 2008), HrpZ1, HrpW1, HopP1 y HopAK1 de *P. syringae* (Charkowski *et al.*, 1998; He *et al.*, 1993; Kvitko *et al.*, 2007), PopA1 y PopW de *R. solanacearum* (Arlat *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2010), y Hpa1 y sus ortólogos de las especies de *Xanthomonas* (Kim *et al.*, 2003; Noël *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2000). Interesantemente, la bacteria simbiótica *Rhizobium etli*, también produce una proteína harpin (Fauvert *et al.*, 2009).

Los genes harpin de *E. amylovora* (*hrpN*), *E. chrysanthemi* (*hrpN*), y *R. solanacearum* (*popA*) están localizados al lado o cerca de sus respectivas agrupaciones *hrp*, mientras que el gen *hrpZ* de *P. syringae* reside dentro del cluster *hrp* (Alfano y Collmer, 1997), indicando que su ubicación está, de alguna manera, relacionada directamente con este cluster. De la misma manera que lo hace *P. syringae*, *Xac* contiene un gen codificante para una proteína harpin en su cluster *hrp*,

llamado *hpa1*. Esta característica de poseer un gen harpin en este cluster es común en casi todas las especies de *Xanthomonas*, siendo el mismo sinténico.

Las harpin son proteínas únicas que comparten características comunes, distintivas de otras proteínas bacterianas. En primer lugar, en términos de composición de aminoácidos, las proteínas harpin poseen una cantidad relativamente alta de residuos de glicina, serina y glutamina, mientras que no contienen ninguna o pocas cisteína y aminoácidos aromáticos. La mayoría de las harpin consisten de más del 15% de glicina, y estos residuos están a menudo agrupados en regiones específicas de estas proteínas. El aminoácido serina cubre aproximadamente el 10% del total de aminoácidos. Curiosamente, la mayoría de estas proteínas no tienen residuos de cisteína. Sin embargo, Hpa1 de *Xoo* contiene una cisteína y Hpa de *Xanthomonas malvacearum* (Xm) cuatro (Choi *et al.*, 2013). En segundo lugar, en términos de estructuras secundarias, se predice que las harpin tienen varias regiones de hélices α . HrpN de *E. amylovora* y HrpZ1 de *P. syringae* poseen ocho o nueve hélices α , y HrpW de *E. amylovora* lleva dos sólo en el dominio amino terminal (Choi *et al.*, 2013). En tercer lugar, las harpin son proteínas muy ácidas, basándose en sus puntos isoeléctricos teóricos. En cuarto lugar, los tamaños de las harpin de especies de *Xanthomonas* son significativamente más pequeños que los de las bacterias relacionadas *Pseudomonas* y *Erwinia*. Finalmente, las proteínas harpin son estables al calor, incluso luego de ser hervidas durante 15 min (He *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1992).

Las harpin se pueden clasificar en 5 grupos principales en base a su similitud y estructuras de dominio (Choi *et al.*, 2013): Grupo HrpN, encabezado por HrpN de *E. amylovora*, Grupo HrpZ1, encabezado por HrpZ1 de *P. syringae* pv. *tomato*, Grupo HrpW1, encabezado por HrpW1 de *P. syringae* pv. *tomato*, Grupo Hpa1, encabezado por Hpa1 de *X. oryzae* pv. *oryzae*, Grupo otros: donde se incluyen a PopA1 de *R. solanacearum*, y HopP1 de *P. syringae* pv. *tomato*.

La mayoría de las harpin no llevan ningún dominio que se encuentre en otras proteínas bacterianas o de plantas. Sin embargo, los ortólogos de HrpW (HrpW de *E. amylovora*, HrpW1 y HopAK1 de *P. syringae*, y PopW de *R. solanacearum*) poseen dominios pectato liasa en sus extremos carboxilo terminal (Charkowski *et al.*, 1998; Kim y Beer, 1998; Li *et al.*, 2010). Los dominios amino terminales de las harpin del Grupo HrpW mostraron ser responsables de elicitar HR (Charkowski *et al.*, 1998; Kim y Beer, 1998).

Basado en análisis mutacionales, se ha descrito que algunas proteínas harpin tienen funciones de virulencia en plantas hospedadoras. Por ejemplo, la mutación del gen *hrpN* en *E. amylovora* cepa CFBP1430 reduce su virulencia, aunque conserva aún una importante patogenicidad en plantas hospedadoras (Barney, 1995). Sin embargo, la mutante en el gen *hrpN* de *E. amylovora* cepa Ea273, generó una importante disminución en la virulencia con respecto a la cepa de tipo salvaje (Sinn *et al.*, 2008). En contraste, la mutación de *hrpW* en *E. amylovora* o *popW* en *R. solanacearum* no mostraron ningún efecto sobre la virulencia en plantas hospedadoras (Gaudriault *et al.*, 1998; Kim y Beer, 1998; Li *et al.*, 2010). Estos ejemplos indican que algunas proteínas harpin pueden ser consideradas como factores de virulencia de patógenos bacterianos.

Por otra parte, hay evidencia significativa de que algunas harpin actúan como translocadores, facilitando la inyección de proteínas efectoras bacterianas en las células vegetales. DspA/E es un efector crucial de *E. amylovora* para el desarrollo de la enfermedad, y su translocación a células hospedadoras se vio severamente afectada en la mutante *hrpN* de *E. amylovora* (Bocsanczy *et al.*, 2008). Tal es el caso del efector AvrPto de *P. syringae* pv. *tomato*, cuya translocación se vio disminuida en bacterias mutantes en los genes que codifican para proteínas harpin (Kvitko *et al.*, 2007).

Las proteínas harpin son capaces de asociarse a la membrana plasmática, lo que se demostró mediante ensayos en los que se evaluó la capacidad de estas proteínas de formar poros en membranas artificiales y, adicionalmente, la de unirse a lípidos. HrpZ1 de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* demostró asociarse a liposomas y membranas de bicapa sintética *in vitro* (Lee *et al.*, 2001). Las proteínas HrpZ1 de *P. syringae* pvs. *phaseolicola*, *tomato* y *syringae* activan una fluctuación en la corriente de iones en bicapas lipídicas planas. Además, un ensayo de unión a 15 componentes lípidos de membrana diferentes mostró que HrpZ1 interactúa con ácido fosfatídico (Haapalainen *et al.*, 2011). PopA1 de *R. solanacearum* demostró estar integrada en liposomas y también en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, resultando en la formación de poros conductores de iones (Racapé *et al.*, 2005). Colectivamente, estos datos indican que varios harpin se pueden unir a lípidos y formar poros en la membrana plasmática de la planta. Las proteínas translocadoras en bacterias patógenas de animales en general forman una estructura similar a un canal en la membrana plasmática por oligomerización

(Montagner *et al.*, 2011). La oligomerización de HrpZ1 de *P. syringae* mostró que puede formar oligómeros, en su mayoría de 16 monómeros (Haapalainen *et al.*, 2011). Por lo tanto, al menos HrpZ1 tiene la capacidad de formar oligómeros, probablemente contribuyendo a la formación de poros en la membrana plasmática hospedadora.

Como se comentó anteriormente, las proteínas harpin poseen actividad inductora de HR. Estudios realizados en varias harpin revelaron que ciertas regiones son suficientes para el desarrollo de HR. El análisis mutacional de HpaG de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag) demostró que los 12 residuos de aminoácidos entre Leu39 y Leu50 son críticos para la elicitación HR en tabaco (Kim *et al.*, 2004). Curiosamente, XopA de Xcv carece de actividad inductora de HR, pero la mutagénesis de Phe48 a Leu48 en esta proteína, restauró su actividad inductora de HR (Kim *et al.*, 2004). Aunque los mecanismos de desarrollo de HR por harpin no se conocen bien, se demostró que la expresión de HrpZ1 dirigida extracelularmente induce HR en tabaco, en tanto que la misma proteína dirigida al citoplasma no, sugiriendo que las harpin deben ser reconocidas en la membrana externa de las células vegetales (Tampakaki y Panopoulos, 2000).

Una característica interesante de las proteínas harpin es que inducen respuestas de defensa innata en plantas. Tanto si los genes harpin se expresan constitutivamente en las células vegetales como si las proteínas harpin se pulverizan sobre las plantas, inducen respuestas de defensa que les confieran a estas la capacidad de ser menos susceptibles a diversos patógenos, incluyendo hongos, oomicetos, bacterias y virus. Este proceso por el cual se activan las respuestas de defensa sin el desarrollo de HR se llama *priming*. La pulverización con HrpN de *E. amylovora* en *Arabidopsis* induce la expresión de la proteína relacionada a la patogénesis, PR1, y activa la resistencia sistémica adquirida, que confiere resistencia al hongo *Hyaloperonospora arabidopsidis* y a *P. syringae* pv. *tomato* (Dong *et al.*, 1999). Además, la aplicación foliar de HrpN en plantas de tomate reduce las enfermedades causadas por *Phytophthora infestans* y *Botrytis cinerea* (Fontanilla *et al.*, 2005a y b).

La unión de las bacterias fitopatógenas a la superficie de la planta es el primer paso para el desarrollo de la enfermedad. HrpN de *Dickeya dadantii* (antiguamente llamada *Erwinia chrysanthemi*) demostró estar implicada en la unión eficiente de esta bacteria a la superficie de la planta (Yap *et al.*, 2006). Además, esta harpin también

estuvo implicada en la formación de *biofilm* en medio líquido, el cual se caracteriza como un agregado celular bacteriano. Además, varias harpin (HpaG de Xag, HrpN de *E. amylovora*, y HrpZ1 de *P. syringae* pv. *syringae*) mostraron ser capaces de formar estructuras fibrilares bajo condiciones similares al apoplasto vegetal (Oh *et al.*, 2007). Estas características pueden tener una función en la etapa inicial de la interacción bacteriana con las células vegetales.

Hasta la realización del presente trabajo de tesis se desconocía si la proteína Hpa1 de Xac era importante para el desarrollo de HR y la patogenicidad por parte de este fitopatógeno en plantas no hospedadoras y hospedadoras, respectivamente. Tampoco se habían realizado estudios sobre su posible rol en la interacción bacteria-bacteria, y su importancia en el desarrollo de la enfermedad respecto a ello. Es por esto que se plantearon diversos estudios con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre esta proteína y determinar su participación en la interacción planta-patógeno.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis es el estudio de proteínas relacionadas al sistema de secreción tipo III de la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, y sus importancias en el desarrollo de la Cancrosis de los Cítricos.

2.2. Objetivos específicos

En base al objetivo general expuesto se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Obtener la proteína Hpa1 de Xac pura en forma recombinante y evaluar las respuestas hacia la misma tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras.
- Caracterizar la función de Hpa1 en la patogenicidad de Xac, y en su interacción con plantas hospedadoras.
- Construir la cepa mutante de Xac en el gen *hpa1*, y caracterizar la interacción de la misma con plantas hospedadoras.
- Caracterizar estructuralmente a Hpa1 utilizando diversas técnicas biofísicas.
- Estudiar los dominios que componen a Hpa1.
- Obtener la proteína HrpE de Xac pura en forma recombinante y evaluar las respuestas hacia la misma tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras.
- Evaluar el rol de HrpE como factor de adherencia bacteriano.
- Obtener anticuerpos contra HrpE de Xac, y analizar la posibilidad del desarrollo de nuevas herramientas moleculares para la erradicación de la Cancrosis de los Cítricos.
- Identificar posibles proteínas de plantas de naranja que interactúen específicamente con las proteínas Hpa1 y HrpE de Xac mediante el ensayo de doble híbrido en levaduras.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivo bacteriano

3.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

A continuación se detallan las cepas bacterianas (Tabla 3.1) y los vectores plasmídicos (Tabla 3.2) utilizados en el presente trabajo, junto con su respectiva referencia.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>		
Xac(Xcc99-1330)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , cepa tipo salvaje, Ap ^r	Provista por Blanca Canteros (INTA Bella Vista)
XacΔhpa1	Xac mutante en el gen <i>hpa1</i> , Ap ^r , Kn ^r	Este trabajo
XacΔhpa1c	XacΔhpa1 conjugada con el vector pBBR1-MCS5- <i>hpa1</i> , Ap ^r , Kn ^r , Gn ^r	Este trabajo
Xac GFP	Xac conjugada con el vector pBBR1-MCS5- <i>GFP</i> , Ap ^r , Gn ^r	Este trabajo
XacΔhpa1 GFP	XacΔhpa1 conjugada con el vector pBBR1-MCS5- <i>GFP</i> , Ap ^r , Kn ^r , Gn ^r	Este trabajo
XachrpB ⁻	Xac mutante en el operón <i>hrpB</i> , Ap ^r , Kn ^r	Dunger <i>et al.</i> , 2005
XachrpG ⁻	Xac mutante en el gen <i>hrpG</i> , Ap ^r , Sp ^r	Construida previamente en el laboratorio
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
Xcv(Xcv Bv5-4a)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , cepa tipo salvaje	Provista por Blanca Canteros (INTA Bella Vista)
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 thi Δ(lac-proAB)F⁻ relA1</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
S17-1	294::[RP4-2-(Tc::Mu) (Km::Tn7) <i>pro res recA</i> Tp ^r mod ⁺	de Lorenzo y Timmis, 1994
KC8	<i>hsdR leuB600 trpC9839 pyrF::Tn5 hisB463 lacΔX74 strA galU,K</i>	Clontech Laboratories
Bl21 pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_{B-}, m_{B-}) dcm gal λ(DE3) pLysS, Cm^r</i>	Promega

(cont.)

Saccharomyces cerevisiae

PJ69-4a	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 Δgal4 Δgal80 LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
---------	--	----------------------------

Tabla 3.1. Tabla de cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

Vector	Características	Referencia
pET28a	Vector comercial para la expresión y purificación de proteínas por afinidad.	Novagen
pET28a- <i>hpa1</i>	Vector pET28a que posee clonado entre sus sitios NdeI y HindIII el gen completo <i>hpa1</i> .	Este trabajo
pET32a	Vector comercial para la expresión y purificación de proteínas por afinidad.	Novagen
pET32am	Vector derivado del vector comercial pET32a, en el que se eliminó el S-tag y el sitio de reconocimiento de la proteasa Enteroquinasa.	Rial <i>et al.</i> , 2002
pET32am- <i>hrpE</i>	Vector pET32am que posee clonado entre sus sitios BamHI y HindIII el gen completo <i>hrpE</i> .	Este trabajo
pBBR1MCS2	Transferible a <i>Xanthomonas</i> por conjugación biparental desde la cepa movilizadora <i>E. coli</i> S-17. Posee un origen de replicación para un amplio rango de hospedadores y resistencia a Kn.	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS-2-GFP	Plásmido pBBR1MCS-2 conteniendo el gen de GFP.	Gottig <i>et al.</i> , 2009
pK19mobGII	Vector movilizable y suicida en <i>Xanthomonas</i> , que permite la interrupción de genes por intercambio de marcadores o inserciones del vector.	Katzen <i>et al.</i> , 1999
pK19mobGII- <i>hpa1</i>	Plásmido pK19mobGII que posee clonado entre sus sitios EcoRI y PstI la región central del gen <i>hpa1</i> .	Este trabajo
pBBR1MCS-5	Transferible a <i>Xanthomonas</i> por conjugación biparental desde la cepa movilizadora <i>E. coli</i> S-17. Posee un origen de replicación para un amplio rango de hospedadores y resistencia a Gn.	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS-5- <i>hpa1</i>	Plásmido pBBR1MCS-5 que posee clonado entre sus sitios EcoRI y PstI el gen completo <i>hpa1</i> .	Este trabajo
pOAD	Vector para clonado de proteínas presas para ensayos de doble híbrido en levaduras.	Uetz <i>et al.</i> , 2000
pOBD	Vector para clonado de proteínas carnadas para ensayos de doble híbrido en levaduras.	Uetz <i>et al.</i> , 2000
pOBD- <i>hrpE</i>	Vector pOBD con el gen <i>hrpE</i> .	Este trabajo
pOBD- <i>hpa1</i>	Vector pOBD con el gen <i>hpa1</i> .	Este trabajo
pOBD- <i>hpa1</i> ₁₋₃₂	Vector pOBD con el fragmento <i>hpa1</i> ₁₋₃₂ .	Este trabajo
pOBD- <i>hpa1</i> ₁₋₅₇	Vector pOBD con el fragmento <i>hpa1</i> ₁₋₅₇ .	Este trabajo

(cont.)		
pOBD- <i>hpa1</i> ₃₃₋₁₀₅	Vector pOBD con el fragmento <i>hpa1</i> ₃₃₋₁₀₅ .	Este trabajo
pOBD- <i>hpa1</i> ₅₈₋₁₃₇	Vector pOBD con el fragmento <i>hpa1</i> ₅₈₋₁₃₇ .	Este trabajo
pOBD- <i>hpa1</i> ₁₀₆₋₁₃₇	Vector pOBD con el fragmento <i>hpa1</i> ₁₀₆₋₁₃₇ .	Este trabajo

Tabla 3.2. Tabla de vectores utilizados en el presente trabajo.

3.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento utilizados

A continuación se detallan los medios de cultivos utilizados en el presente trabajo, junto con su respectiva referencia, y se describen las condiciones de crecimiento bacteriano utilizadas (Tabla 3.3).

Nombre	Composición	Referencia
Luria-Bertani (LB)	Peptona 10,0 g/l Extracto de levadura 5,0 g/l NaCl 5,0 g/l	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Nutrient Broth (NB)	Extracto de carne 3 g/l Peptona de carne 5 g/l	Sambrook y Russell, 2001
Silva-Buddenhagen (SB)	Peptona 5,0 g/l Extracto de levadura 5,0 g/l Sacarosa 5,0 g/l Ácido glutámico 1,0g/l	Mongkolsuk <i>et al.</i> , 1996
XVM2	Fructosa 10 mM Sacarosa 10 mM Casaminoácidos 0,3 g/l NaCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 0,16 mM K ₂ HPO ₄ 0,32 mM MgSO ₄ 5 mM FeSO ₄ 0,01 mM	Wengelnik y Bonas, 1996
Medio Mínimo A (MA)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g/l KH ₂ PO ₄ 4,5 g/l K ₂ HPO ₄ 10,5 g/l Citrato de sodio 0,5 g/l MgSO ₄ 1 mM Sacarosa 6 mM Casaminoácidos 1 g/l	Ausubel <i>et al.</i> , 1996

Tabla 3.3. Medios de cultivos utilizados en el presente trabajo. Para información sobre los medios de cultivo de levaduras ver Materiales y Métodos 3.15.1.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en agitación a 37 °C y las cepas de Xac y Xcv a 28 °C, y siempre que fue necesario el medio de cultivo se suplementó con el antibiótico correspondiente:

- Ampicilina (Ap) a concentración final 100 µg/ml (*E. coli*) y 25 µg/ml (Xac)
- Kanamicina (Kn) a una concentración final 40 µg/ml (*E. coli*) y 20 µg/ml (Xac)

- Gentamicina (Gn) a una concentración final 20 $\mu\text{g/ml}$ (*E. coli*) y 5 $\mu\text{g/ml}$ (Xac)
- Cloranfenicol (Cm) a concentración final 30 $\mu\text{g/ml}$ (*E. coli*)
- Espectinomicina (Sp) a concentración final 50 $\mu\text{g/ml}$ (*E. coli*) y 25 $\mu\text{g/ml}$ (Xac)

Para los casos de medios sólidos, se adicionó agar a una concentración final de 1,5% p/v (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2. Material vegetal y métodos de crecimiento

A continuación se detallan las plantas utilizadas y los métodos de crecimiento para cada caso, acorde a su necesidad. *Citrus sinensis* cv. valencia (naranja), los plantines provistos por el INTA de Concordia, se crecieron en invernadero a una temperatura de 26 ± 2 °C con un fotoperíodo diario de 16 horas de luz. Se utilizaron hojas totalmente expandidas de plantas jóvenes para todos los ensayos desarrollados. Los cultivares de *Arabidopsis thaliana* utilizados fueron Col-0, Ws, Nossen y C24. Las semillas se sembraron en macetas de 10 cm y se cultivaron en cámara con ambiente controlado a 23 ± 2 °C con un fotoperíodo diario de 16 horas. La línea transgénica de *Arabidopsis thaliana*, PrAtWRKY30::GUS fue cultivada de la misma manera que las otras especies de *Arabidopsis*. *Gossypium hirsutum* cv. DP404Bg (algodón), *Solanum lycopersicum* cv. Platense (tomate), *Nicotiana tabacum* cv. Petit Habana (tabaco) y *Capsicum annuum* cv. Grossum (pimiento) fueron cultivadas en cámara de crecimiento con temperatura controlada a 26 ± 2 °C, y un fotoperíodo diario de 14 horas de luz.

3.3. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

3.3.1. Técnicas básicas de ADN recombinante

Las preparaciones de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli*, las electroforesis de ADN, las digestiones de ADN con enzimas de restricción, la recuperación de ADN a partir de geles de agarosa, las reacciones de ligación de fragmentos de ADN y las transformaciones de células de *E. coli* con ADN plasmídico se llevaron a cabo siguiendo los protocolos estándares descritos por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989), o con aquellos recomendados por los proveedores de los reactivos adquiridos comercialmente. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron puestas a punto siguiendo los procedimientos generales descritos en (Kidd y Ruano, 1995). La presencia de los fragmentos de ADN deseados fue verificada por secuenciación.

3.3.2. Preparación de ADN genómico de *Xac*

Las células se crecieron en frascos con 10 ml de medio SB suplementado con Ap (25 µg/ml final) a 28 °C con agitación constante hasta alcanzar la saturación del cultivo. Se ajustó el cultivo a 0,3 OD a 600 nm. Se centrifugaron en un volumen de 1,5 ml a aproximadamente 6000 g durante 2 minutos y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de agua destilada. Se centrifugó nuevamente a 6000 g durante 2 minutos. Posteriormente se resuspendió el *pellet* en 500 µl de *buffer* TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) mediante pipeteado repetitivo; se agregaron 15 µl de 20% p/v SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) y 3 µl de 20 mg/ml Proteínasa K (Sigma-Aldrich), se mezcló mediante movimientos suaves del tubo y se incubó a 37 °C por 1 a 1,5 horas. Se agregaron 167 µl de 5 M cloruro de sodio (NaCl) y se mezcló suavemente. Luego se agregaron 80 µl de solución precalentada de CTAB/NaCl (10 g de CTAB y 4,1 g de NaCl en 100 ml de agua), se mezcló y se incubó por 15 minutos a 65 °C. Se agregaron 700 µl de una mezcla compuesta por cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 g. Posteriormente, se removió la fracción superior acuosa y se colocó en un tubo nuevo. Se agregaron 500 µl de una mezcla compuesta por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 g. Se transfirieron 300-500 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó

0,6 volúmenes de isopropanol. Seguidamente, se agitó el tubo hasta que se observó un precipitado blanco. Luego se incubó durante 10 minutos a -70 °C. Se centrifugó durante 25 minutos a 14000 g, se descartó el líquido, se lavó el ADN con 900 µl de etanol 70% v/v centrifugando durante 10 minutos a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente con pipeta y se secó el *pellet* obtenido por ventilación. Finalmente, se disolvió el *pellet* de ADN en 25-100 µl de *buffer* TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) durante una hora. La solución obtenida se almacenó a 4 °C hasta el momento de ser utilizada. (Ausubel *et al.*, 1987).

3.3.3. Oligonucleótidos

A continuación se detallan los oligonucleótidos cebadores utilizados en el presente trabajo (Tabla 3.4).

Oligonucleótido	Secuencia
Clonado	
hpa1L-Nde	5'TCTTAAGCATATGAATTCTTTGAACACACAG3'
hpa1R-Hind	5'CACGTAAGCTTTTACTGCATCGATCCGGTG3'
NHrpEB	5'ATCAGGATCCATGGAATTATTACCGCAAATCAG3'
CHrpEH	5'ATACAAGCTTTTACTGGCCAACGAGCTGCTT3'
PN-Hpa1BamHI	5'TAAGGGATCCATGAATTCTTTGAACACACAG3'
PN-Hpa1H	5'CACGTAAGCTTAGGCATTGTTGCTCTGCTGAAG3'
PC-Hpa1BamHI	5'TAAGGGATCCGAGCAGGGTCAGGGTCAA3'
hpa1intBF	5'ATCAGGATCCTGACCCCAGCCAGAACAC3'
hpa1intHR	5'ATCAAAGCTTCCGAAGCCACCACCAAAG3'
hpa1A	5'CGCCCCACAACCTGCCGTCGCTTAC3'
hpa1B	5'TACGCGGTTACAGCAATGAGAG3'
hrpEpOXD-L	5'CAGTACCATGGCAATGGAATTATTACCGCAAATC3'
hrpEpOXD-R	5'CAGTACTGCAGTTACTGGCCAACGAGCTGCTT3'
hpa1pOXD-L	5'CAGTACCATGGCAATGAATTCTTTGAACACACAG3'
hpa1_32pOXD-R	5'CACGTCTGCAGTTACTGGTTGCCCTGGTT3'
hpa1_57pOXD-R	5'CACGTCTGCAGTTAGGCATTGTTGCTCTGCT3'
hpa1_33pOXD-L	5'CAGTACCATGGCAGGCATCTCGGAAAAGCA3'
hpa1_105pOXD-R	5'CACGTCTGCAGTTAATTCTGCGCCTGGAGA3'
hpa1_58pOXD-L	5'TAATGCCATGGCAGAGCAGGGTCAGGGTCAA3'
hpa1_106pOXD-L	5'CAGTACCATGGCAGGTGGTGGCTTCGG3'
RT-PCR y qRT-PCR	
16SUp	5'TGGTAGTCCACGCCCTAAACG3'
16SDown	5'CTGGAAAGTTCCGTGGATGTC3'
hpa1intBF	5'CACGTAAGCTTTTACTGCATCGATCCGGTG3'
hpa1intHR	5'ATCAGGATCCTGACCCCAGCCAGAACAC3'
tubUp	5'GAGAATGCTGATGAGTGCATGG3'
tubDown	5'CAGGGAACCTCAGACAGCAAGT3'
AtMAPK3Up	5'CCCAACTTCCCACGTCAGCCCTTAGC3'
AtMAPK3Down	5'TGGCTCATCATTCCGGTTCGTGCAA3'
AtMKK4Up	5'GCTTGCAGAGAGAACCAGGGGAAAAGGA3'
AtMKK4Down	5'GAAAAGAAGACGAGGACAGAGGACGA3'
AtWRKY30Up	5'CGCTGGACGATGGATTGAGTTGGAGA3'

AtWRKY30Down	5'TCGGTTTCGAGGTTTTGTATCGGCATTG3'
ActinaUp	5'GAGCTGAAAGATTCCGTTGC3'
ActinaDown	5'TTGATCTTCATGCTGCTTGG3'
CsMAPK3Up	5'TTACATGATGAAGCCGATGAAC3'
CsMAPK3Down	5'TGAGTGCTAATGCCTCCTGATA-3'
CsMKK4Up	5'GCTTGCAGAGAGAACCAGGGGAAAAGGA3'
CsMKK4Down	5'GGAAAAGAAGACGAGGACAGAGGACGA3'
CsWRKY30Up	5'CGAAAGAAGCAAATGGGGTA3'
CsWRKY30Down	5'GGAAATAAACGTGGCGAAAA3'
CsGSTR	5'GTTTCATCAGATATCTTAAGGCTGGTA3'
CsGSTL	5'AACCTACTTGGAAACACACTAGAAGA3'
CsMSODR	5'CAGAAGCATCACAGGCTTA3'
CsMSODR	5'CAATGCTTCCAGAGAACCAA3'
CsPrxAF	5'AGCCGCTCTCATTTCTCTA3'
CsPrxAR	5'TTGATCGAAAACAGCCTCTG3'
CsPR1R	5'ACATGATCAATAGTAGGGATGTTAGC3'
CsPR1L	5'AAAGTTGTTCAAACTTTTTGTCTT3'
CsPR4L	5'GTGTGATTCTGTCACTTTGTCTACTG3'
CsPR4R	5'ACTGTTTGTGACCCTTAAGCAC3'
CsHMGRR	5'AATATGTAGATCCTTCCCATCATTTA3'
CsHMGRRL	5'AACTAATGTGGCTACACTGGTAGAG3'
CsPALR	5'CTTGAATTATCCATAGAGACACCAAT3'
CsPALL	5'ATAATGGAACATATCTTGGATGGTAG3'
SIRpl2F	5'CGTGGTGTGCTATGAATCC3'
SIRpl2R	5'GTCAGCTTTGGCAGCAGTAG3'
SILrr22F	5'AAGATTGGAGGTTGCCATTGGAGC3'
SILrr22R	5'ATCGCGATGAATGATCGGTGGAGT3'
SIPti5F	5'GCTAGACATGGTGCGAGAGT3'
SIPti5R	5'TCTACTGAAACAGAGGCGTTC3'
SIGras2F	5'ATGTGAGGGCATGGAAAGAG3'
SIGras2R	5'TCCATCCCAACAACATAGCTC3'
SIWRKY28F	5'ACAGATGCAGCTACCTCATCCTCA3'
SIWRKY28R	5'GTGCTCAAAGCCTCATGGTTCTTG3'

Tabla 3.4. Oligonucleótidos cebadores utilizados en el presente trabajo. Con respecto a los generados para RT-PCR y qRT-PCR la eficiencia de amplificación para cada par de es la misma.

3.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.4.1. Construcción de los vectores de expresión

La construcción de los vectores de expresión se llevó a cabo amplificando por PCR la región deseada del gen blanco a partir de una extracción de ADN genómico de *Xac*, la que posteriormente se cortó con las enzimas de restricción deseadas y se ligó en el vector a utilizar también cortado con estas enzimas.

El vector pET28-*hpa1* se construyó amplificando el gen completo *hpa1* con los oligonucleótidos *hpa1*L-Nde y *hpa1*R-Hind (Tabla 3.4), y los sitios de restricción utilizados para el subsiguiente clonado fueron NdeI y HindIII.

El vector pET32am-*hrpE* se construyó amplificando el gen completo *hrpE* con los oligonucleótidos NHrpEB y CHrpEH (Tabla 3.4), y los sitios de restricción utilizados para el subsiguiente clonado fueron BamHI y HindIII.

Los vectores pET32a-*hpa1*₁₋₅₇ y pET32a-*hpa1*₅₈₋₁₃₇ se construyeron amplificando las regiones correspondientes con los oligonucleótidos PN-*hpa1*BamHI y PN-*hpa1*H, y PC-*hpa1*BamHI y *hpa1*R-Hind (Tabla 3.4), respectivamente, y los sitios de restricción utilizados para el subsiguiente clonado en ambos casos fueron BamHI y HindIII.

Todos los vectores construidos fueron secuenciados para corroborar su secuencia y el correcto marco de lectura antes de ser utilizados en los ensayos de expresión.

3.4.2. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

La inducción de la expresión de proteínas recombinantes en la cepa *E. coli* pLysS (Promega) se realizó empleando IPTG (Sigma-Aldrich) como inductor según el procedimiento general descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989), realizando ajustes menores para cada caso en particular, según las necesidades de los diferentes ensayos. Básicamente, se cultivaron las bacterias en medio LB conteniendo el o los antibióticos correspondientes a 37 °C con agitación constante hasta saturación del medio de cultivo. Este cultivo se diluyó 1/100 en el mismo medio fresco suplementado con antibióticos, y se incubó en idénticas condiciones hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6-0,9 a 600 nm. Se indujo la expresión de proteínas mediante el agregado de IPTG a una concentración final acorde a lo analizado como óptima para cada caso (0,5 mM para

los casos de Hpa1 y sus fragmentos, y 0,25 mM para el caso de HrpE) continuando la incubación por un período adicional de 5-6 horas a 18 °C (en todos los casos). Posteriormente, las células fueron cosechadas por centrifugación a 6000 g, a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* celular se resuspendió inmediatamente para proceder a la preparación de los extractos proteicos, o se congeló a -20 °C hasta su procesamiento en corto plazo o a -70 °C en mediano plazo.

3.4.3. Preparación de extractos proteicos y purificación de proteínas recombinantes

Las células de *E. coli* BL21 pLysS provenientes de los cultivos inducidos fueron resuspendidas en solución de lisis celular conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Imidazol 5 mM y PMSF 1 mM. Luego de la ruptura celular mediante sonicación, los lisados fueron clarificados por centrifugación a 20000 g, a 4 °C durante 45 minutos. Los volúmenes de solución de lisis utilizados fueron 1/10 a 1/20 del volumen de cultivo inducido. Cuando el volumen de inducción fue mayor a los 500 ml, se agregó además a la solución de lisis MgCl₂ 5 mM y ADNasa 1 mg/l de cultivo. Posterior a la centrifugación, los sobrenadantes se recuperaron para su inmediato procesamiento.

A fin de lograr un mayor grado de pureza y rendimiento de las proteínas de interés, las condiciones de purificación fueron puestas a punto para cada una de ellas en particular. A continuación, se describe el protocolo típico utilizado para las purificaciones por cromatografía de afinidad. Estas condiciones fueron ajustadas según las necesidades, y en todos los casos las modificaciones se indican en el texto. Para todas las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo se utilizaron vectores de la serie pET (Novagen). Para la purificación de ⁶His-Hpa1 se utilizó el vector pET28a, y para la purificación de los fragmentos de Hpa1 (Trx-⁶His-Hpa1₁₋₅₇ y Trx-⁶His-Hpa1₅₈₋₁₃₇) y Trx-⁶His-HrpE, se utilizó el vector pET32am (Rial *et al.*, 2002). Se siguió un protocolo empleando una resina de Ni²⁺-Agarosa (Ni-NTA, QIAGEN) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los pasos de purificación fueron realizados utilizando *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM e Imidazol 5 mM para todos los casos, tomado este como *buffer* de equilibrio de la columna. Los pasos de lavado fueron realizados utilizando *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM e Imidazol 40 mM para el caso de ⁶His-Hpa1 y, Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150

mM e Imidazol 15 mM para los casos obtenidos a partir del vector pET32am (Trx-⁶His-Hpa1₁₋₅₇, Trx-⁶His-Hpa1₅₈₋₁₃₇ y Trx-⁶His-HrpE). El paso de elución de las proteínas recombinantes unidas a la matriz se realizó con Imidazol en la misma solución posterior, cuya concentración fue en forma de gradiente desde los 100 mM a los 250 mM para evitar la precipitación proteica por alta concentración. Las purificaciones a gran escala se llevaron a cabo en cámara refrigerada a una temperatura de 4 °C. Posteriormente a la etapa de purificación se procedió a dializar las muestras contra el *buffer* deseado, o en su defecto contra Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, por un período de 16 horas a 4 °C. Siempre que fue posible, se tomaron alícuotas para evaluar los resultados de las separaciones cromatográficas, diálisis y concentración de muestras. Las alícuotas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida.

3.5. Métodos analíticos de proteínas

3.5.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con glicina, siguiendo el protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970). La concentración final de acrilamida en los geles de separación se ajustó entre 15 y 18% de acuerdo al tamaño de las proteínas a separar. Siempre que se aclare el uso de geles de poliacrilamida con tricina, se refirió al protocolo desarrollado por Schägger (Schägger, 2006). Este protocolo permite resolver pequeños fragmentos proteicos de entre 5 y 30 kDa. Antes de la siembra, las muestras fueron desnaturizadas hirviéndolas durante 3 minutos en solución de siembra conteniendo azul de bromofenol 0,01% p/v, β -mercaptoetanol 1% p/v, EDTA 1 mM, SDS 1,8% p/v y glicerol 5% v/v, y centrifugándolas a 10000 g por 1 minuto. Las electroforesis se desarrollaron en equipos Miniprotean III (Bio-Rad) a una intensidad de corriente aplicada constante de 20 mA por gel, hasta salir el frente de corrida, a menos que se indique otra cosa. Los patrones proteicos resultantes de las electroforesis fueron visualizados mediante fijación (ácido acético 10% v/v), tinción con azul brillante de Coomassie R250 y decoloración de los geles de acuerdo al protocolo descrito en (Sambook *et al.*, 1989).

3.5.2. Electrotransferencia de proteínas hacia membrana de nitrocelulosa y detección con anticuerpos

Una vez resueltas las proteínas en geles de poliacrilamida desnaturizantes, las mismas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amershan Pharmacia) en una cuba de transferencia (Trans-Blot, Bio-Rad) durante 16 horas con agitación permanente a 4 °C y a 40 mA de intensidad constante de corriente. El sistema se mantuvo sumergido en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8, glicina 150 mM, SDS 0,03% p/v y metanol 20% v/v. Una vez finalizada la transferencia de las proteínas a la membrana, esta última se incubó con una solución 5% p/v de leche descremada en polvo de origen comercial preparada en *buffer* PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM y KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo. Esta etapa de bloqueo se extendió durante 1 hora, renovando el *buffer* de bloqueo cada 15 minutos. Posteriormente se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en el mismo *buffer*, de

acuerdo a lo requerido. Transcurrido este lapso de tiempo, se realizaron cuatro lavados, por períodos de 15 minutos cada uno con *buffer* de bloqueo. Luego, se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a la enzima fosfatasa alcalina diluido en *buffer* de bloqueo, y a continuación se realizaron cuatro lavados más de 15 minutos con la misma solución. Pasado este tiempo, la membrana se lavó dos veces durante 5 minutos con una solución de Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM y seguidamente se sumergió en 15 ml de la misma solución a la que se agregaron los reactivos NBT 0,03% p/v y BCIP 0,016% p/v. La membrana se incubó en oscuridad a 37 °C hasta obtener desarrollo del precipitado coloreado sobre la misma (Towbin *et al.*, 1979). Todos los lavados y las incubaciones se realizaron con agitación suave y permanente.

Durante el presente trabajo de tesis se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales: anti-His producido en conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad).

3.5.3. Análisis por filtración en gel

Se utilizó un equipo de FLPC (por Fast Protein Liquid Chromatography, modelo Äkta GE Healthcare) al que se le anexó una columna de exclusión molecular Superdex 200 (GE Healthcare) la cual se preparó de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Previa a la inyección en la columna, la muestra fue centrifugada por 1 minuto a 12000 g para evitar cualquier impureza de gran tamaño. El análisis de los datos se realizó con el programa informático UNICORN (GE Healthcare).

3.5.4. Análisis por espectroscopía de masas

Se utilizó un equipo de MALDI TOF-TOF (modelo UltrafleXtreme Bruker). Los ensayos fueron hechos por duplicado. La matriz utilizada fue de 100% DHB (Ácido 2,5-dihidroxibenzoico). La preparación de proteína utilizada se encontraba a una concentración 2 mg/ml en *buffer* HEPES 10mM pH8, NaCl 20mM. La muestra se preparó en una mezcla proteína/matriz (v/v) 1:4, y fue montada en una placa de vidrio para luego tomar 1 µl de esta mezcla y realizar el ensayo. El modo de adquisición utilizado fue lineal positivo, el láser se utilizó al 35%, el límite de detección fue de 1000 m/z, a ocho pulso de láser por segundo, el potencial de aceleración de 20 KV, y la presión de vacío inferior a 1,5 10⁶ bares.

3.5.5. Análisis por espectroscopía de dicroísmo circular

El estado de plegamiento de las proteínas recombinantes fue evaluado por dicroísmo circular en el intervalo de longitudes de onda desde 190 a 260 nm (UV lejano), donde las uniones peptídicas absorben la luz circularmente polarizada generando los espectros característicos para cada tipo de estructura secundaria (Hélice α , Lámina β , Ovillo estadístico). El equipamiento utilizado fue un espectropolarímetro (modelo J-815 Jasco). Las condiciones del equipo en que se realizaron los espectros fueron camino óptico de 1 mm, los datos se colectaron en intervalos de 0,5 nm y una sensibilidad estándar, el tiempo de respuesta fue de 0,25 segundos, el ancho de banda de 1 nm, la velocidad de barrido fue de 50 nm/min, y el espectro extraído fue el producto de al menos 3 acumulaciones. Las condiciones particulares de cada ensayo se detallan en el texto. Cuando se requirió de temperatura, se utilizó el accesorio controlador de temperatura para tal fin. La concentración utilizada de las proteínas se determinó de forma experimental, evitando valores extremos de elipticidad, aunque en todos los casos se estimó una concentración final de 5 μ M. Los *buffers* utilizados en la determinación de la estabilidad al pH fueron: Glicina 1 mM pH10, NaCl 2mM; Glicina 1 mM pH9, NaCl 2mM; Hepes 1 mM pH8, NaCl 2mM; Hepes 1 mM pH7, NaCl 2mM; Mes 1 mM pH6, NaCl 2mM y NaAcO1 mM pH5, NaCl 2mM. Las muestras de proteínas fueron previamente dializadas en los *buffers* anteriormente indicados antes del ensayo. Para los ensayos de estabilidad térmica, se ajustó el equipo para realizar espectros a intervalos de 5 °C en las condiciones indicadas más arriba. Todos los espectros fueron analizados utilizando el programa informático Spectra Manager (Jasco).

3.5.6. Tinción y espectroscopía con rojo congo

La unión a rojo congo (CR) se analizó como fue descrito previamente (Oh *et al.*, 2007). Mezclas de CR 10 μ M y muestra (Hpa1, Hpa1₁₋₅₇, Hpa1₅₈₋₁₃₇ o Trx) 10 μ M se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Se registraron los espectros de absorbancia en la región de longitudes de onda entre 400 y 700 nm para las mezclas, para CR solo, y para las proteínas solas. Los espectros de absorbancia se realizaron utilizando un espectrómetro (modelo V-630 Jasco), utilizando cubetas con camino óptico de 10 mm, a temperatura ambiente, con una velocidad de barrido de 100 nm/min, un ancho de banda de 1,5 nm y una resolución de 0,1 nm.

3.5.7. Tinción y birrefringencia con rojo congo

Se tomaron 10 μ l de la muestra de proteína a analizar y se dejaron secar al aire sobre un portaobjetos para microscopía. Se agregaron 200 μ l de la solución de tinción (80% v/v etanol, 15% p/v NaCl, 0,5% p/v CR) recientemente filtrada sobre muestra de proteína seca. Se dejó teñir por 5 minutos y luego se quitó el exceso de solución con un papel de filtro, evitando tocar la muestra. Nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó un cubreobjetos, se selló con esmalte y se observó al microscopio (modelo BH-2 Olympus) equipado con dos polarizadores, uno en el objetivo y otro en el ocular; desfasados 90° entre sí para la observación del efecto birrefringente verde-manzana característico.

3.5.8. Ensayo de cinética utilizando Thio-T

La cinética de formación de fibras amiloides utilizando tioflavina T se llevó a cabo como fue descrito previamente (Fernández *et al.*, 2004). Se tomaron muestras de proteína recién preparada y se incubaron en distintas condiciones en viales de vidrio bajo agitación constante con microbarras magnéticas. Las condiciones analizadas fueron las indicadas en el texto. Para cada tiempo se tomaron alícuotas (7,5 μ l) y se añadieron a 2 ml de una solución 10 μ M de Thio-T preparada en *buffer* MES 50 mM, pH 6,5. Se generó el espectro de emisión de fluorescencia registrado a través de un espectrofluorómetro (modelo Cary Eclipse Varian) utilizando una cubeta de cuarzo, y excitando la mezcla a 446 nm. Dentro del espectro obtenido, se tomaron los valores de los picos de emisión cercano a 480 nm, los que posteriormente fueron normalizados utilizando el menor y el mayor valor obtenido, y graficados con respecto al tiempo (Fernández *et al.*, 2004). Estas gráficas se ajustaron a una curva sigmoidea, obteniendo el punto de inflexión o punto medio (t_m).

3.6. Técnicas de microscopía

3.6.1. Microscopía de tejido de cítricos

Las hojas de cítricos fueron infiltradas con 5 μ M Hpa1 y se incubaron durante 3 o 16 horas. Luego los tejidos se seccionaron en un micrótopo criostático, se tiñeron con safranina, se montaron y se examinaron utilizando un microscopio de luz visible (modelo CH30 LB Olympus) equipado con un micrómetro ocular que permitió realizar mediciones. Se analizaron un total de 30 secciones de tejido para cada tratamiento tomando en cuenta la anchura de la hoja de tejido, la anchura y la longitud de las cavidades esquizógenas, y el número de idioblastos cristalinos. Los resultados se analizaron mediante ANOVA simple ($p < 0,05$).

3.6.2. Microscopía para visualización de estructuras bacterianas en medio de cultivo

Las cepas bacterianas que expresan GFP se cultivaron durante la noche en el medio indicado con los antibióticos apropiados a 28 °C, con o sin agitación. Se tomaron las muestras, se las trataron como se indica en el texto en un portaobjetos y se visualizaron mediante microscopía confocal de barrido láser (modelo Eclipse TE-2000-E2 Nikon). La longitud de los cúmulos bacterianos se midió usando el programa computacional EZ-C1 Viewer v3.90 (Nikon). Se observaron al menos 15 campos a partir de experimentos independientes.

3.6.3. Microscopía *in vivo* de hojas de cítricos infectadas

Las cepas bacterianas que expresan GFP se cultivaron durante la noche en medio SB con los antibióticos apropiados a 28 °C. Estos cultivos se diluyeron en 10 mM MgCl₂ hasta una concentración bacteriana de 10⁷ UFC/ml y se infiltraron con jeringa en la cara abaxial de hojas de cítricos totalmente expandidas. Luego de 24 horas de infección, se seccionaron las hojas, se montaron con 50% glicerol y se visualizaron mediante microscopía confocal de barrido láser (modelo Eclipse TE-2000-E2 Nikon). La longitud de los cúmulos bacterianos se midió usando el programa computacional EZ-C1 Viewer v3.90 (Nikon). Se observaron al menos 15 campos a partir de seis experimentos independientes, analizando las dimensiones de los cúmulos bacterianos. Los resultados se expresan como la media de estas longitudes con un nivel de confianza del 95%.

3.7. Construcción de la cepa mutante *Xac* Δ *hpa1* y su cepa complementada

3.7.1. Construcción de la cepa mutante *Xac* Δ *hpa1*

La cepa mutante en el gen *hpa1* de *Xac* se llevó a cabo por integración plasmídica de vector suicida. Se diseñaron oligonucleóticos cebadores basados en la secuencia central del gen llamados *hpa1intBF* y *hpa1intHR* (Tabla 3.4), los cuales adicionan sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y HindIII, respectivamente. El producto amplificado fue de 323 pb. La amplificación por PCR se realizó utilizando ADN genómico de *Xac* como molde (aproximadamente 100 ng) en un volumen de reacción de 50 μ l. De esta forma, se aisló la región central del gen, la que posteriormente fue clonada dentro del vector suicida pK19mobGII (Katzen *et al.*, 1999) digerido, al igual que el fragmento amplificado, con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, produciendo el vector pK19mobGII-*hpa1*. Este nuevo plásmido fue transferido a la cepa tipo salvaje de *Xac* por conjugación biparental a partir de la cepa movilizadora de amplio rango de hospedador *E. coli* S17-1 previamente transformada con el mismo. La mutagénesis por conjugación se realizó como se detalla en la siguiente sección (ver Materiales y Métodos 3.8.). Las células de *Xac* mutantes en el gen *hpa1* fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico Kn codificada en el vector, y se corroboró la eliminación del gen por ausencia de amplificación del mismo por PCR.

3.7.2. Construcción de la cepa complementada *Xac* Δ *hpa1c*

La complementación de la cepa *Xac* Δ *hpa1* fue realizada amplificando por PCR el gen *hpa1* completo usando el par de oligonucleótidos cebadores *hpa1A* y *hpa1B* (Tabla 3.4). La amplificación se realizó tal como se detalló anteriormente para la región central del gen, y el fragmento resultante fue digerido con las enzimas EcoRI y PstI, y clonado en el vector de amplio rango de hospedadores pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) digerido con las mismas enzimas, dando origen al vector pBBR1MCS-5-*hpa1*. La cepa *E. coli* S17-1 fue transformada con este plásmido, y con ella se realizó la transferencia del plásmido recombinante a *Xac* Δ *hpa1* por conjugación (ver Materiales y Métodos 3.8.), resultando la cepa complementada *Xac* Δ *hpa1c*.

3.8. Conjugación bacteriana

Se cultivó la cepa dadora *E. coli* S17-1, conteniendo el vector deseado (pK19mobGII-*hpa1* o pBBR1MCS-5-*hpa1*) a 37 °C en medio líquido LB (Tabla 3.3) y la cepa aceptora (*Xac* o *Xac*Δ*hpa1*, respectivamente) a 28 °C en medio líquido SB (Tabla 3.3), con los antibióticos correspondientes durante toda la noche y agitación hasta alcanzar la saturación del cultivo. Se diluyó 1:10 la cepa dadora en medio LB fresco y se incubó a 37 °C por 1 a 2 horas; por otro lado la cepa aceptora se diluyó 1:10 en medio fresco SB y se incubó a 28 °C durante 2 a 5 horas en agitación, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8 y 1,2 a 600 nm, respectivamente. Se centrifugaron los cultivos a 5000 g por 5 minutos, se lavaron las bacterias con 10 ml de NaCl 0,85% p/v y se centrifugaron nuevamente. Se repitió el lavado de las bacterias de la misma manera una vez más. Posteriormente, las células se resuspendieron en 1 ml de NaCl 0,85% p/v. Se colocaron 100 µl de células dadora y aceptora separadamente, y 100 µl de mezclas 1:1 y 7:3 de ambas sobre discos de nitrocelulosa estériles de 1 cm de diámetro, los que luego se colocaron en placas de conjugación conteniendo el medio completo sólido para el crecimiento de la cepa aceptora (SB-agar), en ausencia de antibióticos. Se dejó que las gotas se absorban en el medio, y se incubaron a 28 °C por 24 a 36 horas. Pasado este período de tiempo, se removieron los discos de nitrocelulosa de la placa con una pinza estéril y se colocaron en tubos conteniendo 1 ml de NaCl 0,85% p/v. Mediante el uso de un agitador tipo vórtex, se resuspendieron las bacterias en el medio líquido y se plaquearon diluciones adecuadas en medio selectivo conteniendo los antibióticos apropiados. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 24-72 horas hasta la observación de presencia de colonias bacterianas, las cuales posteriormente fueron aisladas nuevamente en medio selectivo (Brusin y Rossbach, 1994).

3.9. Infiltración de hojas

3.9.1. Infiltración con muestras proteicas

Se tomaron las muestras correspondientes, como proteínas, *buffers* o suspensiones control, y se infiltraron en hojas totalmente expandidas por medio del uso de una jeringa sin aguja sobre la cara abaxial de las mismas, en las concentraciones y condiciones enunciadas en el texto correspondiente. Se estandarizó en volumen de muestra inyectado para cada ensayo, con la intención de evitar diferencias en los resultados observados debido a un exceso o falta de tratamiento.

3.9.2. Infección de hojas

Se crecieron las cepas de Xac a 28 °C en frascos con 10 ml de medio de cultivo SB con los antibióticos apropiados y en agitación durante toda la noche hasta alcanzar la saturación del cultivo. Los cultivos se diluyeron en forma seriada hasta alcanzar la concentración deseada utilizando 10 μ M MgCl₂. Posteriormente se utilizó una jeringa sin aguja para aplicar las muestras sobre la superficie abaxial de las plantas a tratar, previamente esterilizadas con etanol 20% v/v. El ingreso a la planta se produjo por aplicación de presión sobre la parte del émbolo de la jeringa. Finalmente, las plantas se mantuvieron en las condiciones de crecimiento requeridas para cada caso. Se estandarizó en volumen de muestra inyectado para cada ensayo, con la intención de evitar diferencias en los resultados.

3.10. Ensayo de *priming*

3.10.1. Ensayo de *priming* en plantas de naranja

Se infiltraron hojas de cítricos con los tratamientos a ser analizados para el *priming*, la proteína ⁶His-Hpa1 o Trx-⁶His-HrpE (a una concentración 5 μM), o la cepa mutante en el SST3 XachrpB⁻ (suspensión a 10⁹ UFC/ml) (Dunger *et al.*, 2005) como control positivo, o *buffer* (Tris 50 mM pH 8) como control negativo, utilizando una jeringa sin aguja. Luego del tiempo indicado en el texto, se infiltró el mismo sector de tejido con la cepa salvaje de Xac (suspensión a 10⁶ UFC/ml). Pasados los tiempo post inoculación deseados, se cuantificó la cantidad de bacterias en estas hojas siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos 3.11.

3.10.2. Ensayo de *priming* en plantas de tomate y pimiento

El protocolo utilizado en estas especies de plantas debió ser modificado del utilizado en naranja, debido a la fragilidad de las hojas de las mismas. Se utilizó una modificación del protocolo desarrollado por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2013). Brevemente, la proteína Trx-⁶His-HrpE (a las concentraciones 1 y 5 μM), o la cepa mutante en el SST3 XachrpB⁻ (suspensión a 10⁹ UFC/ml) (Dunger *et al.*, 2005) como control positivo, o el *buffer* (Tris 50 mM pH 8) como control negativo, se inocularon por *spray* en las hojas de estas especies de plantas, realizándose 3 dosificaciones de muestra dejando pasar 2 días entre cada una y, luego de los 6 días de la primer inoculación por *spray*, se infiltraron las mismas hojas con la cepa Xcv tipo salvaje (suspensión a 10⁷ UFC/ml). Para el caso de pimiento, se utilizaron 3 hojas para cada tratamiento, en las que se infiltró Xcv en 4 zonas. En el caso de tomate, se utilizaron 15 hojas, en las cuales se infiltró Xcv en 2 zonas. Pasados los tiempo post inoculación deseados, se cuantificó la cantidad de bacterias en estas hojas siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos 3.11.

3.11. Toma y procesamiento de muestras para recuento de bacterias

Se realizó el corte de un disco de hoja con una superficie determinada (en general 1 cm²) mediante el empleo de un elemento cortante con forma circular. Los discos se disgregaron mecánicamente con la ayuda de un *tip* estéril, se resuspendieron en 100 µl de solución estéril de NaCl (0,85% p/v), se realizó una decantación forzada de los restos de hojas mediante centrifugado a 1000 g durante 5 segundos. Posteriormente se realizaron las diluciones necesarias utilizando solución estéril de NaCl (0,85% p/v) de las que se plaquearon 20 µl sobre placas de Petri con medio SB-agar suplementadas con los antibióticos correspondientes. Finalmente se incubaron en estufa a 28 °C por 48 horas. Pasado este lapso se realizó un conteo manual de las colonias crecidas en cada placa. De esta forma, las unidades formadoras de colonias (UFC) se expresaron por unidad de superficie (cm²). Los datos indicados en cada gráfico son la media de 3 muestras pertenecientes a 3 experimentos independientes, a menos que se indique lo contrario en el texto.

3.12. Tinciones

3.12.1. Ensayo de muerte celular (Azul de Tripán)

Se realizaron las infiltraciones por presión con la ayuda de una jeringa sin aguja de las cepas bacterianas, las muestras proteicas a evaluar, o los controles necesarios. La tinción se realizó calentando una solución compuesta por 10 ml de ácido láctico (90% v/v), 10 ml de glicerol (87% v/v), 10 ml de Azul de Tripán (10 mg de azul de tripán en 10 ml de agua destilada) y 10 g de fenol sólido, una vez alcanzada la ebullición de la solución se añadieron las hojas tratadas a teñir, y se incubaron durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se destiñeron las hojas en solución de hidrato de cloral (2,5 mg/ml), mediante agitación (agitador rotativo en velocidad mínima) y se lavó 4 veces con esta misma solución. Las muestras se conservaron en etanol 96% v/v para su posterior evaluación (Koch y Slusarenko, 1990).

3.12.2. Ensayo de producción de ROS con 3'-3'Diaminobencidina (DAB)

A cada tiempo requerido para el ensayo, se cortaron las hojas tratadas con las cepas bacterianas, las muestras proteicas a evaluar, o los controles necesarios infiltrados por presión con la ayuda de una jeringa sin aguja. Luego se acomodaron colocando el pecíolo para que quede embebido en solución de DAB (1 mg/ml en H₂O destilada, preparado a partir de solución madre 25 mg/ml en HCl 0,5 N), y se dejaron en la oscuridad durante toda la noche. Pasado este tiempo de incubación se procedió al revelado, colocando las hojas en etanol 96% v/v a 50 °C; lavando hasta la desaparición de la coloración verde. Finalmente, las hojas teñidas se almacenaron en etanol 96% v/v para su posterior evaluación (Koch y Slusarenko, 1990).

3.12.3. Tinción de calosa

Las hojas completas, o discos de hojas tratadas con las cepas bacterianas, las muestras proteicas a evaluar, o los controles necesarios fueron sumergidos en etanol 96% v/v hasta su decoloración, de acuerdo al tiempo requerido para cada tejido. Posteriormente, se lavaron varias veces con H₂O destilada y se trataron con 1 ml de *buffer* fosfato de sodio 0,1 M pH 8 durante 30 minutos. Finalmente, los discos fueron teñidos con solución de Azul de Anilina 0,05% p/v durante 1 hora y montados en glicerol 10% sobre un portaobjetos. La determinación de la presencia de

depósitos de calosa se realizó mediante la observación por microscopía confocal de barrido láser (modelo Eclipse TE-2000-E2 Nikon). Los datos evaluados para el análisis cuantitativo de los depósitos provinieron de 3 experimentos independientes, de los cuales se fotografiaron al menos 15 campos representativos para cada tratamiento. Se cuantificó el porcentaje de *pixels* de color azul, tomados a partir de una intensidad determinada, sobre el total de *pixels* que conforman la imagen (Luna *et al.*, 2011). Los resultados se analizaron mediante ANOVA simple ($p < 0,05$).

3.12.4. Ensayo de inducción con gen reportero GUS

Para el ensayo de GUS, se utilizó la línea PrAtWRKY30::GUS de *A. thaliana*, la cual lleva un fragmento genómico de 1,96 kpb ubicado corriente arriba del codón de inicio del gen *AtWRKY30* fusionado al gen reportero *uidA* de *E. coli* (Scarpeci *et al.*, 2008). Hojas de PrAtWRKY30::GUS fueron infiltradas usando una jeringa sin aguja con 5 μ M de Hpa1 o 1,3 mg/ml de celulasa Onozuka R-10 (Yakult Honsha) (Salinas-Mondragón *et al.*, 1999). Luego de 5 horas de tratamiento, se recogieron las hojas y se lavaron en *buffer* fosfato de sodio 50 mM pH 7, 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 0,33 mg/ml ferricianuro de potasio, y luego transferidos a la misma solución, conteniendo además 0,5 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-BD-glucurónico (X-Gluc; Gold Biotechnology). Las hojas se infiltraron al vacío durante 3 minutos, se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se destiñeron por completo en etanol 96% v/v para su posterior evaluación.

3.13. Ensayo de liberación de iones

Se realizaron infiltraciones por presión en hojas de tabaco con Hpa1 a dos concentraciones o *buffer* como control, y se cortaron discos de hojas de 1,3 cm de diámetro incluyendo la zona infiltrada luego de 6 horas de tratamiento. Los discos se colocaron en 1 ml agua destilada y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se midió la conductividad eléctrica. Posteriormente, los discos de hoja sumergidos en agua fueron incubados en un baño a 100 °C por 20 minutos. Se midió la conductividad de los discos de hojas hervidos, la cual fue tomada como el 100% del contenido de iones (Baker *et al.*, 1991).

3.14. Análisis transcripcional

3.14.1. Extracción de ARN de plantas con TRIzol®

Las hojas de plantas se lavaron con H₂O destilada, con etanol 75% en H₂O destilada autoclavada, y se enjuagaron con H₂O destilada autoclavada. Luego se secaron sobre papel y las nervaduras principales se desecharon. Se procesó el material utilizando un mortero y nitrógeno líquido hasta convertirlo en fino polvo y se colocaron aproximadamente 100 mg en un tubo plástico de 1,5 ml. Luego se agregaron 550-600 µl del reactivo TRIzol® (Invitrogen) evitando el descongelamiento de la muestra, se agitó con vigorosamente durante 10 segundos y se lo guardó a -70 °C hasta su uso. Para este caso, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 14000 g a 4 °C durante 20 minutos, y se trasvasó el sobrenadante (aproximadamente 500 µl) a un tubo plástico de 1,5 ml nuevo. Luego de agregar 200-250 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 20 segundos, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos más a 4 °C a velocidad máxima para separar las fases. La fase acuosa superior (250 µl) se trasvasó a un tubo nuevo de 1,5 ml y se adicionó 1 volumen de isopropanol. Luego de incubar por 30 minutos en hielo esta mezcla, se centrifugó a 14000 g a 4 °C durante 30 minutos, se lavó dos veces con 500 µl de etanol 70% v/v (en agua bidestilada-DEPC (dietilpirocarbonato)), resuspendiendo el *pellet* para un mejor lavado. Luego de los lavados, la muestra se secó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en 20 µl de H₂O bidestilada-DEPC. La calidad de los ARNs se comprobó por medidas de absorbancia tomando en cuenta las relaciones 260/280 nm y 260/230 nm utilizando un espectrómetro (modelo V-630 Jasco). Para la reacción de retrotranscripción se utilizó 1 µg de ARN total.

3.14.2. Extracción de ARN bacteriano con TRIzol®

El ARN bacteriano total fue aislado usando el reactivo TRIzol® siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparó ARN a partir de 500 µl de cultivo en el medio deseado, o de diversas muestras en el caso del crecimiento epifítico. Luego de la preparación de ARN bacteriano, se realizó un tratamiento con ADNasa libre de ARNasas (Promega) para su posterior utilización como molde en la reacción de retrotranscripción donde se utilizó 1 µg de ARN total.

3.14.3. Extracción de ARN bacteriano a partir de hojas infectadas

Las preparaciones de ARN de bacteria obtenidos de hojas inoculadas a distintos tiempos post infección fueron realizadas como ha sido descrito previamente (Mehta y Rosato, 2003). Brevemente, las hojas de plantas fueron infiltradas con *X. axonopodis* pv. *citri* o *X. campestris* pv. *vesicatoria*, y luego de cada tiempo de infección, las mismas fueron decontaminadas con alcohol 70% v/v y se les quitaron las nervaduras. Luego fueron cortadas con un bisturí estéril, disgregadas con las ayuda de un *tip*, y mantenidas por 30 minutos en un tubo estéril con 10 ml de NaCl 0,85% p/v a fin de permitir que las bacterias exuden desde la hoja al medio líquido. La suspensión fue separada de las hojas succionando el agua y centrifugando para recuperar las células bacterianas que posteriormente fueron lavadas con NaCl 0,85% p/v y usadas para la extracción de ARN con el reactivo TRIzol[®] siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante comentado anteriormente. Luego de la preparación de ARN bacteriano, se realizó un tratamiento con ADNasal libre de ARNasas (Promega) para su posterior utilización como molde en la reacción de retrotranscripción donde se utilizó 1 µg de ARN total.

3.14.4. Reacción de retrotranscripción

La síntesis de las moléculas de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total usando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y el oligonucleótido dN₆ para el caso de ARN bacteriano, y dT₂₂ para el caso de ARN vegetal. Las condiciones de reacción fueron: 2 minutos a 72 °C, 1 hora a 42 °C terminando con 5 minutos a 94 °C.

3.14.5. Cuantificación por RT-PCR

Las condiciones de amplificación para los genes analizados, *hpa1* y *16S*, fueron: 2 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 40 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1,3% p/v, sembrando una volumen igual para cada uno. Los pares de oligonucleótidos utilizados (Tabla 3.4) fueron:

<i>hpa1</i>	<i>hpa1intBF</i> y <i>hpa1intHR</i>
<i>16S</i>	<i>16SUp</i> y <i>16SDown</i>

3.14.6. Cuantificación por qRT-PCR

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo con 5 μ l de ADNc (0,01 μ g/ μ l) como molde, 0,5 U de ADN Polimerasa Taq Platinum (Invitrogen), *buffer* de reacción 1X, dNTPs 0,2 mM y 20 pmol de cada oligonucleótido cebador en un termociclador (modelo Mastercycler ep realplex Eppendorf) utilizando SYBR Green I (Roche) para monitorear la síntesis de la doble hebra de ADN. Las condiciones de qRT-PCR fueron 1 minuto a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 40 segundos a 72 °C. Posterior a la amplificación se corrió un análisis para determinar amplificación de sólo un fragmento de ADN. Los valores se normalizaron en base a la referencia interna (C_{t_r} , gen *housekeeping*) de acuerdo a la ecuación $\Delta C_t = C_t - C_{t_r}$, y se cuantificaron como $2^{-\Delta C_t}$. Una segunda normalización con respecto a la condición o situación control (C_{t_c} , día cero de infiltración o infiltración con *buffer*), $\Delta\Delta C_t = C_t - C_{t_c}$, produce una cuantificación relativa: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados fueron analizados por análisis de la variancia de simple entrada (ANOVA). Los pares de oligonucleótidos utilizados (Tabla 3.4) fueron:

<i>hpa1</i>	hpa1intBF y hpa1intHR
<i>16S</i>	16SUp y 16Sdown
<i>Tubulina</i>	tubUp y tubDown
<i>AtMAPK3</i>	AtMAPK3Up y AtMAPK3Down
<i>AtMKK4</i>	AtMKK4Up y AtMKK4Down
<i>AtWRKY30</i>	AtWRKY30Up y AtWRKY30Down
<i>Actina</i>	ActinaUp y ActinaDown
<i>CsMAPK3</i>	CsMAPK3Up y CsMAPK3Down
<i>CsMKK4</i>	CsMKK4Up y CsMKK4Down
<i>CsWRKY30</i>	CsWRKY30Up y CsWRKY30Up
<i>CsGST</i>	CsGSTL y CsMSODF
<i>CsMSOD</i>	CsGSTR y CsMSODR
<i>CsPrxA</i>	CsPrxAF y CsPrxAR
<i>CsPR1</i>	CsPR1R y CsPR1L
<i>CsPR4</i>	CsPR4L y CsPR4R
<i>CsHMGR</i>	CsHMGRR y CsHMGRRL
<i>CsPAL</i>	CsPALR y CsPALL
<i>SIRp12</i>	SIRp12F y SIRp12R

SILrr22 SILrr22F y SILrr22R
SIPti5 SIPti5F y SIPti5R
SIGras2 SIGras2F y SIGras2R
SIWrky28 SIWRKY28F y SIWRKY28R

3.15. Ensayo de dos híbridos en levaduras

3.15.1. Medios de cultivo para cepas de levaduras

Las distintas cepas PJ694-a de *Saccharomyces cerevisiae* sin o con vectores se crecieron a 30 °C en medio YAPD (1% extracto de levadura, 2% de peptona de carne, 2% glucosa y 0,008% adenina) o en medio Sc (0,66% base nitrogenada sin aminoácidos, 2% glucosa, 0,008% adenina y 0,8% mezcla de aminoácidos, pH=5,6). Cuando se necesitó, el medio Sc fue preparado sin uno o más aminoácidos específicos o base nitrogenada: -His o -H (histidina), -Trp o -W (triptófano), -Leu o -L (leucina), -Ade o -A (adenina). Cuando se creció sobre medio sólido se adicionó agar 1,6%. El uso de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) se indica en cada caso a la concentración indicada, partiendo de una solución 1 M en H₂O estéril.

3.15.2. Clonado de genes y análisis de dos híbridos en levaduras

Se clonaron los genes completos *hrpE* y *hpa1*, y los fragmentos *hpa1*₁₋₃₂, *hpa1*₁₋₅₇, *hpa1*₃₃₋₁₀₅, *hpa1*₅₈₋₁₃₇ y *hpa1*₁₀₆₋₁₃₇. en el vector replicativo en levaduras pOBD (Figura 3.1), generándose los vectores pOBD-*hrpE*, pOBD-*hpa1*, pOBD-*hpa1*₁₋₃₂, pOBD-*hpa1*₁₋₅₇, pOBD-*hpa1*₃₃₋₁₀₅, pOBD-*hpa1*₅₈₋₁₃₇ y pOBD-*hpa1*₁₀₆₋₁₃₇, respectivamente. Los fragmentos génicos se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos detallados a continuación, para cada caso (Tabla 3.4):

<i>hrpE</i>	hrpEpOXD-L y hrpEpOXD-R
<i>hpa1</i>	hpa1pOXD-L y hpa1A
<i>hpa1</i> ₁₋₃₂	hpa1pOXD-L y hpa1_32pOXD-R
<i>hpa1</i> ₁₋₅₇	hpa1pOXD-L y hpa1_57pOXD-R
<i>hpa1</i> ₃₃₋₁₀₅	hpa1_33pOXD-L y hpa1_105pOXD-R
<i>hpa1</i> ₅₈₋₁₃₇	hpa1_58pOXD-L y hpa1A
<i>hpa1</i> ₁₀₆₋₁₃₇	hpa1_106pOXD-L y hpa1A

Se utilizaron las enzimas de restricción NcoI y PstI tanto en el vector pOBD como en todos los casos de fragmentos.

3.15.3. Primer transformación de levaduras

La primer transformación de la cepa PJ69-4a de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se llevó a cabo con estos vectores; para lo cual se utilizó un protocolo

rápido utilizando acetato de litio y PEG3350, y selección sobre placas con Sc-W por 4 días a 30 °C (Gietz *et al.*, 1998).

3.15.4. Prueba de autoactivación

Para determinar las cantidades de 3AT (Sigma) a ser usado para cada proteína a evaluar, se plaquearon aproximadamente 1000 células de levadura conteniendo sólo el vector pOBD con el gen a chequear (pOBD-*hrpE*, pOBD-*hpa1*, pOBD-*hpa1*₁₋₃₂, pOBD-*hpa1*₁₋₅₇, pOBD-*hpa1*₃₃₋₁₀₅, pOBD-*hpa1*₅₈₋₁₃₇ y pOBD-*hpa1*₁₀₆₋₁₃₇) sobre medio Sc-WH conteniendo 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 115, 130, 150 o 200 mM 3AT, incubándose luego a 30 °C por 5 días. La prueba de autoactivación consiste en determinar la concentración a partir de la cual deja de haber crecimiento de levaduras. Los valores determinados para cada construcción están detallados en la tabla correspondiente (Tabla 7.1).

3.15.5. Segunda transformación de levaduras

Para realizar el ensayo de interacción con proteínas de *Citrus sinensis*, se transformaron las levaduras conteniendo los vectores pOBD correspondientes con la biblioteca de ADNc de plantas de naranja clonada en el vector pOAD (Figura 3.2) realizada en el laboratorio del Profesor Chuck Shaker Farah, para lo cual se utilizó un protocolo de alta eficiencia de transformación escalado a 30X como ha sido descrito (Gietz y Woods, 2002), empleando 60 µg de ADN plasmídico. Luego, se plaquearon 5 ml de mezcla de transformación conteniendo las cepas de levaduras sobre 10 placas (150 x 15 mm) para cada caso a evaluar conteniendo el medio Sc-WHL suplementadas con X mM 3AT (siendo X la concentración determinada en la prueba de autoactivación para cada caso) y se incubaron por 14 días a 30 °C. Esta técnica produjo en promedio 1×10^5 levaduras transformantes sobre placas con Sc-WL (Gietz y Woods, 2002).

3.15.6. Selección de colonias, extracción de ADN y secuenciación

Posteriormente, se repicaron las colonias obtenidas en placas con medio Sc-WHLA. Las colonias resultantes fueron nuevamente repicadas y se preparó ADN plasmídico desde estas levaduras utilizando un método modificado para placas de 96 pocillos (Alegria *et al.*, 2004). A continuación, estos plásmidos fueron transformados por electroporación en la cepa KC8 de *E. coli*, a partir de las que se

preparó ADN plasmídico que luego fue utilizado como molde para realizar una reacción de PCR mediante el sistema Big Dye (Applied Biosystems) y posterior secuenciación del producto obtenido (Alegria *et al.*, 2004).

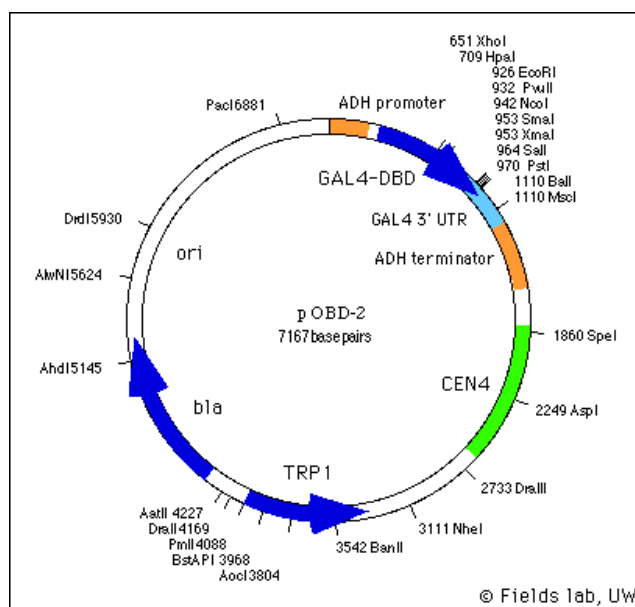


Figura 3.1. Mapa del vector pOBD-2. GAL4-DBD, corresponde al dominio de unión (DB) de GAL4; *bla*, resistencia a antibióticos β -lactámicos; TRP1, auxotrofia sobre triptofano; CEN4, centrómero que permite una eficiente segregación. Tomado de Uetz *et al.*, 2000; <http://depts.washington.edu/sfields/protocols/>.

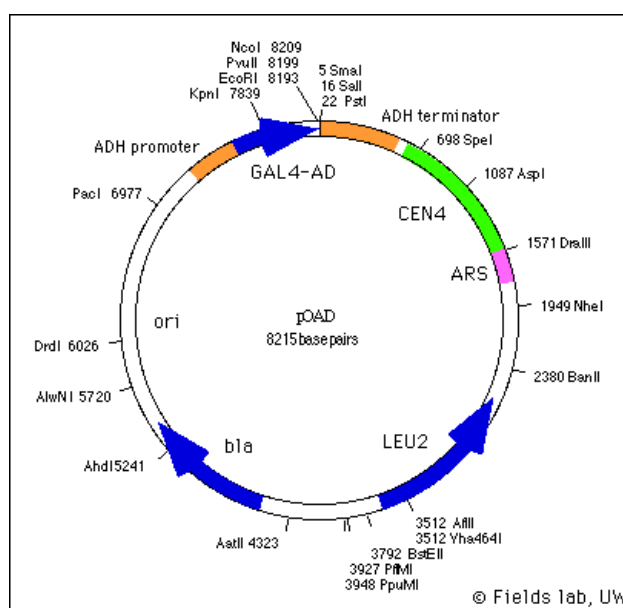


Figura 3.2. Mapa del vector pOAD. GAL4-DBD, corresponde al dominio de activación (AD) de GAL4; *bla*, resistencia a antibióticos β -lactámicos; LEU2, auxotrofia sobre leucina; CEN4, centrómero que permite una eficiente segregación. Tomado de Uetz *et al.*, 2000; <http://depts.washington.edu/sfields/protocols/>.

3.16. Producción de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de *Western blot* se obtuvieron en conejos. Primeramente, los sueros pre-inmunes provenientes del animal elegido fueron probados en ensayos contra las proteínas deseadas y extractos de *E. coli*, buscando aquellos donde no preexistan reconocimiento de epitopes. Posteriormente se realizaron dos inoculaciones utilizando los coadyuvantes correspondientes. Luego del período necesario, se extrajeron diversos volúmenes de sangre del animal inoculado, se centrifugó 5 minutos a 5000 g, y se separó el suero, el cual se guardó a -20 °C o -70 °C previamente alicuotado. Para los ensayos de *Western blot*, se analizó primeramente el título del cada suero analizando distintas diluciones del mismo frente a una cantidad constante de proteína.

Para la purificación de los anticuerpos realizada para el caso de anti-HrpE, se procedió a correr en un gel de SDS-PAGE preparativo la proteína HrpE. Posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (ver Materiales y Métodos 3.5.2.), la cual se tiñó con el colorante rojo Ponceau para determinar la ubicación de la misma. Se cortó la zona en un tira, y luego en trozos más pequeños, los que se incubaron en *buffer* PBS-leche por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron 3 veces con *buffer* PBS por 10 minutos cada vez, para después incubarlos con el suero a purificar durante 1 hora (500 μ l de suero para cada trozo). Pasada esta incubación, se lavaron nuevamente los trozos de membrana con *buffer* PBS. Los anticuerpos unidos a la proteína transferida a la membrana se liberaron utilizando un solución de bajo pH. Se incubaron los trozos por 1 minuto con una solución de Glicina 100 mM pH 2,7 y NaCl 100 mM (500 μ l). Para evitar la precipitación proteica, inmediatamente a la extracción de este volumen se le agregaron 50 μ l de *buffer* Tris-HCl 1 M pH 8. Este proceso se repitió 3 veces para cada trozo de membrana. Para aumentar la estabilidad de los anticuerpos purificados, se agregó a la extracción final BSA 1 mg/ml. Posteriormente, se alicuotaron las extracciones de suero purificado y se guardaron a -20 °C o -70 °C.

3.17. Ensayo de secreción a través del SST3

Para lograr determinar si Hpa1 es secretada por el SST3 de Xac, se analizó la presencia de esta proteína en el sobrenadante de cultivo de diversas cepas de Xac a través de *Western blot*. Como controles, y para determinar si la secreción es dependiente del SST3, se utilizaron la cepa mutante Xac Δ hpa1, y la cepa mutante en el SST3 XachrpB⁻, respectivamente. Esta última es incapaz de formar un SST3 funcional (Dunger *et al.*, 2005), y por lo tanto secretar factores a través del mismo. Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron como fue descrito previamente por Büttner y colaboradores (Büttner *et al.*, 2002) y el ensayo de *Western blot* se realizó utilizando anticuerpos específicos contra ⁶His-Hpa1 desarrollados en este trabajo de tesis (ver Materiales y Métodos 3.16.). Brevemente, las bacterias se crecieron en el medio MA suplementado con los antibióticos correspondientes durante toda la noche a 28 °C, y se diluyeron a una concentración de 10⁸ UFC/ml en el mismo medio pero acidificado a pH 5,4 con la adición de HCl y conteniendo 100 µg/ml de BSA y colocaron nuevamente a 28 °C por 5 a 6 horas. Posteriormente, se centrifugaron 0,5 ml de cultivos totales (10000 g durante 10 minutos a 4 °C) y se resuspendieron en el 50 µl de *buffer* Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM. El resto del volumen de cultivo (aproximadamente 50 ml) se precipitó con ácido tricloroacético 10% v/v y deoxicolato de sodio 1% p/v durante toda la noche a 4 °C. Los *pellets* se centrifugaron a 21000 g por 1 hora, se lavaron con acetona fría, y se resuspendieron en 500 µl de *buffer* Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM. Las muestras se separaron por SDS-PAGE (ver Materiales y Métodos 3.5.1.) y se transfirieron a nitrocelulosa y se realizó el ensayo de *Western blot* correspondiente (ver Materiales y Métodos 3.5.2.).

3.18. Análisis de datos

Los programas computacionales utilizados en el presente trabajo se listan a continuación, y fueron manipulados en base a lo aconsejado en sus respectivos tutoriales para una mejor obtención de resultados. En los casos de los programas que funcionan en línea, se detalla además su dirección de internet.

- ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)
- PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)
- Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)
- ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)
- ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)
- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Las imágenes de los geles de agarosa, poliacrilamida y las membranas de transferencia se procesaron con los programas Adobe Photoshop CS2 v9.0 (Adobe System Incorporated) y Corel DRAW X4 v14.0 (Corel Corporation).

Capítulo 1

Caracterización funcional de la proteína Hpa1

expresar la proteína de fusión con una cola de residuos de histidina colocada en el extremo amino terminal, ⁶His-Hpa1, y permite la purificación de la misma por cromatografía de afinidad, utilizando columnas que poseen cationes divalentes, como Ni²⁺. Este vector fue introducido en la cepa de *E. coli* BL21 pLysS por transformación química. Una vez inducida la expresión utilizando el inductor IPTG en las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de inducción, se procedió a la purificación de la proteína recombinante mediante el uso de una columna de afinidad de Ni-NTA Agarosa (ver Materiales y Métodos 3.4.2. y 3.4.3.). De esta forma, se obtuvo la proteína Hpa1 fusionada a una pequeña cola de residuos de histidina en la región amino terminal, ⁶His-Hpa1 (Figura 4.2).

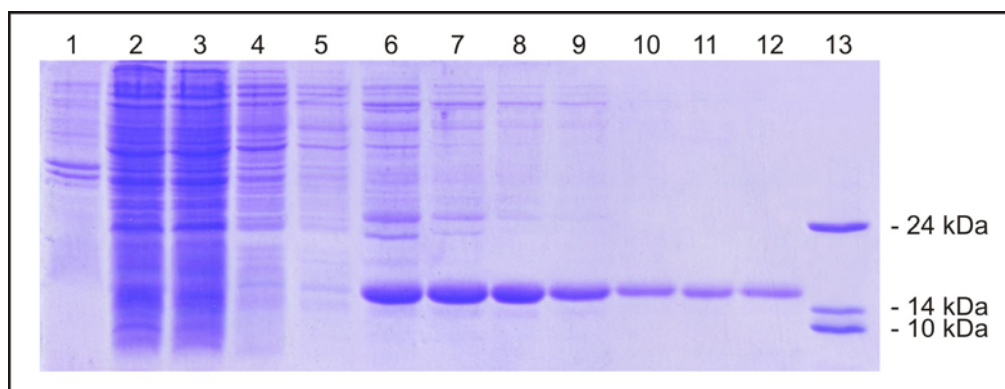


Figura 4.2. Gel de SDS-PAGE al 16% mostrando los pasos de la purificación de ⁶His-Hpa1 de Xac. Calle 1: Pellet; Calle 2: Sobrenadante; Calle 3: Fracción no unida a resina; Calles 4 y 5: Lavados; Calles 6 a 12: Eluidos; Calle 13: Marcador de peso molecular.

4.2. Caracterización de la respuesta hacia Hpa1 de Xac en plantas no hospedadoras y hospedadoras

4.2.1. Análisis de los fenotipos en plantas no hospedadoras y hospedadoras en respuesta a Hpa1 de Xac

Con la proteína Hpa1 purificada (⁶His-Hpa1) se realizaron ensayos infiltrando hojas de diversas plantas no hospedadoras (ver Materiales y Métodos 3.9.1.) con la intención de caracterizar el efecto que produce Hpa1 en cada una de ellas. Así, se procedió a infiltrar la proteína pura a distintas concentraciones (desde 0,5 μ M hasta 25 μ M) en hojas de plantas no hospedadoras como pimiento, tabaco y algodón. En este ensayo se observaron las lesiones típicas de HR en pimiento y tabaco a partir de 1 μ M y 2,5 μ M, respectivamente. Llamativamente, en hojas de plantas de algodón no se logró observar ningún efecto, aún en las concentraciones más altas de proteína (Figura 4.3).

A fin de evidenciar si estas lesiones de HR son producidas específicamente por Hpa1, se realizaron diversos controles utilizando distintas concentraciones de proteínas no patogénicas ampliamente utilizadas (Trx-⁶His y BSA), como así también infiltraciones del *buffer* utilizado para resuspender las proteínas (Figura 4.3). Esto permitió determinar y aseverar que el efecto observado con ⁶His-Hpa1 es específico de esta proteína harpin. La falta de aparición de HR en el ensayo realizado con hojas de algodón se puede fundamentar en el hecho de que la inducción de esta respuesta depende de la interacción harpin-planta; resultados previos han revelado que las diferentes proteínas harpin pueden inducir diversas reacciones en el tejido vegetal. Este es el caso de HpaG de Xag, Hpa1 de Xoo, XopA de Xcv, y HrpN de *E. amylovora*, que causan diferentes reacciones en hojas de tabaco, las cuales van desde la ausencia de reacción en el caso de XopA a una marcada HR causada por HpaG, incluso a 50 nM (Kim *et al.*, 2003).

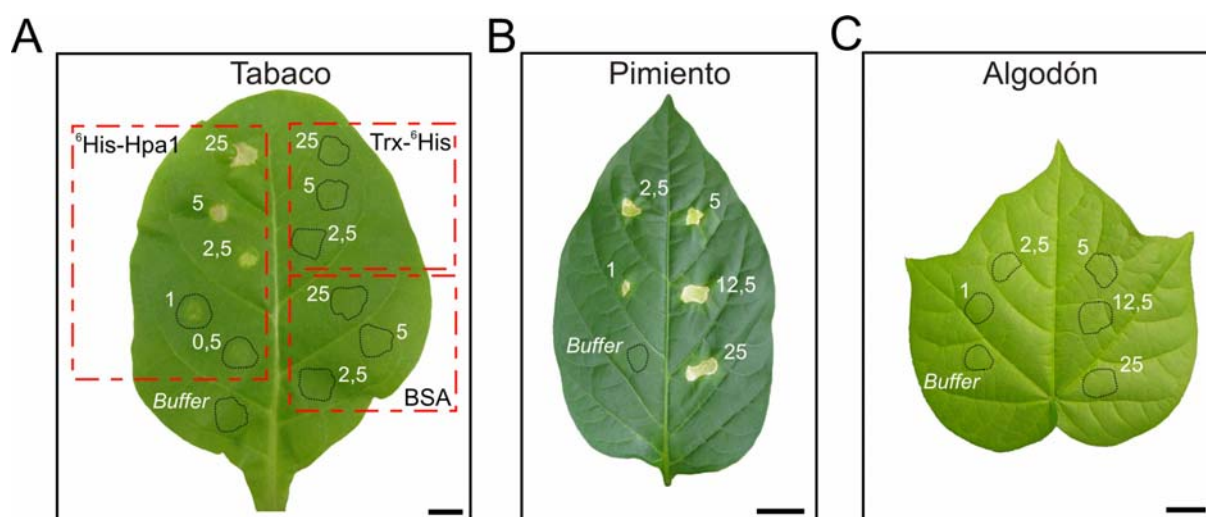


Figura 4.3. (A) Hpa1 desarrolla HR en hojas de tabaco. La hoja de tabaco se infiltró con $^6\text{His-Hpa1}$ en las concentraciones indicadas (en μM) utilizando como *buffer* Tris 50 mM pH 8. Como controles se utilizaron dos proteínas no relacionadas con la patogenicidad, Tiorredoxina- ^6His (Trx- ^6His) y Albúmina Sérica Bovina (BSA). Otro control realizado, incluyó el uso del *buffer* en el que se solubilizaron las proteínas, Tris 50 mM pH 8 (*Buffer*). (B) Hpa1 desarrolla HR en pimiento en las concentraciones indicadas (en μM), el control realizado es el mismo que en el caso de tabaco (*Buffer*). (C) Hpa1 no causa HR en hojas de algodón en las concentraciones detalladas (en μM), el control realizado es el mismo que en los casos anteriores (*Buffer*). Las fotografías fueron tomadas 1 día después de la inoculación. Las barras indican 1 cm en cada caso.

La proteína homóloga a Hpa1 de Xac, HpaG de Xag, no desarrolla HR cuando es enfrentada a especies de plantas no hospedadoras como tomate, col, y diversos ecotipos de *A. thaliana*, como Col-0 (Columbia 0) y Ler (Landsberg erecta), indicando nuevamente un grado de selectividad (Kim *et al.*, 2003). Otros ecotipos caracterizados de *A. thaliana* y comúnmente utilizados son Ws (Wassilewskija), Nossen, C24, y Cvi (Cape Verde Island) (Alconada Magliano *et al.*, 2005). Para determinar la selectividad de Hpa1 de Xac, se continuó analizando la respuesta a esta proteína de diversos ecotipos de *A. thaliana*. Así, se infiltraron hojas de *A. thaliana* de los siguientes ecotipos: Col-0, Ler, Ws, Nossen y C24 con $^6\text{His-Hpa1}$ a una concentración 5 μM (ver Materiales y Métodos 3.9.1.), y en todos los casos se visualizó el desarrollo de HR (Figura 4.4). Sin embargo, cuando el ensayo se realizó utilizando concentraciones más bajas de proteína, en todos los casos no se observó ninguna respuesta (datos no mostrados).

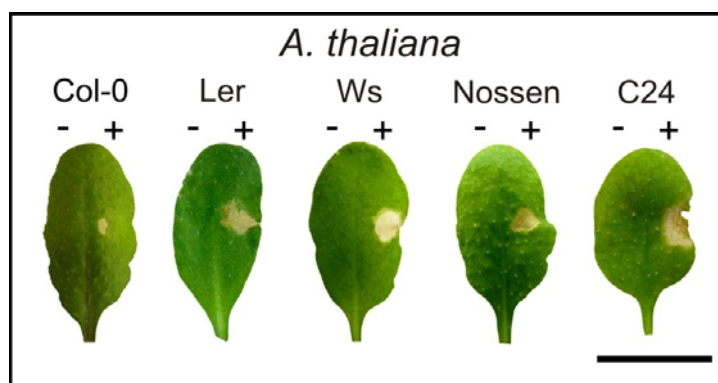


Figura 4.4. Hpa1 a una concentración 5 μ M induce HR en diferentes cultivares de *A. thaliana*. La proteína se infiltró en las mitades derecha de las hojas (+). Como control se utilizó *buffer* Tris 50 mM pH 8 en las mitades izquierda de cada hoja (-). Las fotografías fueron tomadas 1 días post infiltración. La barra indica 1 cm.

Tal como se comentó anteriormente, en general las proteínas harpin poseen una actividad inductora de HR en plantas no hospedadoras que es termoestable (Alfano y Collmer, 1997). Con el objetivo de corroborar esta característica en Hpa1 de Xac, se procedió a la infiltración de hojas de tabaco y pimiento con 6 His-Hpa1 purificada y posteriormente calentada a 90 °C por 3 minutos. Una vez a temperatura ambiente, la proteína se infiltró de la misma manera que en los ensayos respectivos previos (ver Materiales y Métodos 3.9.1.). En este caso, la concentración de proteína fue 5 μ M, ya que es una concentración en la cual previamente se observó el desarrollo de HR en estas especies de plantas. Tal como se ha observado y determinado para otras proteínas harpin, Hpa1 de Xac también posee una actividad inductora de HR termoestable, al menos luego de ser calentada por 3 minutos (Figura 4.5).

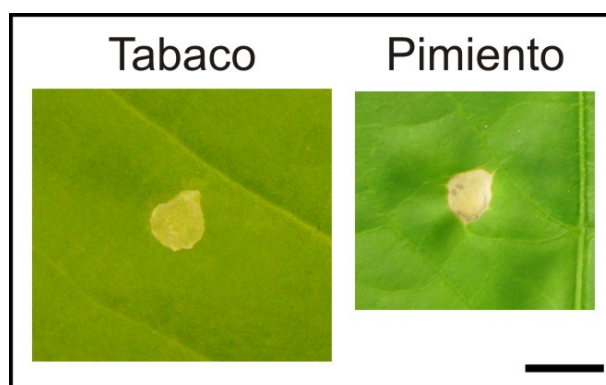


Figura 4.5. Hpa1 posee actividad inductora de HR en plantas no hospedadoras termoestable.

Una vez analizadas todas estas diversas especies de plantas no hospedadoras, se decidió evaluar si Hpa1 también podría inducir HR en hojas de plantas hospedadoras. Así, ^6His -Hpa1 pura se infiltró en hojas de cítricos (ver Materiales y Métodos 3.9.1.) a distintas concentraciones (desde $1\ \mu\text{M}$ a $25\ \mu\text{M}$), no observándose ninguna reacción (Figura 4.6), incluso a la concentración más alta de proteína. Este resultado indicó que en plantas de cítricos Hpa1 no está involucrada en el desencadenamiento de una respuesta con muerte celular visible.

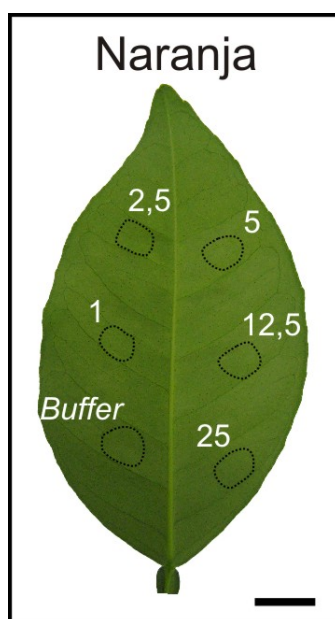


Figura 4.6. Análisis del efecto de Hpa1 en hojas de cítricos. Se infiltraron hojas de naranja (*Citrus sinensis*) con ^6His -Hpa1 a las concentraciones indicadas (en μM) en Tris 50 mM pH 8. Como control se utilizó Tris 50 mM pH 8 (*Buffer*). No se observa ningún efecto visual en las hojas, aún luego de 21 días y usando $25\ \mu\text{M}$ de proteína. La barra indica 1 cm.

4.2.2. Análisis de muerte celular y de la producción de peróxido de hidrógeno en plantas no hospedadoras

El objetivo de la HR es generar una barrera física, compuesta por células muertas de la planta, que limite la disponibilidad de nutrientes al patógeno, restringiendo de esta forma su diseminación, lo que puede ser acompañado por una explosión oxidativa como respuesta de defensa (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Con el objetivo de caracterizar el desarrollo de HR en plantas no hospedadoras, se realizaron diversas pruebas bioquímicas, como la tinción con los colorantes Azul de Tripán o DAB.

El Azul de Tripán es un colorante que tiñe células y tejidos muertos. Su reactividad está basada en las características del cromóforo, el cual está

negativamente cargado y no tiñe células con membranas celulares intactas, ya que la selectividad de estas por los compuestos no permite el ingreso del colorante en células vivas (Koch y Slusarenko, 1990). Otro marcador de HR es la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por la activación de genes de respuesta de defensa. La explosión oxidativa es una de las respuestas más tempranas que ocurren contra la infección por patógeno y generalmente está asociada con la HR (Lamb y Dixon, 1997). Entre las principales ROS producidas se encuentran el peróxido de hidrógeno y el ión superóxido, que poseen actividades antimicrobianas directas y además están implicados en la muerte celular mediando como segundos mensajeros (Venisse *et al.*, 2001; Gechev y Hille 2005). Estas especies pueden ser localizadas en los tejidos utilizando el colorante 3,3'-Diaminobencidina (DAB), un reactivo histoquímico que se observa con una coloración marrón al producirse la oxidación del mismo debido a las peroxidasas endógenas activas en el sitio de inoculación. Así, se realizaron infiltraciones en hojas de plantas de tabaco utilizando 6 His-Hpa1 (a $5 \mu M$), Xac salvaje (suspensión a 10^8 UFC/ml) como control positivo, o *buffer* como control negativo, y se realizaron las respectivas tinciones de las hojas con los colorantes Azul de Tripán y DAB (ver Materiales y Métodos 3.12.1. y 3.12.2.). Los resultados indicaron que Hpa1 genera en tabaco una HR caracterizada por muerte celular y producción de ROS, de la misma forma que lo hace Xac salvaje, utilizada como control positivo de desarrollo de HR en estos ensayos bioquímicos (Figura 4.7).

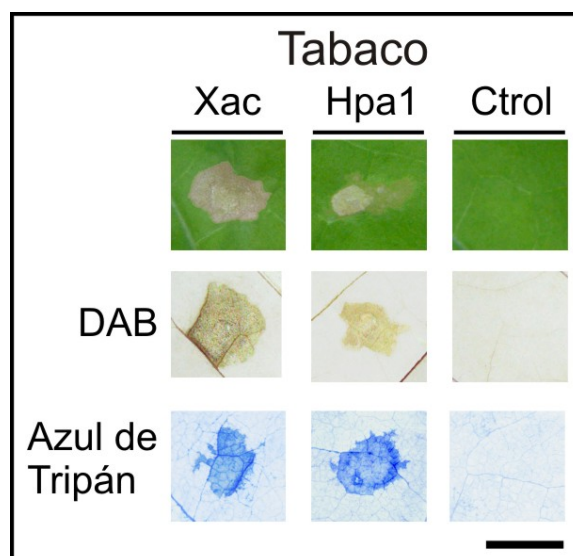


Figura 4.7. Caracterización de la HR provocada por Hpa1 en hojas de tabaco utilizando ensayos de tinción con Azul de Tripán y 3,3'-Diaminobencidina (DAB). La proteína ^6His -Hpa1 se infiltró a una concentración $5\ \mu\text{M}$ (Hpa1). Como control positivo se infiltró Xac tipo salvaje a 10^8 UFC/ml (Xac), y como control negativo se utilizó *buffer* Tris 50 mM pH 8 (Ctrl). La barra representa 1 cm.

4.2.3. Análisis de liberación de iones en plantas no hospedadoras

La liberación de iones también se correlaciona con la HR y la muerte celular (Koch y Slusarenko, 1990; Zhang *et al.*, 2004). El daño a las membranas celulares está relacionado con la respuesta a una amplia variedad de estreses, entre los que se incluye al estrés biótico. La permeabilidad de la membrana es alterada produciendo la liberación de electrolitos por las células de los tejidos infectados por patógenos, como resultado de la muerte celular (Zhang *et al.*, 2004). La liberación de electrolitos puede ser determinada por conductividad. Esta medida es un indicador sensible y seguro de la severidad del daño a los tejidos de la planta como consecuencia de la interacción con un patógeno (Baker *et al.*, 1991). Por lo tanto, a continuación se realizó un ensayo de liberación de iones (ver Materiales y Métodos 3.13.) para complementar la caracterización de la respuesta de plantas no hospedadoras a Hpa1, utilizando tabaco como modelo. Se infiltraron hojas de tabaco con Hpa1 a dos concentraciones ($5\ \mu\text{M}$ y $25\ \mu\text{M}$), y como control se infiltró *buffer* Tris 50 mM pH 8. Así, luego de 6 horas de tratamiento se observó una diferencia significativa entre los tratamientos con Hpa1 con respecto al control, observándose un mayor porcentaje de iones liberados (Figura 4.8). Este ensayo también indicó que la infiltración con una concentración mayor de proteína, como $25\ \mu\text{M}$, no genera un aumento significativo de liberación de iones con respecto a la proteína infiltrada a una concentración menor, $5\ \mu\text{M}$. De esta forma, se corroboró que la proteína harpin

produce muerte celular en el tejido de hojas de tabaco, aumentando el nivel de iones liberados por ruptura celular.

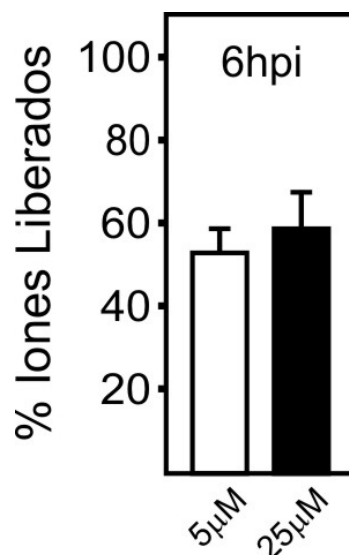


Figura 4.8. Ensayo de liberación de iones en plantas de tabaco en respuesta a Hpa1. Se infiltró la proteína a dos concentraciones diferentes y se analizó el porcentaje de iones liberados en cada caso. Como control se infiltró el tejido con *buffer* Tris 50 mM pH 8. Los valores representan las medias de tres experimentos independientes para cada concentración, relativos al tratamiento con *buffer* a 6 horas post infiltración. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

4.2.4. Análisis de la deposición de calosa

La deposición de calosa es otro marcador de la inmunidad disparada en plantas infectadas (Nguyen *et al.*, 2010). La calosa juega un papel importante durante una variedad de procesos, como el desarrollo de la planta y en respuesta a múltiples estreses tanto bióticos como abióticos (Chen y Kim, 2009). Por lo tanto, se analizó la deposición de este polisacárido en hojas de *A. thaliana* y hojas de cítricos tratadas con Hpa1 a una concentración 5 μM, o *buffer* Tris 50 mM pH 8, por 5 horas (ver Materiales y Métodos 3.12.3.). A diferencia de las infiltraciones con *buffer* (utilizado como control), los tejidos tratados con proteína indicaron que Hpa1 induce significativamente una mayor deposición de calosa en hojas de cítricos, aunque la misma es menos intensa que la inducida en hojas de *A. thaliana* (Figura 4.9 A). Además, se cuantificaron los depósitos de calosa midiendo la fluorescencia en los tratamientos realizados. Para ello, se tomaron al menos 30 fotos de diferentes campos dentro de la zona analizada, y se cuantificó el porcentaje de *pixels* de color azul, tomados a partir de una intensidad determinada, sobre el total de *pixels* que conforman la foto (Luna *et al.*, 2011). La intensidad de fluorescencia utilizada fue la

obtenida como promedio de la encontrada en los controles negativos para cada caso. De esta forma, se pudo graficar cuánto mayor fue la deposición de calosa en los distintos tratamientos, con respecto a los respectivos controles negativos (Figura 4.9 B). Este ensayo indicó que Hpa1 fue capaz de inducir una respuesta inmune basal fuerte en el caso de plantas no hospedadoras, pero más débil en el caso de plantas hospedadoras.

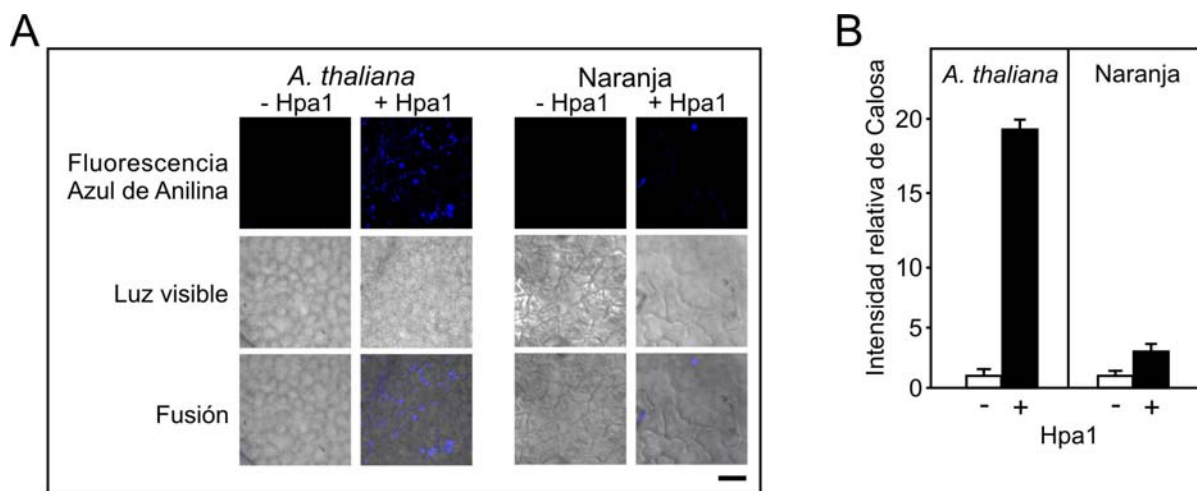


Figura 4.9. (A) Coloración por Azul de Anilina de la deposición de calosa en hojas de *A. thaliana* y hojas de cítricos (Naranja) infiltradas con *buffer* o Hpa1, observado con luz visible y UV en microscopía. Se muestran las imágenes obtenidas incidiendo cada tipo de luz, y la imagen obtenida al solapar las anteriores, para cada tratamiento y especie. **(B)** Las intensidades relativas de calosa se cuantificaron como se describe en el texto. Los valores representan las medias estandarizadas a la intensidad de calosa en hojas tratadas con *buffer* (-Hpa1). Las barras de error indican las desviaciones estándar en el caso del tratamiento control, y el error propagado en el caso del tratamiento con Hpa1. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. La barra representa 20 μm .

4.3. Análisis de la expresión transcripcional de genes de defensa en respuesta a Hpa1

4.3.1. Análisis de expresión de genes a través de qRT-PCR

Como se comentó anteriormente, la HR es caracterizada por un aumento en la expresión de distintos genes de defensa de la planta (Datta y Muthukrishnan, 1991; Boller y Félix, 2009; Asai *et al.*, 2002), por lo que se decidió realizar un análisis sobre el papel de Hpa1 como proteína inductora de la respuesta de defensa basal. Para ello, se evaluó si Hpa1 es capaz de desencadenar los eventos tempranos que se producen durante la respuesta inmune basal en plantas, tales como la inducción de la cascada de MAP Quinasas que conducen a la activación de factores de transcripción de tipo WRKY, y la expresión de genes asociados a la defensa (Boller y Félix, 2009). Debido a que en *A. thaliana* Col-0 se conocen los genes inducidos durante la respuesta de defensa, se decidió utilizar esta especie como modelo de planta no hospedadora, y *Citrus sinensis* como modelo de planta hospedadora. En primer lugar hojas de estas plantas se infiltraron con Hpa1 a una concentración 5 μ M y, luego de 5 horas, se extrajo el ARN total (ver Materiales y Métodos 3.14.1. y 3.14.4.) del tejido vegetal tratado con proteína, o *buffer* como control (Tris 50 mM pH 8), para el posterior análisis utilizando qRT-PCR (ver Materiales y Métodos 3.14.6.). Los genes analizados fueron *MAPK3* y *MKK4* (*MAPK* Quinasa 4), los que se han determinado componentes de la cascada de quinasas de la respuesta basal de plantas (Asai *et al.*, 2002), y el factor de transcripción *WRKY30*, el cual es inducido por estrés oxidativo y por elicitors patogénicos fúngicos (Scarpeci *et al.*, 2008; Asai *et al.*, 2002). Los resultados indicaron que la expresión de *MAPK3*, *MKK4* y *WRKY30* fue inducida por la proteína harpin en *A. thaliana* (Figura 4.10). Sin embargo, el tratamiento con Hpa1 en hojas de cítricos no mostró diferencias significativas en la expresión de los genes *MAPK3* y *WRKY30* en comparación con la infiltración control, pero *MKK4* mantuvo el nivel de inducción observado para *A. thaliana* (Figura 4.10). Como controles internos de expresión constitutiva y normalización se amplificaron 200 pb de los genes *AtTub* y *CsAct*, que codifican para la proteína Tubulina de *A. thaliana* y para la proteína Actina de *C. sinensis*, ambos ampliamente utilizado para tal fin.

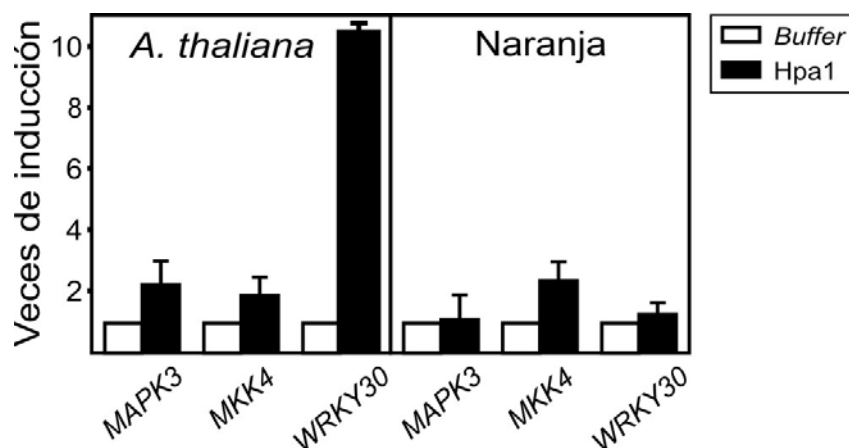


Figura 4.10. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) de los genes implicados en la señalización de la defensa. El ARN total extraído de las hojas infiltradas con *Buffer* o *Hpa1* se analizó por qRT-PCR. Las barras negras indican los niveles de expresión de los genes en las hojas tratadas con *Hpa1*, en relación con los valores obtenidos en las hojas infiltradas con *Buffer* (barras blancas). Los valores se expresan como veces de inducción, normalizando los valores a un gen *housekeeping*, y posteriormente relativizando a la condición control (infiltración con *Buffer*). Los valores representan las medias de cuatro experimentos independientes. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

4.3.2. Análisis de expresión de genes a través de ensayos bioquímicos *in planta*

Para obtener una mayor comprensión sobre la señalización desencadenada por *Hpa1*, y debido al notable aumento de la expresión de *WRKY30* en *A. thaliana*, se realizaron experimentos utilizando una línea de esta especie que lleva el gen reportero de la enzima β -glucuronidasa (*GUS*) fusionado (corriente abajo) a la región promotora del factor transcripcional *WRKY30* (Scarpeci *et al.*, 2008). Primeramente se corroboró el desarrollo de HR infiltrando *A. thaliana* PrAt*WRKY30::GUS* (Scarpeci *et al.*, 2008) con $^6\text{His-Hpa1}$ a una concentración $5 \mu\text{M}$, hecho que se observó luego de 16 horas de infiltración (Figura 4.11). Luego, para detectar el efecto de *Hpa1* en la expresión de *WRKY30*, se ensayó la actividad reportera *GUS* (ver Materiales y Métodos 3.12.4.) en hojas de esta línea de *A. thaliana* luego de 5 horas de infiltración con $^6\text{His-Hpa1}$. Los resultados indicaron que *WRKY30* fue inducido en el tratamiento con la proteína *Hpa1* de una manera similar al tratamiento con una suspensión de elicitores fúngicos, utilizados como control positivo en este ensayo (Figura 4.11).

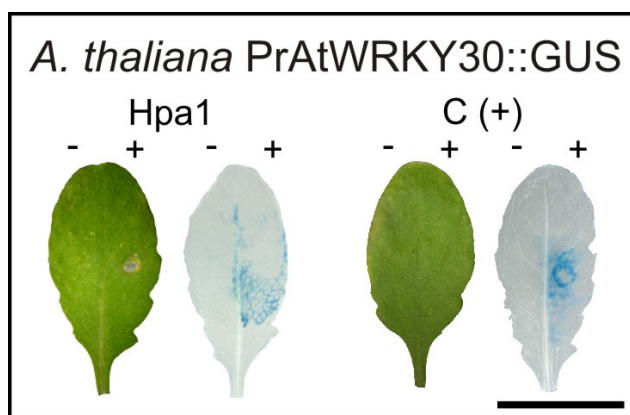


Figura 4.11. Hpa1 induce la expresión del factor de transcripción *WRKY30*, análisis por ensayo bioquímico. Se utilizó la línea *Arabidopsis thaliana* PrAtWRKY30::GUS para analizar la expresión WRKY30 luego de 5 horas de tratamiento con Hpa1, o elicitores fúngicos [C (+)] como control positivo, o *buffer* Tris 50 mM pH 8 como control negativo. La respuesta hipersensible fue monitoreada en las hojas de la izquierda, luego de 16 horas de infiltración. La barra indica 1 cm.

4.4. Hpa1 altera la morfología de las hojas de cítricos

Hpa1 de Xac es capaz de inducir HR en plantas de tabaco, pimiento y *A. thaliana*, sin embargo no se observó ninguna reacción visible en hojas de cítricos, aunque si se observaron depósitos del polisacárido calosa en estas hojas y un aumento de la expresión del gen *MKK4*. Por otro lado, se sabe que HrpZ, un homólogo de Hpa1 ampliamente estudiado perteneciente a *P. syringae* pv. *phaseolicola* es capaz de unirse a bicapas de lipídicas para formar poros conductores de iones (Lee *et al.*, 2001). Por todo esto, se decidió investigar si Hpa1 podría estar generando alguna modificación en la morfología general del tejido de hojas de plantas hospedadoras. Para ello, se infiltró ^6His -Hpa1 a una concentración $5\ \mu\text{M}$ en hojas de cítricos y, luego de 3 y 16 horas, se realizaron y analizaron cortes transversales de estas últimas con la utilización de un microscopio equipado con un micrómetro ocular, lo que permitió no sólo la observación de los cambios morfológicos y estructurales, sino también realizar medidas cuantitativas (ver Materiales y Métodos 3.6.1.). Así se determinó que Hpa1 causa alteraciones en las hojas de cítricos, incluyendo la alteración de la estructura del mesófilo esponjoso visualizada por la aparición de áreas translúcidas que carecen de células (Figura 4.12 A, paneles superiores), y la distorsión y engrosamiento del contorno de la hoja (Figura 4.12 A, paneles inferiores). Además, el espesor de ésta se incrementó luego de 16 horas de tratamiento con Hpa1 (Figura 4.12 B).

Las hojas de cítricos normalmente presentan cavidades esquizógenas (Figura 4.12 A, panel inferior izquierdo). Éstas son cavidades o tubos que se forman mediante la fusión de un grupo de células. Las células que los envuelven vierten en ellos sus secreciones, acumulándose compuestos propios de cada especie que incluyen lípidos (aceites esenciales), resinas y gomas. Se observó que el área de estas cavidades se incrementó significativamente luego de un tratamiento con Hpa1 de 3 o 16 horas, en comparación con hojas tratadas con *buffer* (Figura 4.12 C). Luego de 16 horas de tratamiento con Hpa1, se observó sólo la mitad del número de cavidades en comparación con 3 horas de tratamiento con proteína, o tratamiento con *buffer* (datos no mostrados), lo que sugiere que Hpa1 tiene un efecto perjudicial sobre la estructura de estas cavidades. Por otra parte, el tratamiento con Hpa1 además aumentó significativamente el número de idioblastos cristalinos en la cara abaxial de las hojas (Figura 4.12 D). Estos cambios en la morfología de las hojas fueron más notables en las que recibieron el tratamiento más prolongado, lo que

sugiere un efecto a largo plazo que podría ser asociado al tiempo necesario para la formación de fibras por parte de la proteína.

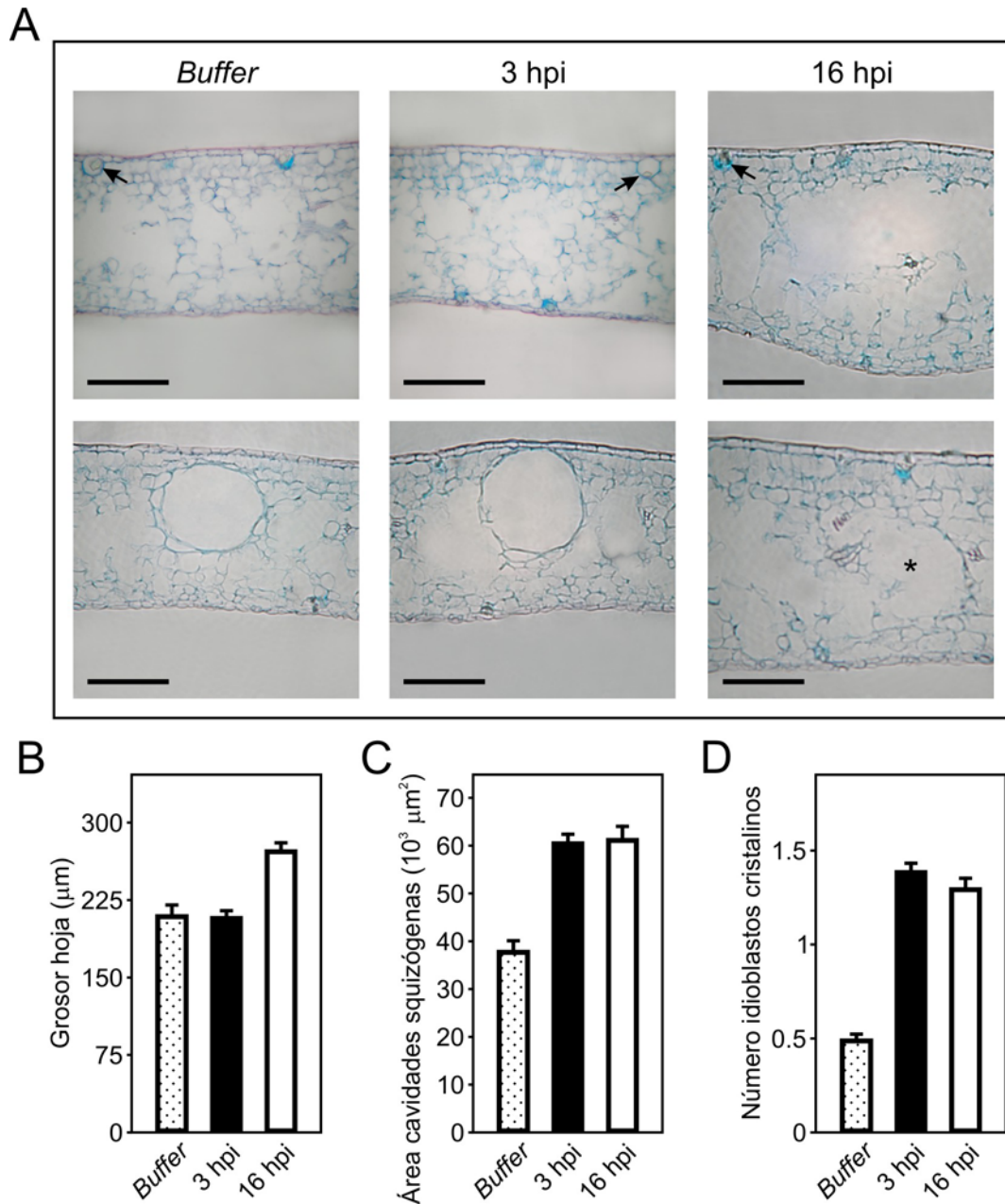


Figura 4.12. Hpa1 produce cambios en la estructura y la morfología del tejido de hojas de cítricos. **(A)** Fotografías representativas de microscopía de transmisión de secciones transversales de hojas de cítricos infiltradas con *Buffer* o la proteína Hpa1 a una concentración $5 \mu\text{M}$ por 3 o 16 horas. El panel superior muestra la distorsión y el ensanchamiento de los contornos de las hojas a través de los distintos tratamientos. El panel inferior muestra el aumento en el tamaño de las cavidades esquizógenas después del tratamiento con Hpa1 por 3 horas y el "fantasma" de una cavidad preexistente (indicado con un asterisco) luego de 16 horas de tratamiento. Las flechas indican algunos de los idioblastos cristalinos. Las barras indican $100 \mu\text{m}$. Estas secciones transversales se utilizaron para realizar mediciones cuantitativas del grosor de las hojas **(B)**, el área de las cavidades esquizógenas **(C)**, y el número de idioblastos cristalinos **(D)** para cada tratamiento. Se analizaron 30 secciones transversales para cada tratamiento a partir de tres experimentos independientes. Los valores representan la media de estas mediciones; las barras de error indican las desviaciones estándar.

4.5. Análisis de la inducción de *priming* en plantas hospedadoras por Hpa1

La resistencia inducida a menudo es asociada con una mayor capacidad para movilizar las respuestas de defensa celular inducidas por una infección, este proceso es llamado *priming*. La fuerte correlación entre la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, del inglés Systemic Acquired Resistance) y el *priming* sugiere que el último es un mecanismo crucial para la defensa en plantas. Esta hipótesis se ve apoyada, por ejemplo, por la estrecha correlación entre la capacidad que tienen diversos productos químicos para inducir SAR en tabaco contra el virus del mosaico de tabaco (Conrath *et al.*, 2002). De hecho, varias plantas que expresan proteínas harpin han mejorado las respuestas de defensa contra diferentes agentes patogénicos, lo que sugiere que estas proteínas están de alguna forma “cebando” la respuesta de defensa (Peng *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2010a). Por otra parte, una reducción en el *priming*, y la consiguiente pérdida de la inducción potenciada de la explosión oxidativa, ha sido correlacionada con una falta de resistencia a patógenos bacterianos no virulentos en tabaco (Conrath *et al.*, 2002). En consecuencia, y teniendo en cuenta que Hpa1 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xooc) fue utilizada anteriormente en ensayos a campo con buenos resultados en el aumento de la resistencia a enfermedades en arroz a través de un mecanismo de *priming* (Chen *et al.*, 2008), se decidió analizar si la infiltración de Hpa1 de Xac en hojas de cítricos podría proporcionar cierta inmunidad a posteriores inoculaciones bacterianas (ver Materiales y Métodos 3.10.1.). Así, se infiltró la proteína ⁶His-Hpa1 (a una concentración 5 μ M) y, luego de 12 horas, se infiltró el mismo sector de tejido con la cepa salvaje de Xac (suspensión a 10⁶ UFC/ml). Posteriormente se cuantificó la tasa de crecimiento bacteriano en estas hojas a través del tiempo. Como control, se infiltró previamente el tejido con una cepa mutante en el SST3, XachrpB⁻ (Dunger *et al.*, 2005), la cual disminuye el crecimiento de Xac cuando es previamente infiltrada en hojas de cítricos. Para validar el ensayo de *priming*, se realizó un tratamiento infiltrando previamente con *buffer* (Tris 50 mM pH 8) como control negativo. Como resultado, se observó que Xac creció menos cuando las hojas fueron tratadas previamente con XachrpB⁻, mientras que el tratamiento con ⁶His-Hpa1 no proporcionó ningún tipo de protección a las posteriores infecciones de Xac, al igual que el tratamiento control con *buffer* (Figura 4.13).

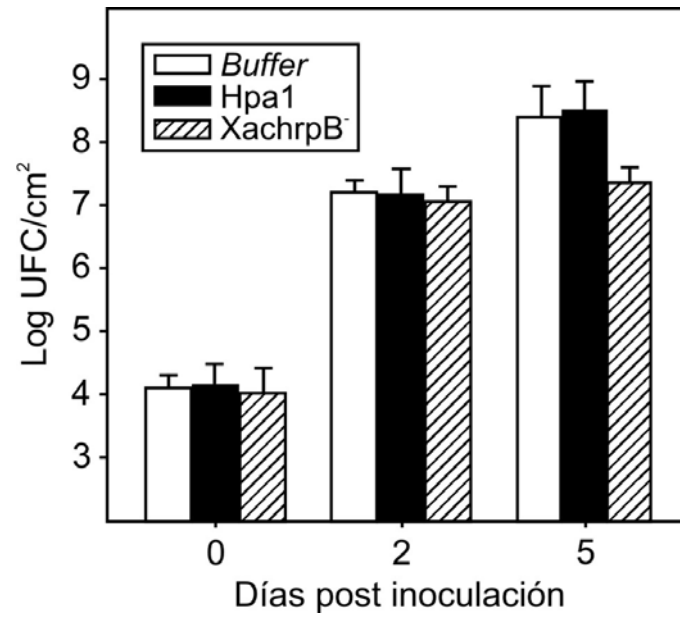


Figura 4.13. Ensayo de *priming* utilizando Hpa1. Se cuantificó el crecimiento bacteriano de Xac salvaje en hojas previamente infiltradas con *Buffer* (Tris 50 mM pH 8), $^6\text{His-Hpa1}$ (5 μM), o XachrpB^- (10^9 UFC/ml) y, luego de 12 horas, se realizó la inoculación con la cepa patógena (suspensión a 10^6 UFC/ml). Los valores representan la media de tres ensayos independientes y las barras de error indican las desviaciones estándar.

4.6. Análisis *in planta* de la expresión de *hpa1*, y su función en la virulencia de *Xac*

4.6.1. Expresión del gen *hpa1* dentro y fuera de la planta

La expresión de los distintos operones *hrp* se activan *in planta* por los reguladores transcripcionales HrpG y HrpX, cuyos genes se encuentran en otro lugar del cromosoma bacteriano (Koebnik *et al.*, 2006). Muchos de los genes activados por estos reguladores poseen un elemento regulador *cis* conservado llamado Caja PIP (del inglés, Plant-Inducible Promoter), que tiene la secuencia consenso TTCGB-N₄₋₁₅-TTCGB, donde B se refiere a cualquier base excepto adenina. Como modelo de acción, se ha propuesto que HrpX se une a la caja PIP para inducir la expresión del gen ubicado corriente abajo (Koebnik *et al.*, 2006).

Realizando un análisis *in silico* de la región promotora del gen *hpa1*, se encontró que la misma contiene una caja PIP perfecta ubicada a unos 159 bp corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, conteniendo una región interna de 15 bp (subrayada), y siendo esta secuencia TTCGCCCGTACAAGCGCAATTTCGC. Para corroborar la funcionalidad de esta caja PIP, se decidió evaluar si el gen *hpa1* es expresado durante el proceso patogénico, a través de la cuantificación del ARNm del gen. Para ello se extrajo el ARN total de células de *Xac* recuperadas a los 0, 1, 2 y 3 dpi de hojas de *C. sinensis* infectadas con el patógeno (ver Materiales y Métodos 3.14.3. y 3.14.4.). El análisis a través de qRT-PCR (ver Materiales y Métodos 3.14.6.) demostró que la expresión de *hpa1* aumentó en el primer día, alcanzando valores significativamente diferentes en cada punto analizado; y que el gen fue altamente inducido a los 3 dpi (Figura 4.14). El acompañamiento del aumento en la expresión del gen *hpa1* en relación al tiempo de infección, sugiere que Hpa1 tiene un papel en el proceso de patogenicidad.

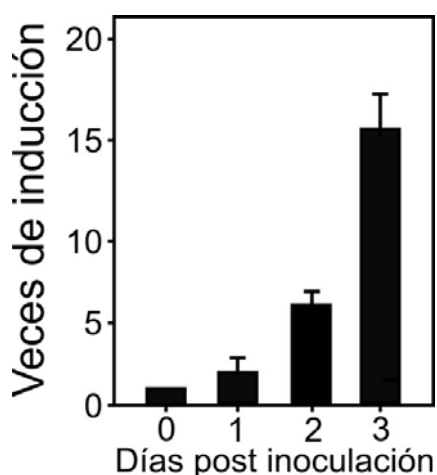


Figura 4.14. Análisis de la expresión del gen *hpa1* durante el proceso infeccioso de *Xac*. Se extrajo el ARN total de *Xac* recuperada de las hojas de cítricos en los tiempos indicados, y se analizó la expresión de *hpa1* por qRT-PCR. Las barras indican los niveles de expresión del gen en relación al día 0 después de la inoculación. Los valores representan las medias de tres experimentos independientes. Las barras de error indican las desviaciones estándar correspondientes.

La mayoría de las bacterias fitopatógenicas existen como epifitas (cualquier organismo que crece sobre otro usando al último solamente como soporte) sobre las estructuras de las plantas antes de la colonización, y la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad se relaciona directamente con el tamaño de la población epifítica del patógeno (Hirano y Upper, 1983). Leben desarrolló una hipótesis, en la cual se plantea que el patógeno puede multiplicarse sobre las superficies de una planta sana, y por lo tanto proporcionar un inóculo con ausencia de enfermedad. Cuando las condiciones adecuadas prevalecen, se desarrolla la enfermedad. De esta forma, tales patógenos tendrían un hospedador, así como una fase no patógena de crecimiento (Leben, 1963). Las bacterias que se encuentran en la superficie de las hojas, probablemente tienen adaptaciones particulares que les permiten explotar los ambientes epifíticos. Estas son distintas de las bacterias que se encuentran en otros hábitats, tales como las inmediaciones del suelo, y son superiores a las de otros hábitats ya que toleran condiciones ambientales duras sobre la superficie de las hojas. Curiosamente, este tipo de características de adaptación pueden haberse desarrollado a expensas de las que promueven la supervivencia en otros hábitats, ya que varias especies epifíticas no tienen una buena supervivencia en el suelo (Beattie y Lindow, 1994). Por otra parte, se detectó también la expresión de genes del SST3 de *Xanthomonas euvesicatoria* sobre la superficie de hojas, lo que sugiere un papel para el SST3 en la supervivencia epifítica de estas bacterias (Zhang *et al.*, 2009). En una publicación científica reciente, se reveló que la supervivencia de las cepas deficientes en el SST3 en la superficie de las hojas se reduce, apoyando la

hipótesis del papel del SST3 y sus proteínas efectoras en la promoción de la supervivencia bacteriana epifítica (Lee *et al.*, 2012). En base a esta información, se decidió analizar si *hpa1* es expresado durante el desarrollo epifítico de Xac en hojas de *C. sinensis* a través de la cuantificación del ARNm del gen. Para ello se extrajo ARN total de células de Xac recuperadas a los 0, 1, 3, 7, 10, 14 y 21 días de crecimiento epifítico (ver Materiales y Métodos 3.14.2. y 3.14.4.). El análisis a través de qRT-PCR (ver Materiales y Métodos 3.14.6.) demostró que la expresión del gen *hpa1* aumentó significativamente desde el primer día, alcanzando los valores más altos entre los 7 y los 10 días; valores que decayeron hasta los iniciales a los 21 días (Figura 4.15). Esto indica que la expresión de *hpa1* es temprana en el proceso de supervivencia epifítica y sugiere que Hpa1 podría tener un papel muy temprano en el proceso de patogenicidad de Xac, comenzando en la fase epifítica de la bacteria.

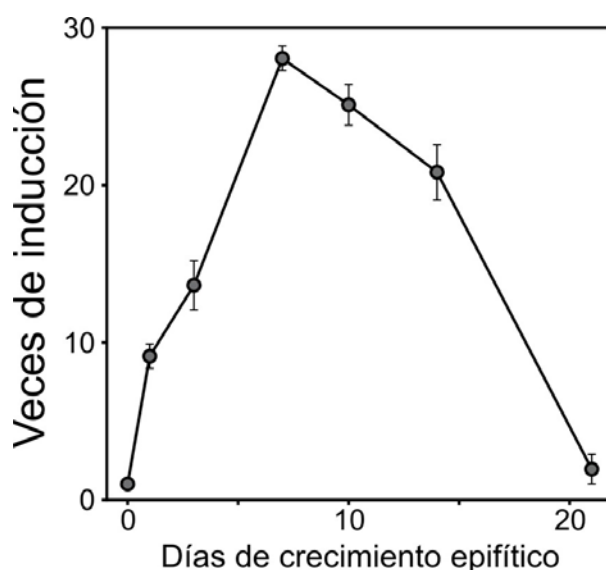


Figura 4.15. Perfil de expresión de *hpa1* en la supervivencia epifítica. Se extrajo ARN total de Xac recuperada de la superficie de hojas de cítricos en los tiempos indicados, y se analizó por qRT-PCR. Los puntos indican los niveles de expresión del gen *hpa1* en relación al día 0 de crecimiento. Los valores representan las medias de dos experimentos independientes. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

4.6.2. Análisis de función de *hpa1* a través de la mutante XacΔ*hpa1*

En función de los resultados ya mencionados, se decidió investigar si la proteína juega un papel en la virulencia de Xac. Para ello, se construyó una cepa mutante en el gen *hpa1* por intercambio de marcador, la cual se denominó XacΔ*hpa1* (ver Materiales y Métodos 3.7.1.). Por otra parte, también se complementó esta cepa mutante conjugando la misma con un vector replicativo en

Xac que lleva una copia del gen *hpa1* (pBBR1MCS-5-*hpa1*), generando la cepa complementada Xac Δ hpa1c. Con el fin de probar la capacidad de estas cepas de producir enfermedad en plantas de cítricos, las cepas Xac tipo salvaje, Xac Δ hpa1 y Xac Δ hpa1c fueron infiltradas en hojas de naranja a una concentración 10^7 UFC/ml (ver Materiales y Métodos 3.9.2.). Luego de 7 días post infiltración se observó una reducción de los síntomas de la enfermedad en el caso de la cepa mutante (Figura 4.16 A). Esta reducción de la virulencia se vio revertida en la infiltración realizada con la cepa complementada Xac Δ hpa1c (Figura 4.16 A). Posteriormente, se cuantificó el crecimiento bacteriano *in planta* en las tres cepas bacterianas por un período de 10 días (ver Materiales y Métodos 3.11.). Así se logró determinar que la cepa tipo salvaje de Xac creció más rápidamente comparada con la cepa mutante (casi un orden de magnitud mayor) en cada tiempo analizado, y que la cepa complementada mostró un crecimiento intermedio (Figura 4.16 B). Por otra parte, infiltraciones hechas con diluciones seriadas de bacterias mostraron un número significativamente mayor de canchros por área infiltrada para el caso de la cepa salvaje en relación con las infiltraciones con Xac Δ hpa1 (Figura 4.16 C). En las infiltraciones de mayor concentración bacteriana inicial, se observaron cinco veces más canchros en el caso de la cepa tipo salvaje; mientras que a 10^5 UFC/ml se observaron solamente canchros en la zona de la hoja infiltrada con la cepa tipo salvaje (Figura 4.16 D).

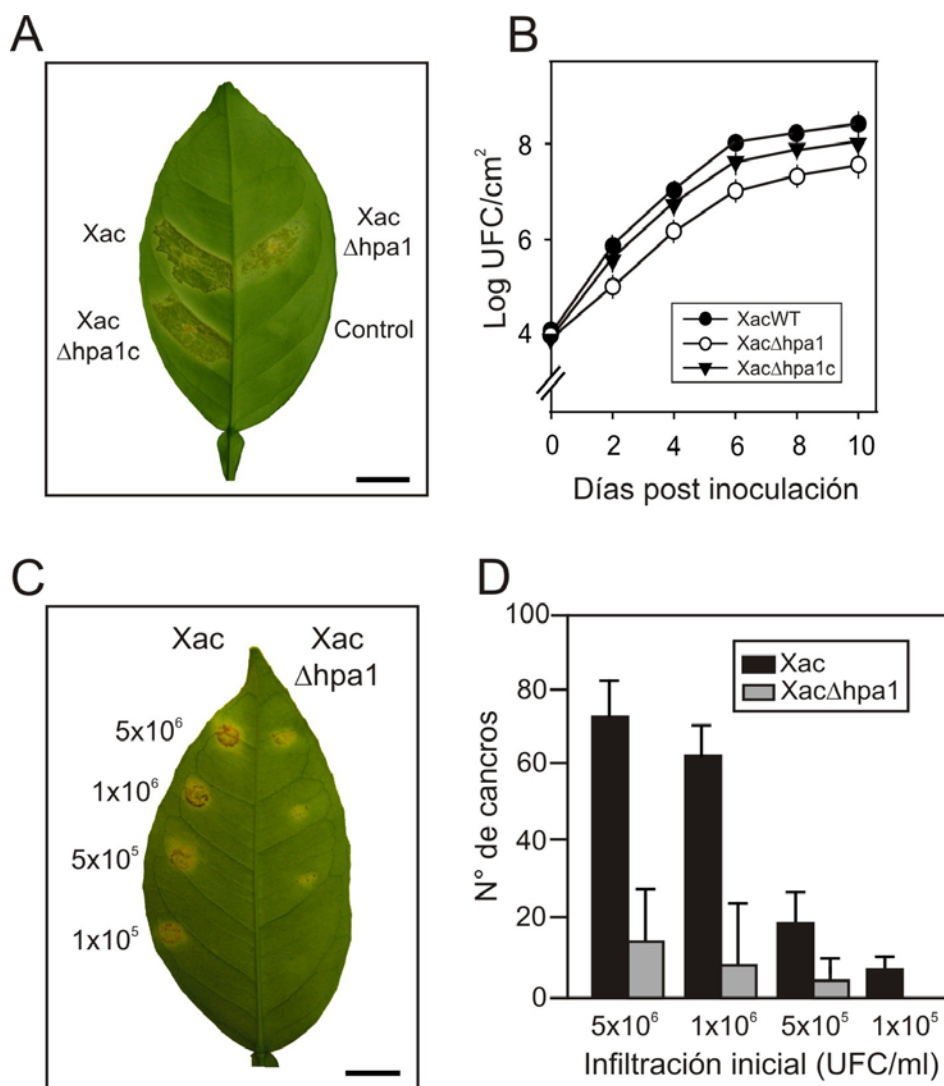


Figura 4.16. Hpa1 mejora la virulencia de Xac en hojas de cítricos. **(A)** Las cepas Xac tipo salvaje, XacΔhpa1 y XacΔhpa1c se infiltraron a una concentración 10^7 UFC/ml, en *buffer* 10 mM MgCl₂, en hojas de cítricos totalmente expandidas. Como control se infiltró *buffer* 10 mM MgCl₂ (Control). La fotografía fue tomada a los 7 días después de la inoculación. **(B)** Cuantificación del crecimiento en los primeros 10 días de infección de las cepas Xac tipo salvaje, XacΔhpa1 y XacΔhpa1c en hojas de cítricos infiltradas como se describió en **(A)**. Los valores representan las medias de tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar. **(C)** Hojas de cítricos infiltradas con diluciones seriadas de las cepas Xac tipo salvaje y XacΔhpa1 en las concentraciones indicadas (en UFC/ml). **(D)** Cuantificación del número de cancos en hojas de cítricos infiltradas como se describió en **(C)**. Las barras son la media de 10 hojas ensayadas y las barras de error la desviaciones estándar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Las barras inferiores indican 1 cm.

4.6.3. Análisis de función a través del agregado ectópico de Hpa1

La reducción en la virulencia producida por la falta de expresión de *hpa1* en la cepa XacΔhpa1 indica que la proteína Hpa1 cumple un rol importante en la virulencia del fitopatógeno. Con el fin de corroborar este rol, a continuación se decidió analizar el efecto producido por la co-infiltración de la cepa Xac tipo salvaje a diferentes concentraciones (de 1×10^3 a 5×10^5 UFC/ml) y Hpa1 recombinante (a una concentración constante 5 μ M) al mismo tiempo. Al realizar este ensayo se observó que, en esta condición las bacterias fueron significativamente más virulentas y formaron más cancos que en las infiltraciones de control realizadas sin la proteína

(Figura 4.17 A y B). Para poder validar este ensayo y determinar que el efecto es específico de Hpa1, se realizó al mismo ensayo, pero las bacterias se co-infiltraron con la proteína Tiorredoxina-⁶His (Trx-⁶His), la que produjo el mismo número de canchros que la cepa Xac tipo salvaje sin el agregado de ninguna proteína (datos no mostrados).

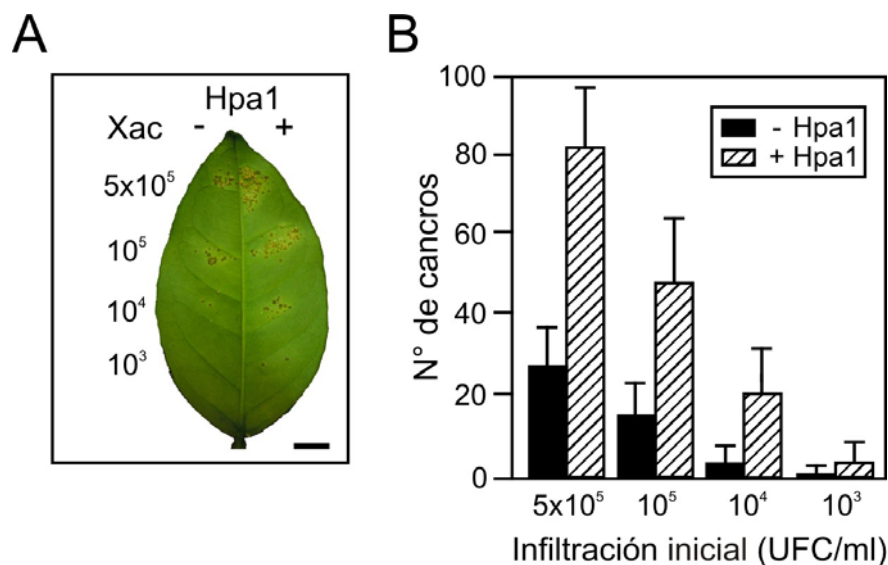


Figura 4.17. La co-infiltración de Xac y Hpa1 aumenta la virulencia bacteriana. **(A)** Xac de tipo salvaje se co-infiltró con Hpa1 a una concentración 5 μ M en las mitades derechas de hojas de cítricos a las concentraciones bacterianas indicadas (en UFC/ml). **(B)** Cuantificación del número de canchros en hojas de cítricos infiltradas como se describió en **(A)**. Las barras son la media de 6 hojas ensayadas y las barras de error representan las desviaciones estándar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. La barra inferior indica 1 cm.

4.7. Caracterización y análisis del efecto de Hpa1 sobre células bacterianas en medio de cultivo

Se sabe que la proteína harpin HpaG de Xag puede oligomerizar y formar fibras ricas en láminas β y, en última instancia, fibras de tipo amiloideas (Oh *et al.*, 2007). Por otro lado, la adherencia bacteriana que lleva a la formación de *biofilms* es un factor necesario para la patogenicidad de Xac (Gottig *et al.*, 2009). Debido a esto, se planteó la hipótesis de que la proteína Hpa1 puede tener un rol como factor de agregación, y por lo tanto funcionar como molécula reclutadora de células bacterianas, aumentando así la virulencia.

Debido a que *hpa1* es expresado en XVM2 (medio definido que mimetiza el apoplasto vegetal) y no en medio rico (Figura 4.18 A), tal como se determinó por RT-PCR (ver Materiales y Métodos 3.14.2., 3.14.4. y 3.14.5.), se utilizó este medio para asegurar la expresión de *hpa1* y analizar la capacidad de las cepas Xac tipo salvaje, Xac Δ hpa1 y Xac Δ hpa1c para agregarse en medio líquido. Las distintas cepas bacterianas se crecieron en este medio de forma estática y se observó que Xac tipo salvaje mostró agregación bacteriana con una estructura de *biofilm*, mientras que Xac Δ hpa1 fue incapaz de asociarse formando esta estructura. La cepa complementada mostró características y estructuras similares a la observada en la cepa tipo salvaje (Figura 4.18 B), lo que sugiere que Hpa1 está involucrada en la agregación de células bacterianas.

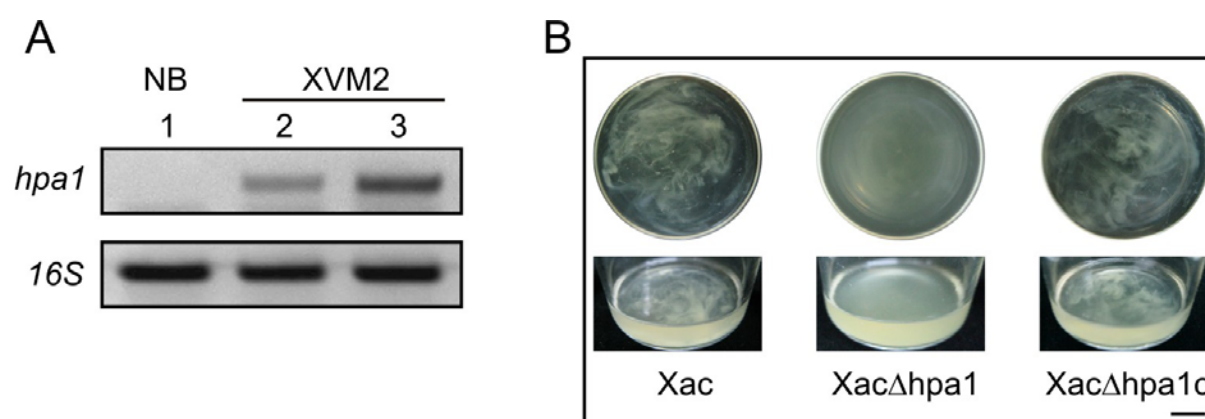


Figura 4.18. (A) El gen *hpa1* de Xac se expresa en el medio XVM2. Gel de agarosa al 1% con RT-PCR realizada para amplificar el gen *hpa1* de Xac tipo salvaje crecida en medio rico NB (calle 1) y el medio definido y mimetizador del apoplasto vegetal XVM2 en fase exponencial (calle 2), y en fase estacionaria (calle 3). Como control para la validación del ensayo de expresión, se amplificó rRNA 16S en cada uno de los casos. (B) Hpa1 está involucrada en la agregación de células bacterianas de Xac. Fotografías representativas de las cepas Xac tipo salvaje, Xac Δ hpa1 y Xac Δ hpa1c crecidas estáticamente en medio XVM2 en frascos de 100 ml por 5 días a 28 °C. El panel superior muestra vistas superiores del recipiente y el panel inferior muestra vistas laterales. La barra inferior representa 1 cm.

Por otra parte, se cultivaron en XVM2 líquido estático la cepas Xac tipo salvaje y Xac Δ hpa1 que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) (ver Materiales y Métodos 3.6.2.), para luego ser visualizadas y analizar la formación de agregados bacterianos mediante microscopía confocal láser de barrido. Notablemente, la cepa tipo salvaje mostró la formación de estos agregados bacterianos (Figura 4.19 A), mientras que la cepa mutante en *hpa1* no lo hizo (Figura 4.19 B).

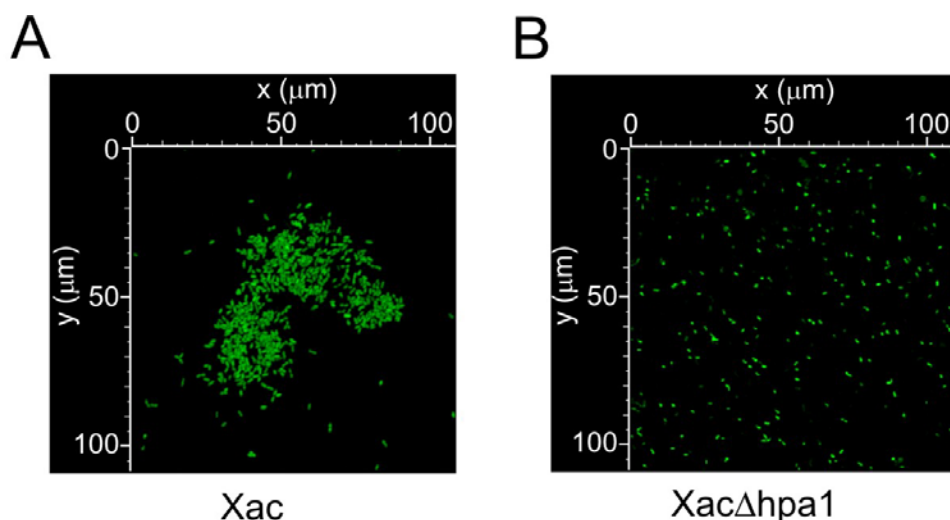


Figura 4.19. La cepa Xac tipo salvaje forma agregados bacterianos mientras que la mutante en el gen *hpa1* no. **(A)** Fotografía de un cúmulo representativo formado por la cepa Xac tipo salvaje que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) previamente crecida de forma estática en el medio XVM2. **(B)** Fotografía representante de la cepa Xac Δ hpa1 expresando GFP crecida como en **(A)**.

Con el fin de confirmar el papel de Hpa1 como una proteína de agregación bacteriana, se analizó la agregación célula-célula en presencia y ausencia de la proteína Hpa1 recombinante, también por microscopía confocal láser de barrido. Para ello, la cepa Xac tipo salvaje expresando constitutivamente GFP previamente crecida en medio XVM2 con agitación, se incubó sin (Figura 4.20 A) o con (Figura 4.20 B) la proteína 6 His-Hpa1 a una concentración 5 μ M durante 3 horas en un portaobjetos a 28 $^{\circ}$ C, y posteriormente se visualizaron las células bacterianas mediante microscopía confocal (ver Materiales y Métodos 3.6.2.). Como era de esperarse, la presencia de la proteína harpin causó una agregación bacteriana, la que se visualizó como estructuras similares a macrocolonias (Figura 4.20 B). Como control para validar el ensayo, se incubaron las bacterias con la proteína Trx- 6 His a la misma concentración y condiciones que con Hpa1, y este caso no se observó

agregación bacteriana (datos no mostrados). También se analizó el efecto de Hpa1 en la cepa *Xac* Δ hpa1 y se observó que, en presencia de la proteína, esta cepa también formó este tipo de macrocolonias (datos no mostrados).

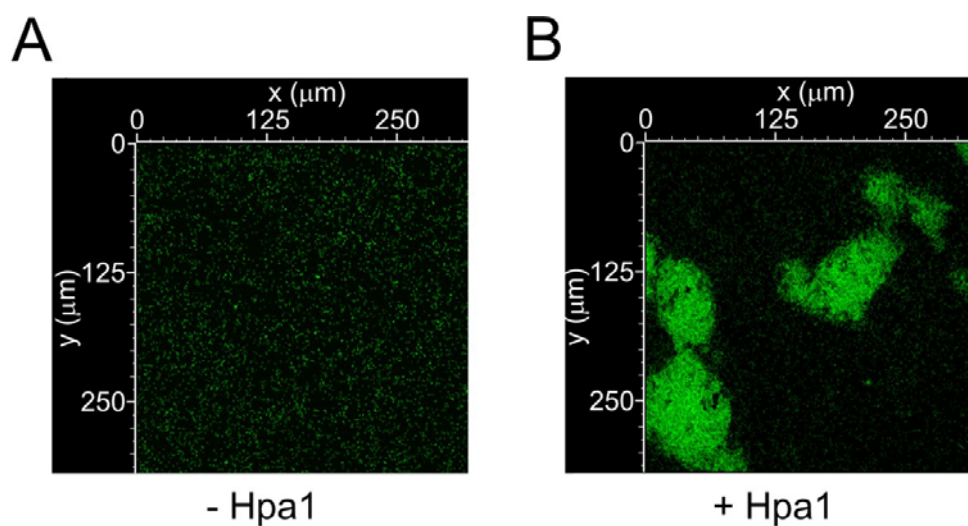


Figura 4.20. Hpa1 agrega células bacterianas de *Xac*. Fotografías representativas de microscopía confocal de barrido láser de la cepa *Xac* tipo salvaje expresando GFP e incubada por 3 horas sin (C) y con (D) la proteína ^6His -Hpa1 a una concentración de $5 \mu\text{M}$.

4.8. Caracterización del efecto de Hpa1 sobre células bacterianas dentro del tejido de hojas de cítricos

A continuación, se determinó si el efecto de asociación de células bacterianas se produce también en hojas de cítricos, o sea *in planta*. Para ello, se infiltraron las cepas Xac tipo salvaje y Xac Δ hpa1 que expresan GFP en hojas de cítricos a una concentración 10^7 UFC/ml, y se visualizó por microscopía confocal láser de barrido la aparición y desarrollo de agregados bacterianos durante el proceso de infección *in vivo* (ver Materiales y Métodos 3.6.3.). Las células bacterianas se identificaron por la emisión de fluorescencia de GFP, y el tejido de la planta por la emisión de autofluorescencia de la clorofila. Se tomaron imágenes seriadas cada 0,5 μ m, cubriendo toda la altura de la cara de la hoja infectada, hasta que la penetración del láser dejó de ser efectiva. Luego de 24 horas de infección, las bacterias tipo salvaje mostraron más agregados bacterianos que la cepa mutante (Figura 4.21 A y B). Es interesante destacar que un análisis de las imágenes tridimensionales indicó que la cepa tipo salvaje forma cúmulos bacterianos de mayor tamaño ($19,1 \pm 1,12 \mu$ m de altura), observados principalmente cerca de los estomas; mientras que la cepa mutante formó menos agregados bacterianos y más pequeños ($8,1 \pm 0,64 \mu$ m de altura). Por otra parte, la observación del eje z de estas imágenes indicó que Xac tipo salvaje desarrolló colonias bacterianas que se extienden a una mayor profundidad desde la superficie abaxial (superficie con estomas) hacia la superficie adaxial, en comparación con la cepa mutante en *hpa1*, lo que sugiere que Xac tipo salvaje pudo avanzar más y penetrar mejor en el tejido de la hoja (Figura 4.21 A y B). Estos resultados sugieren que también *in planta* Hpa1 es capaz de aglomerar células, e indica que la misma puede contribuir, al menos en parte, a aumentar la virulencia de Xac mediante la agregación de las células bacterianas en el tejido de la planta.

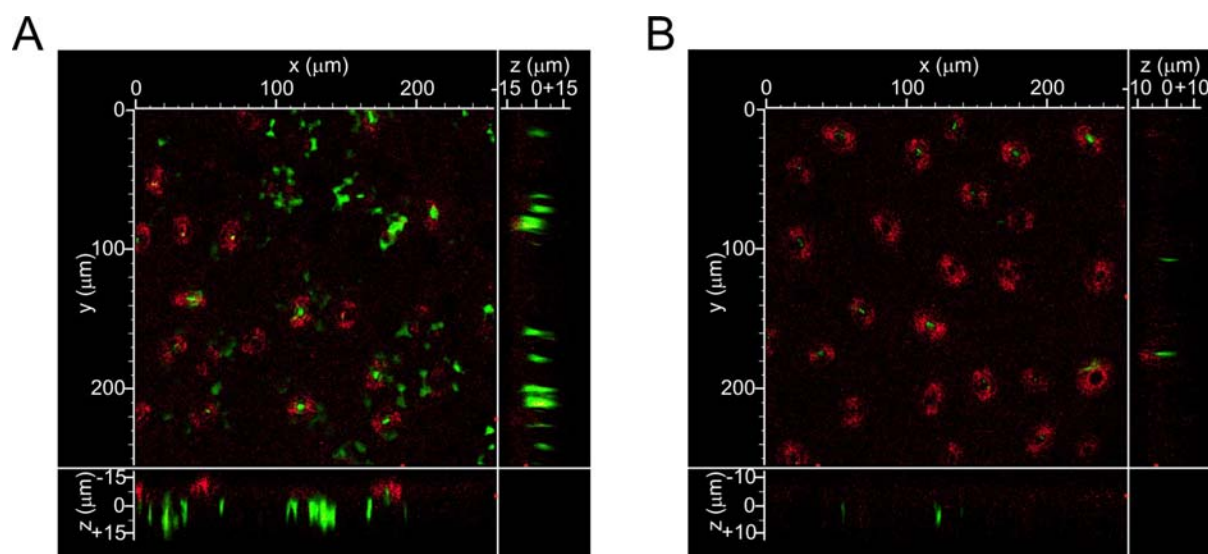


Figura 4.21. Análisis de las infecciones de Xac tipo salvaje y la mutante *hpa1*. Fotografías representativas de microscopía confocal láser de barrido de bacterias expresando GFP 24 horas después de ser infiltradas en hojas de cítricos. **(A)** Xac de tipo salvaje. **(B)** XacΔhpa1. En rojo se muestran los estomas de las hojas.

4.9. Hpa1 de Xac es secretada de forma dependiente del SST3

Como se indicó previamente, las bacterias fitopatogénicas secretan sus proteínas harpin por su SST3 (Hueck, 1998; Schechter *et al.*, 2004; Büttner y Bonas, 2002). Se propuso entonces investigar si Hpa1 también es secretada por el SST3 de Xac. Para lograr esto, se analizó a través de *Western blot* la presencia de esta proteína en el sobrenadante de cultivo de la cepa tipo salvaje de Xac. Como control, y para determinar si la secreción es dependiente del SST3, se utilizaron la cepa mutante Xac Δ hpa1, y la cepa mutante en el SST3 XachrpB⁻, respectivamente. Esta última es incapaz de formar un SST3 funcional (Dunger *et al.*, 2005), y por lo tanto secretar factores a través del mismo. Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron tal como fue descrito previamente por Büttner y colaboradores (Büttner *et al.*, 2002) (ver Materiales y Métodos 3.17.) y el ensayo de *Western blot* se realizó utilizando anticuerpos específicos contra ⁶His-Hpa1 desarrollados en este trabajo de tesis. De esta forma, Hpa1 únicamente fue detectada en los sobrenadantes de Xac tipo salvaje, indicando así que esta proteína es secretada por Xac, y que además lo hace de una manera dependiente del SST3 (Figura 4.22).

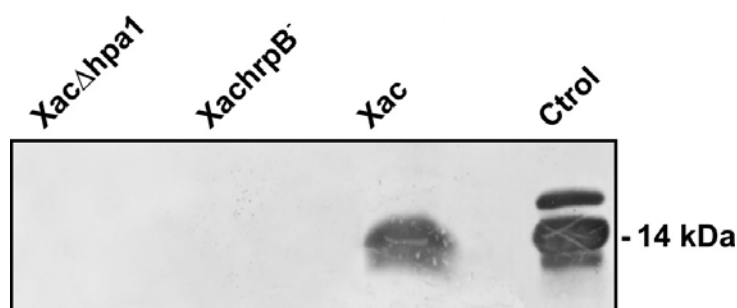


Figura 4.22. Análisis por *Western blot* para el estudio de secreción de Hpa1. El tamaño estimado de las bandas se muestra en la parte derecha de la figura. En todas las calles se sembró la misma cantidad de proteína total obtenida a partir de los sobrenadantes de cultivo de cada cepa. Como control del ensayo de inmunodetección, se sembró una alícuota de ⁶His-Hpa1 parcialmente cortada con la proteasa trombina (Ctrol). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot* utilizando un antisuero específico contra ⁶His-Hpa1.

4.10. Discusión

Las harpin son proteínas ricas en residuos de glicina y estables al calor que se secretan a través de SST3 en bacterias Gram negativas fitopatógenas. Durante las dos décadas transcurridas desde la primera harpin de origen patogénico, HrpN de *E. amylovora* en 1992 (Wei *et al.*, 1992), caracterizada como inductora o elicitora de la HR, se han determinado diversos aspectos funcionales de las harpin. Otra característica remarcable de estas proteínas es la capacidad, cuando son aplicadas directamente a las plantas, o expresadas en sus células, de provocar diversas respuestas beneficiosas tales como la inducción de las respuestas de defensa contra diversos patógenos e insectos, y el aumento de crecimiento de la planta (Fontanilla *et al.*, 2005a y b; Dong *et al.*, 2004). Muchos estudios muestran que estas proteínas están dirigidas principalmente al espacio extracelular de los tejidos de plantas, a diferencia de las proteínas efectoras bacterianas que actúan dentro de las células de la planta.

La proteína Hpa1 de Xac indujo el desarrollo de HR cuando fue infiltrada en una gran variedad de plantas no hospedadoras, como tabaco, pimiento y *A. thaliana* (en varios ecotipos); pero no generó una respuesta visible cuando fue infiltrada en hojas de plantas de algodón o en hojas de plantas hospedadoras de Xac (naranja). Esto es acorde a lo comentado anteriormente sobre el hecho de que la inducción de esta respuesta dependa de la interacción harpin-planta. Un análisis más profundo sobre el desarrollo de HR, se obtuvo de ensayos de caracterización en plantas de tabaco, donde se observó que el daño y desarrollo de HR está ligado a la muerte celular, a la producción de ROS y a la liberación de iones por parte de las células de la planta. Además, la deposición de calosa es otro marcador de la inmunidad disparada en plantas infectadas (Nguyen *et al.*, 2010), y los ensayos realizados con Hpa1 de Xac tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras indicaron que, en diferente medida, la deposición de este polisacárido aumenta al enfrentarlas con esta proteína harpin, indicando que la última podría considerarse como una posible molécula inductora de la inmunidad innata en plantas. Por otro lado, la HR también fue caracterizada por un aumento en la expresión de distintos genes de defensa basal de la planta, tal como fue evidenciado con la inducción de la cascada de MAP Quinasas que conducen a la activación de factores de transcripción de tipo WRKY, los que posteriormente conllevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Boller y Félix, 2009). La expresión de uno de estos factores (AtWRKY30) fue

evidenciado no sólo realizando el seguimiento de la expresión del gen, sino que también utilizando su región promotora corriente arriba de un gen reportero.

Aunque el desarrollo de HR en plantas no hospedadoras es una característica común a todas las proteínas harpin, tal como fue observado en el presente trabajo de tesis por Hpa1 de Xac, se ha demostrado que muchas veces esta inducción es dependiente de la interacción harpin-planta, como es el caso de HpaG de Xag, Hpa1 de Xoo, XopA de Xcv, y HrpN de *E. amylovora*, que causan diferentes reacciones en hojas de tabaco, las cuales van desde la ausencia de reacción a una marcada HR (Kim *et al.*, 2003). Esta existencia del grado especificidad que poseen las proteínas harpin para desarrollar HR, ha despertado una gran discusión en torno a la existencia, o no, de un receptor específico para estas proteínas. Hasta la fecha no existe evidencia experimental que haya demostrado la unión específica entre alguna proteína harpin y un receptor eucariótico. Respecto a esto, la tendencia más fuerte, y con mayor sustento experimental, es la que plantea la inexistencia de un receptor específico para harpin, indicando que los efectos producidos por estas proteínas se deben a la unión directa sobre la membrana celular eucariótica. Los estudios más importantes referidos a este aspecto se han realizado con HrpZ de *P. syringae* (Haapalainen *et al.*, 2011), donde también se encontró que esta proteína harpin tiene una fuerte afinidad por el ácido fosfatídico (AP), un lípido componente de las membranas celulares con un grupo de cabeza con carga negativa, de entre 15 fosfolípidos membranales típicos analizados. En el mismo trabajo, se detectó la formación de poros en vesículas lipídicas formadas con un 25% de AP, o vesículas preparadas de aislados de membrana plasmática de *A. thaliana* (Haapalainen *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, pareciera probable que el AP (u otro lípido endógeno con propiedades similares) es el sitio de unión primario de HrpZ en las membranas vegetales, tal vez creando una topografía de membrana determinada; como resultado de la forma de la molécula de AP, una región de membrana rica en AP tiene una curvatura negativa (Kooijman *et al.*, 2007). Además de ser un componente estructural de las membranas celulares, el AP también es un intermediario esencial en la biosíntesis de lípidos y una molécula de señalización importante en el estrés celular (Testerink y Munnik, 2005), y una creciente evidencia sugiere que el AP tiene un papel importante como segundo mensajero en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos (Arisz *et al.*, 2009), generando una mayor discusión sobre si la actividad de HrpZ dependiente de la unión a AP también podría tener un

rol interfiriendo con la función de señalización de defensa del AP. A pesar de esto, también se han encontrado indicios de la posible existencia de proteínas o péptidos *target* pertenecientes a plantas, que podrían unirse a las proteínas harpin funcionando como receptores de estas últimas, aunque en las referencias bibliográficas sobre éstas se han utilizado únicamente técnicas *in vitro* para la detección de las interacciones. En el año 2009, Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2009) realizaron la producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína harpin Hpa1 de Xoo, indicando y resaltando en su trabajo que los anticuerpos anti-idiotípicos monoclonales pueden ser utilizados como imágenes internas para encontrar los posibles receptores de proteínas harpin. Por otro lado, Li y colaboradores (Li *et al.*, 2005) a través de la técnica de presentación por fago (Phage-display System) intentaron identificar, a partir de una biblioteca de fagos con péptidos aleatorios, las posibles proteínas que interactúan con HrpZ de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Así, lograron identificar que esta proteína harpin muestra afinidad hacia los péptidos con un motivo de aminoácidos consenso W(L)ARWLL(G/L), a través de una secuencia localizada en su región central, diferente de la región inductora de HR previamente determinada para esta proteína. Gracias a la obtención de anticuerpos en contra de estos péptidos, lograron encontrar que los mismos reconocen proteínas de extractos vegetales de diversas plantas no hospedadoras. Por último, otro ejemplo fue el presentado por Oh y Beer (Oh y Beer, 2007) utilizando la proteína harpin HrpN de *E. amylovora* en un ensayo de dos híbridos en levaduras contra una biblioteca de genes de manzana (*Malus domestica*), lo que dio como resultado un sólo clon positivo designado *HIPM* (del inglés, HrpN-Interacting Protein from Malus). Un posterior análisis por delección mostró que la región amino terminal desde el residuo 198 al 403 de HrpN se requieren para la interacción con HIPM (Oh y Beer, 2007).

Una de las funciones más caracterizadas de las proteínas harpin de fitopatógenos es su capacidad para unirse a las membranas celulares y formar poros conductores de iones (Engelhardt *et al.*, 2009; Haapalainen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2001). Existen evidencias que indican además que las harpin deberían ser reconocidas por fuera de las células de la planta para desarrollar HR (Tampakaki y Panopoulos, 2000). Esto fue comprobado, al menos en plantas hospedadoras, al infiltrar Hpa1 de Xac en hojas de naranja, ya que se observó un daño a nivel de la

estructura del mesófilo esponjoso aunque, como se enunció anteriormente, sin desarrollo de HR. Otro punto de discusión es por qué las proteínas harpin pueden formar poros en membranas de células eucarióticas, pero no sobre las propias células bacterianas. En relación a esto, y tomando en cuenta los modelos de interacción harpin-membrana planteados anteriormente, este hecho puede deberse a diversos aspectos; por ejemplo, la diferencia de composición lipídica entre las células eucarióticas y procarióticas, la falta de proteínas receptoras en las células bacterianas, o aún posiblemente la existencia de alguna proteína bacteriana que funcione a modo de “vacuna” o “antídoto” evitando que las proteínas harpin permeabilicen su membrana.

A diferencia de otras proteínas harpin (Fontanilla *et al.*, 2005a y b), Hpa1 de Xac no demostró proporcionar un *priming* de las respuestas de defensa celular, al menos en plantas hospedadoras; aunque este hecho no descarta que si lo haga al ser inoculada en especies de plantas no hospedadoras, tal como fue observado con HrpN de *E. amylovora*.

La expresión del gen *hpa1* de Xac se vio inducida al ser analizada en bacterias recuperadas de tejidos infectados, o crecidas en un medio mimetizador del apoplasto vegetal, siendo concordante con lo observado para otros genes codificantes para proteínas harpin en otros fitopatógenos (Bogdanove *et al.*, 1996b; Fouts *et al.*, 2002; Wei y Beer, 1995). Además, se logró observar la expresión de *hpa1* en bacterias depositadas en la superficie de las hojas (crecimiento epifítico). Todo esto indicaría que esta proteína harpin desempeñaría un papel en la interacción con las plantas desde una etapa temprana.

La función que desarrollan las proteínas harpin en la virulencia es, en general, variable ya que se ha descrito que algunas proteínas harpin tienen funciones de virulencia en plantas hospedadoras, aunque otras no lo tienen (Barney, 1995; Sinn *et al.*, 2008; Gaudriault *et al.*, 1998; Kim y Beer, 1998; Li *et al.*, 2010), indicando que algunas proteínas harpin pueden ser considerados como factores de virulencia de patógenos bacterianos. Los análisis realizados con la cepa mutante *hpa1* de Xac en el presente trabajo, indica que la misma podría ser considerada un factor de este tipo, ya que esta mutante desarrolló una menor cantidad de canchales en hojas de naranja, y además mostró un crecimiento más lento comparada con la cepa tipo salvaje. La importancia de esta proteína harpin de Xac en la virulencia, fue

evidenciada nuevamente al agregarla ectópicamente a bacterias infiltradas en hojas de naranja, mostrando un desarrollo mayor de cancros.

La unión de las bacterias fitopatógenas a la superficie de la planta es el primer paso para el desarrollo de la enfermedad, y la mutante en una proteína harpin demostró estar implicada en este proceso, mostrando además, estar implicado en la formación de *biofilm* bacteriano en medio líquido (Yap *et al.*, 2006). La cepa mutante *hpa1* de *Xac* mostró características similares cuando se analizaron dichos factores, lo que fue evidenciado por la falta del desarrollo de una estructura tipo *biofilm* y la falta de agregación de bacterias en medio líquido, siendo ambos efectos revertidos en una cepa complementada en este gen. Por otra parte, y demostrando aún más la importancia de esta proteína en la virulencia de *Xac*, la cepa mutante mostró menos agregados bacterianos cuando fue infiltrada en hojas de naranja, los cuales además fueron de menor tamaño comparados con los desarrollados por la cepa tipo salvaje.

A modo de resumen, Hpa1 de *Xac* parece tener dos funciones en las interacciones planta-patógeno: primero, la inducción de la respuesta de defensa basal, como se observa en las plantas no hospedadoras, y en concordancia con resultados previos obtenidos en plantas de algodón transgénicas que expresan Hpa1 de *Xoo*, donde la inducción de la respuesta basal de defensa es suficientemente alta para mejorar la resistencia contra *Verticillium dahliae* (Miao *et al.*, 2010a); segundo, en el aumento de la virulencia del patógeno, probablemente causando cambios en la estructura del mesófilo de las hojas de cítricos y promoviendo la agregación de las células bacterianas, lo que conlleva a una mayor colonización de los tejidos. Este doble papel se ha observado para las proteínas amiloides de *E. coli* conocidas como *curli*. Estas estructuras de fibra de superficie altamente agregativas median las interacciones entre bacterias individuales, promoviendo la formación de *biofilms*, y entre las bacterias y los tejidos del hospedador, estimulando la respuesta inflamatoria de éste, y contribuyendo a la persistencia bacteriana en el mismo (Epstein y Chapman, 2008). El hecho de que la presencia de Hpa1 incrementa la virulencia de *Xac* sugiere que, una vez que la bacteria ha alcanzado un nivel umbral de proteínas efectoras, esta puede contrarrestar la respuesta inmune basal (Chisholm *et al.*, 2006), y por lo tanto inhibir la respuesta apenas detectable inducida por Hpa1. Esta actividad de agregación es concebible en un modelo en el que *Xac* requiera a la proteína harpin para reclutar un

mayor número de células patógenas para interactuar con la membrana celular vegetal y predisponer el tejido a la posterior acción infectiva.

Si bien está claro que el desarrollo de HR está asociado al proceso intrínseco que tienen las proteínas harpin para formar fibras del tipo amiloides (Oh *et al.*, 2007), no existe evidencia que demuestre que la función de este tipo de estructuras en la agregación bacteriana planteada en este trabajo de tesis y en los resultados obtenidos con HrpN de *Dickeya dadantii* (antiguamente *Erwinia chrysanthemi*) (Yap *et al.*, 2006) esté correlacionada con este proceso amiloidogénico. Es por ello que como siguiente paso se decidió estudiar a nivel molecular a Hpa1 de Xac para determinar primeramente si la misma forma fibras amiloides y, de ser así, estudiar la importancia del proceso amiloidogénico en la agregación de bacterias y dentro del proceso infectivo de Xac.

Capítulo 2

Caracterización molecular de la proteína Hpa1

5. Caracterización molecular de la proteína Hpa1

5.1. Análisis de Hpa1 por filtración en gel

Con la proteína recombinante obtenida tal como se describió en el Capítulo 1, se decidió realizar sobre ella diversos estudios utilizando métodos biofísicos, con el objetivo de caracterizar molecularmente a Hpa1 e intentar explicar de esta manera los efectos observados previamente. Así, y basándose en que algunas proteínas harpin se encuentran expresadas como monómeros, dímeros (Haapalainen *et al.*, 2011), y tetrámeros (Oh *et al.*, 2007), se decidió comenzar con la determinación del peso molecular de la proteína purificada a través de filtración en gel. Esta técnica, ampliamente utilizada para tal fin utiliza, por ejemplo, una columna rellena con una matriz reticulada de agarosa y dextrano para separar las moléculas de acuerdo a su peso molecular. A través de una calibración previa de la columna utilizando macromoléculas patrones de peso molecular conocido, se logra determinar el peso molecular de una o una mezcla de proteínas en solución. Conociendo el peso molecular teórico esta técnica permite además, determinar si la proteína en estudio se presenta en solución como monómero o como n -mero, permitiendo determinar también de cuantas unidades (n) está formado este último. Se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex 200 y un equipo de FPLC (ver Materiales y Métodos 3.5.3.). De esta forma se logró determinar que Hpa1 de Xac se expresa y purifica mayoritariamente en forma tetramérica, con un peso molecular estimado de 64,2 kDa (Figura 5.1). También se observó la presencia de un pico de mayor peso molecular indicativo de la existencia de otra especie proteica, aunque el mismo fue de un tamaño considerablemente menor, indicando que la misma es minoritaria.

Cabe destacar que, a menos que sea aclarado en el texto, todos los ensayos realizados posteriormente se efectuaron con la fracción tetramérica de Hpa1 obtenida por cromatografía de exclusión molecular, para evitar así efectos no deseados en el análisis.

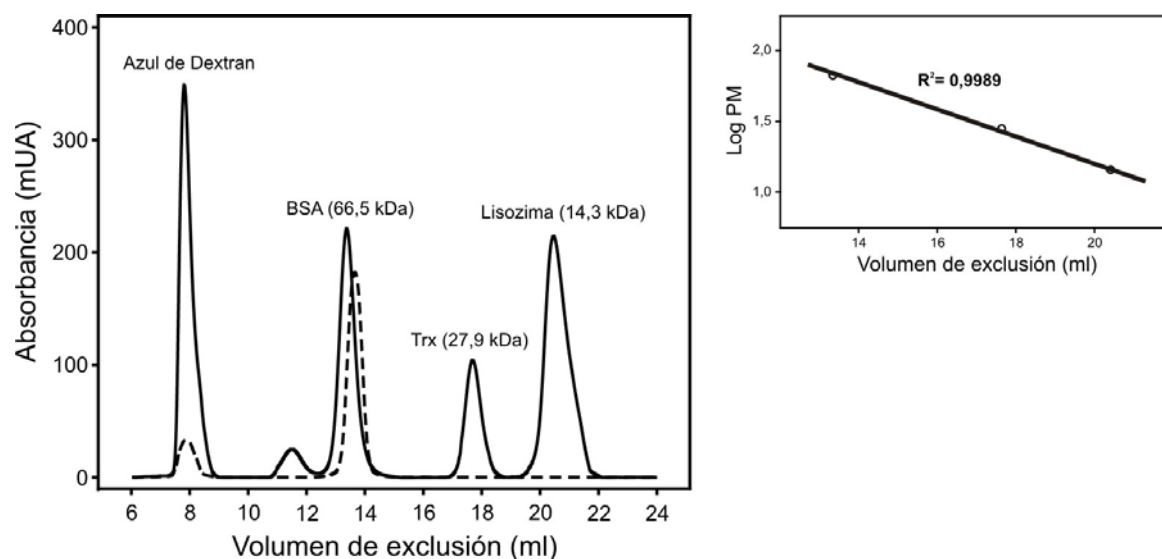


Figura 5.1. (Izquierda) Perfil de salida de la columna de exclusión molecular Superdex 200. Se sembró una alícuota de Hpa1 recombinante (línea de trazo cortado) purificada recientemente y, para realizar una curva de calibración, se sembraron diversas proteínas de peso molecular conocidos (línea de trazo continuo). **(Derecha)** Gráfico de Log PM vs. Volumen de exclusión con los valores correspondientes a las proteínas patrones utilizadas en la calibración de la columna. Se muestra también la curva de regresión, junto con el valor de R^2 obtenido. Los patrones utilizados fueron Albúmina Sérica Bovina (BSA) de 66,5 kDa; Tiorredoxina recombinante (Trx-⁶His) de 27,9 kDa; y Lisozima de 14,3 kDa). Se utilizó Azul de Dextran para determinar el volumen muerto de la columna.

5.2. Determinación de la estructura secundaria de Hpa1 y estabilidad frente a pH a través de dicroísmo circular

La formación de una estructura cuaternaria tetramérica definida como la observada en Hpa1 denota un grado de plegamiento en la proteína. Con el objetivo de determinar la estructura secundaria que presenta Hpa1 de Xac en solución cuando es expresada y purificada, se comenzó con un estudio *in silico* de la secuencia primaria de la misma, para predecir así dominios con algún plegamiento determinado. Para ello, se utilizaron programas computacionales que permiten predecir las estructuras secundarias en base a la secuencia primaria de la proteína. Entre los programas computacionales utilizados se encuentran Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/) y PSIPred (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/). Las predicciones realizadas por ambos programas arrojaron que Hpa1 contiene dos hélices α , una ubicada entre los residuos Glu36 y Gln52, y otra entre los residuos Gln88 y Ala103. Además, las predicciones realizadas indicaron la existencia de una pequeña región cerca del amino terminal de la proteína de tres residuos (Phe15 a Gln17) con una conformación de lámina β . Por otro lado, ambos programas indicaron también que más del 60% de la secuencia analizada es predicha como desordenada, alertando que ello disminuye el grado de confianza general con el que es realizada la predicción (Figura 5.2).

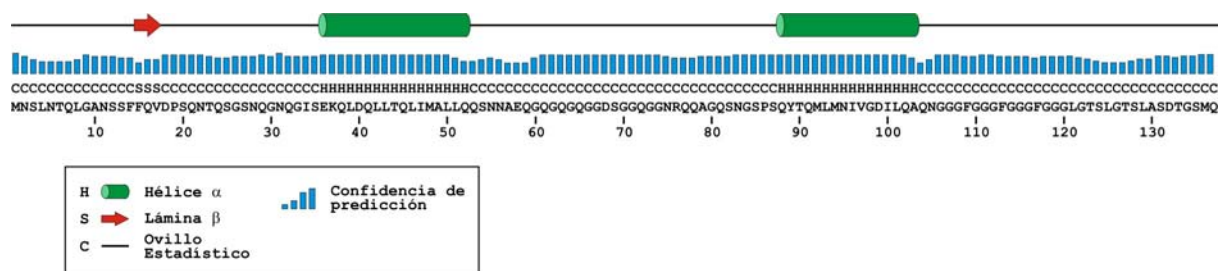


Figura 5.2. Boceto de la estructura secundaria de la proteína harpin Hpa1 de Xac. Se muestra la secuencia de la proteína en su totalidad. Las predicciones se realizaron utilizando los servidores de predicción de estructura secundaria de proteínas Phyre2 y PSIPred como se detalla en el texto. Se muestran las regiones de la proteína que tienen estructuras de hélices α o láminas β , y en barras verticales azules el grado de confianza en la predicción, tal como es representado por PSIPred.

Una vez obtenida esta información a partir de la predicción del plegamiento de Hpa1, se procedió a estudiar su estructura secundaria a través de dicroísmo circular. Primeramente, y para corroborar el grado de pureza con el que se encontraba la proteína, se realizó un análisis por espectrometría de masas sobre

una muestra la misma (ver Materiales y Métodos 3.5.4.). De esta forma, el espectro obtenido mostró dos picos mayoritarios definidos, uno a 15776 Da y otro a 7895 Da (Figura 5.3). Por otra parte, el valor del peso molecular teórico para la proteína recombinante $^6\text{His-Hpa1}$ calculado por la herramienta bioinformática ProtParam Tool de ExPASy (web.expasy.org/protparam/) es de 15783 Da; por lo tanto el pico observado en el espectro a 15,776 kDa (Figura 5.3) corresponde a $^6\text{His-Hpa1}$ ionizada por un protón (PM/+1), mientras que el pico a 7,895 kDa corresponde a la fracción ionizada por dos protones (PM/+2). La observación de sólo dos picos definidos e importantes en el espectro, los cuales pudieron asociarse a dos formas ionizadas de la misma proteína recombinante, permitió determinar que el grado de pureza de la muestra era lo suficientemente alto como para no generar artefactos en los subsiguientes ensayos a realizar.

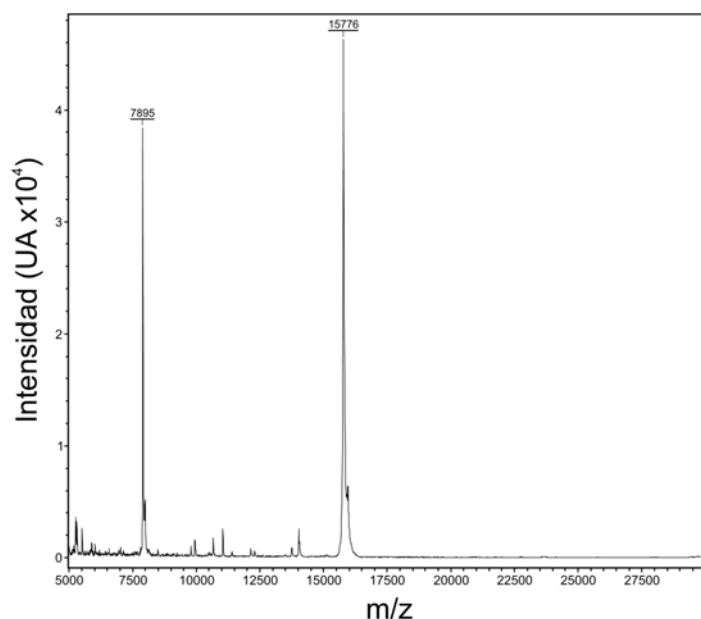


Figura 5.3. Espectro de masas obtenido para la proteína recombinante $^6\text{His-Hpa1}$ purificada. Se pueden observar los dos picos correspondientes a la ionización de la proteína por uno y dos protones, con sus valores de masa/carga (m/z) correspondientes.

Se procedió entonces, al estudio del plegamiento de Hpa1 evaluado a través de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) en el intervalo de longitudes de onda desde 190 a 260 nm (UV lejano), donde las uniones peptídicas absorben la luz circularmente polarizada generando los espectros característicos para cada tipo de estructura secundaria (Hélice α , Lámina β , Ovillo estadístico). El ensayo de CD (ver Materiales y Métodos 3.5.5.) se realizó para la proteína $^6\text{His-Hpa1}$ a una

concentración 5 μM en *buffer* HEPES 1 mM pH 8, NaCl 2 mM. El espectro obtenido (Figura 5.4, línea celeste) presentó dos mínimos, uno a 210 nm y el otro a 225 nm, lo que determina la presencia de hélices α . El pico observado a 210 nm es más intenso que el de 225 nm, lo que indica además la presencia de dominios con lámina β (Fasman, 1996). Entre los picos encontrados se observa un pequeño máximo, el cual es indicativo de estructuras con $\alpha+\beta$. Las estructuras $\alpha+\beta$ son una mezcla de estructuras todo α y todo β separadas, generalmente en diferentes dominios (Fasman, 1996). Estos resultados corroboran las predicciones obtenidas previamente *in silico* sobre el estado de plegamiento de esta proteína harpin.

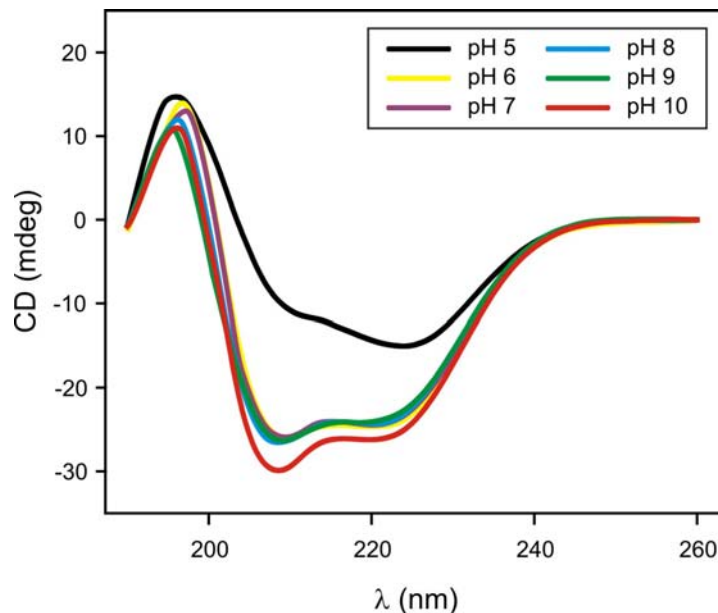


Figura 5.4. Espectro de CD de Hpa1 y estabilidad frente al pH. Se muestran los distintos espectros de CD obtenidos en el UV lejano (entre 190 nm y 260 nm) para $^6\text{His-Hpa1}$ previamente dializada en soluciones de pH variable. Los espectros graficados son representativos de 4 corridas espectroscópicas y están corregidos con respecto al *buffer* utilizado y a la temperatura de trabajo.

En general, en los órganos aéreos de las plantas los valores de pH apoplástico más bajos reportados son cercanos a pH 4, y los más altos justo por encima de pH 7, aunque la gran mayoría se encuentra entre pH 5 y pH 6,5. En conjunto, los valores de pH reportados son mayores para las plantas dicotiledóneas en comparación con las monocotiledóneas, y mayores para las angiospermas que para las gimnospermas (Grignon y Sentenac, 1991). Por esto, y con el objetivo de analizar la estabilidad de Hpa1 frente al pH del medio, se realizaron los espectros de dicroísmo circular modificando el pH del *buffer*, entre 5 y 10, en el que se encontraba

la proteína a una temperatura de 30 °C. Así, se logró determinar que Hpa1 mantiene su estructura secundaria entre los valores de pH 6 y 9 (Figura 5.4, líneas amarilla, violeta, celeste, y verde). Cuando Hpa1 se analizó a valores de pH menores (pH 5), se encontró que la proteína comenzó a precipitar en el proceso de diálisis; de todas formas, agitando previamente la cubeta con esta muestra se prosiguió con la obtención del espectro de CD, teniendo éste casi los mismos picos obtenidos en las otras condiciones de pH. Sin embargo, estos picos presentaron intensidades menores y con una inversión en las magnitudes de los mismos, siendo de mayor intensidad el ubicado a los 227 nm respecto al ubicado a los 212 nm (Figura 5.4, línea negra). Este espectro es indicativo de la presencia de estructuras α/β (Fasman, 1996). Las estructuras α/β están formadas de una combinación de estructuras alternadas α y β a lo largo de la cadena polipeptídica (Fasman, 1996). Por último, al analizar el espectro producido a pH 10, se encontró el mismo patrón que el producido a pH 8, con sólo diferencias en la intensidad de los picos a 210 nm y 225 nm, lo que es indicativo de una mayor abundancia de cada una de las estructuras $\alpha+\beta$ discutidas anteriormente (Figura 5.4, línea roja). Todos los espectros mostrados están corregidos con respecto al *buffer* utilizado en cada caso a la temperatura del ensayo.

5.3. Hpa1 es capaz de formar fibras de tipo amiloides *in vitro*

Oh y colaboradores, usando una variedad de técnicas como cromatografía de exclusión molecular, espectroscopía de dicroísmo circular, tinción con rojo congo, y resistencia a proteasas, demostraron que HpaG de Xag oligomerizaría primero como tetrámero, luego espontáneamente formaría fibrillas ricas en láminas β , y finalmente fibras de tipo amiloides, y que la HR desarrollada por esta proteína en plantas no hospedadoras es dependiente de esta estructura amiloide (Oh *et al.*, 2007). Debido a que Hpa1 es muy similar a HpaG de Xag (Figura 4.1), se decidió analizar la capacidad de Hpa1 para formar este tipo de estructuras. Para este fin, se realizó el ensayo de unión a rojo congo (CR).

El CR es un colorante ampliamente utilizado en la detección de fibras amiloides ya que, entre otras características, su espectro de absorción se ve modificado al unirse a este tipo de fibras, mostrando un corrimiento hacia el rojo en este caso (Klunk *et al.*, 1999). Las interacciones entre el CR y las fibras amiloides han sido previamente caracterizadas y se ha demostrado que dependen de la conformación secundaria de las estructuras amiloides, específicamente de las estructuras ricas en láminas β . De hecho, las conformaciones de láminas β típicas de fibras amiloides parecen ser el factor crucial en la unión del CR, ya que otras proteínas que carecen o contienen una proporción menor de láminas β no se unen al CR (Klunk *et al.*, 1999). Se han propuesto varios modelos mutuamente excluyentes para explicar la unión del CR a las láminas β de las proteínas amiloides. Uno de ellos declara que el CR se encontraría en una posición perpendicular a la cadena principal del péptido de la proteína amiloide, interactuando con las cadenas aminoácidas laterales cargadas positivamente. Otro, que el CR se encontraría paralelo a la cadena principal del péptido y se intercalaría entre dos láminas β . Un tercer modelo predice que el CR se uniría directamente a las cadenas laterales de una sola lámina β . El componente clave común a todos los modelos es la idea de que existe una interacción estequiométrica y saturable entre el CR y la fibra amiloide. Esta interacción conduce a un cambio en las características espectrales del colorante por razones que aún no se comprenden completamente. Sin embargo, el desplazamiento espectral inducido por esta interacción estequiométrica y saturable permite la cuantificación precisa y absoluta de la concentración del complejo CR-fibra amiloide (Klunk *et al.*, 1989; Carter y Chou, 1998; Cavillon *et al.*,

1997).

Se procedió entonces a la realización del ensayo por espectroscopía de luz visible del CR sólo, y unido a posibles fibras amilodes de Hpa1 (ver Materiales y Métodos 3.5.6.), obtenidas agitando una solución de esta proteína por 30 horas utilizando una microbarra y un agitador magnético. Al igual que ocurre con otros harpin (Oh *et al.*, 2007), las fibras formadas por Hpa1 de Xac se unieron al colorante presentando un desplazamiento hacia el rojo en su espectro, el cual mostró una diferencia máxima de la absorbancia respecto a la curva de CR sólo aproximadamente a los 540 nm (Figura 5.5 A). Por otro lado, se utilizó la proteína Trx-⁶His como control, la que contrariamente a Hpa1, no se unió al colorante CR (Figura 5.5 B). Este resultado sugiere que Hpa1 podría formar fibras del tipo amilodes.

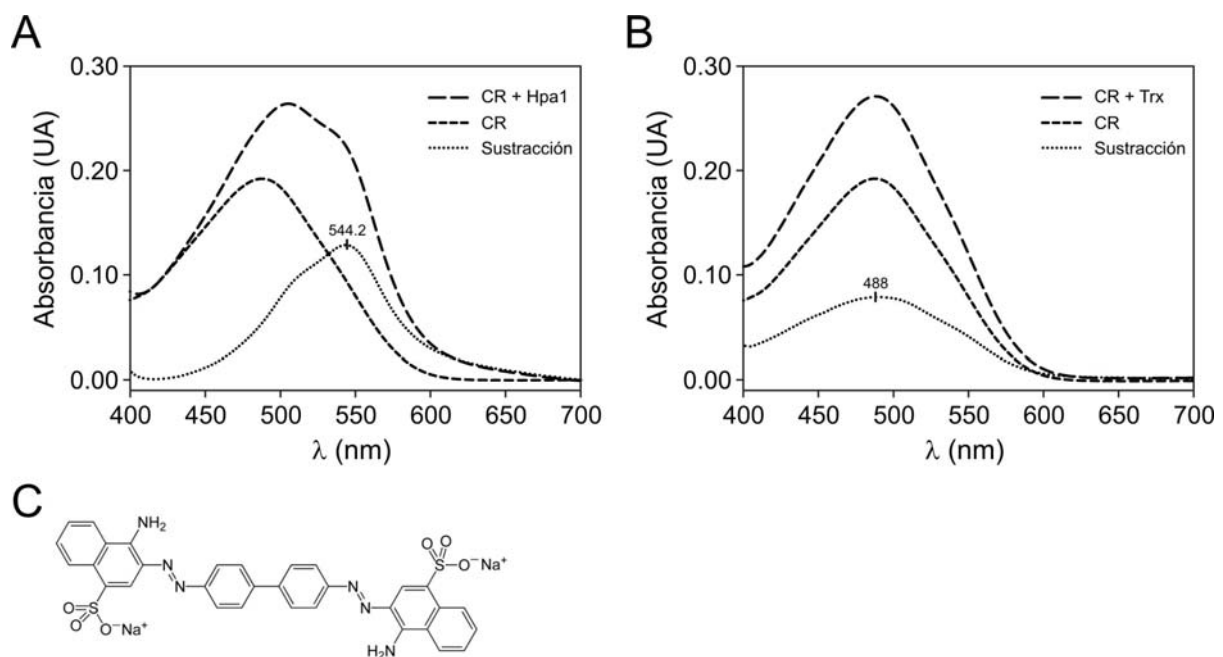


Figura 5.5. Hpa1 forma fibras amilodes, reveladas por la unión a rojo congo (CR) y espectroscopía visible. Espectros de absorbancia de una solución de CR en ausencia (línea de trazos cortos) y presencia (línea de trazos largos) de posibles fibras de ⁶His-Hpa1 (A) y de Trx-⁶His (B), corregidos respecto a los espectros de cada proteína sola, respectivamente. Las líneas de puntos indican, para cada proteína analizada, la diferencia entre el espectro de CR con proteína y CR sólo. Cada espectro mostrado es el resultado de la acumulación de tres corridas espectroscópicas. (C) Estructura de una molécula de rojo congo.

Otra forma de corroborar la formación de fibras amilodes, es realizando un ensayo de tinción con CR analizando, a través de microscopía de luz polarizada, el fenómeno de birrefringencia. En la década de 1920 Benhold y Divry establecieron que el CR se unía a estructuras amilodes en secciones de tejidos animales, y

demonstraron que en estas condiciones el mismo presenta una birrefringencia verde-manzana característica bajo polarizadores cruzados. Desde entonces, esta birrefringencia característica se ha utilizado como método de diagnóstico para las enfermedades neurodegenerativas que se desarrollan a través de la formación de fibras amiloides (Khurana *et al.*, 2001). En este ensayo, y debido a la naturaleza estructurada de estas fibras, las moléculas del colorante se orientan en una posición determinada. Cuando se incide luz polarizada sobre fibras amiloides teñidas con CR, se puede observar un color verde-manzana colocando un segundo polarizador (en el ocular) orientado a 90° del primero (ver Materiales y Métodos 3.5.7.). Así, se realizó este ensayo con una muestra de fibras de ⁶His-Hpa1 y, como control, también se realizó el ensayo con la proteína Trx-⁶His. De esta forma, sólo Hpa1 produjo el efecto de birrefringencia verde-manzana esperado (Figura 5.6). Por el contrario, la proteína Tiorredoxina no tuvo tal efecto, aún cuando del ensayo para ésta se realizó con mayor cantidad de proteína (datos no mostrados).

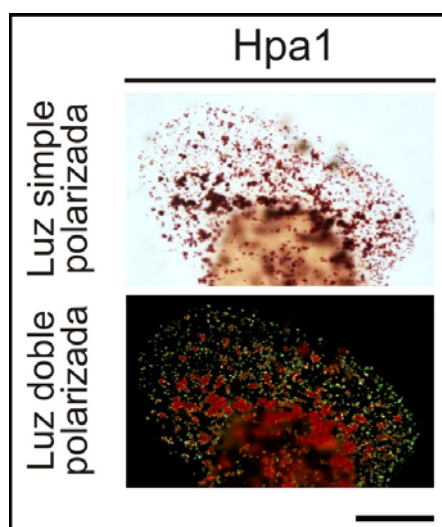


Figura 5.6. Birrefringencia de Hpa1. Microfotografías de fibras de Hpa1 teñidas con CR y visualizadas con luz simple polarizada y con luz doble polarizada. Se observa detalladamente el efecto birrefringente característico verde-manzana esperado. La barra representa 40 µm.

Se ha informado anteriormente que proteína harpin HrpZ de *P. syringae* forma diversos oligómeros, hasta octámeros o decámeros (Chen *et al.*, 1998; Tarafdar *et al.*, 2009), y que también puede formar grandes estructuras oligoméricas, de por lo menos 16 unidades de monómeros (Haapalainen *et al.*, 2011). Con la intención de determinar el tamaño de las fibras producidas por Hpa1 y la existencia de

estructuras oligoméricas intermedias, se procedió a realizar un ensayo de filtración en gel utilizando una columna de exclusión molecular de muestras de fibras de la misma (ver Materiales y Métodos 3.5.3.). De esta forma, se logró determinar que las fibras de Hpa1 son de un tamaño muy superior al encontrado para la proteína purificada recientemente, determinándose además que aparentemente no están presentes otras estructuras oligoméricas superiores a la tetramérica. Sólo se logra observar un pequeño “hombro”, indicativo quizás de la existencia de fibrillas. De hecho, se puede observar que casi toda la proteína se mueve por fuera de los poros de matriz, saliendo prácticamente en el volumen muerto de la columna. Se puede decir entonces que al llegar al estadio de fibras no existen oligómeros intermedios de bajo peso molecular, sino que es un conjunto heterogéneo de distintas estructuras de alto peso molecular. Si bien se observa un pequeño pico del peso molecular tetramérico en la muestra de fibras, el mismo es de una intensidad muy baja, lo que indica que el proceso de fibrilación es un proceso que conlleva a la pérdida casi total de las conformaciones oligoméricas de bajo peso molecular, al menos en el caso de Hpa1 (Figura 5.7).

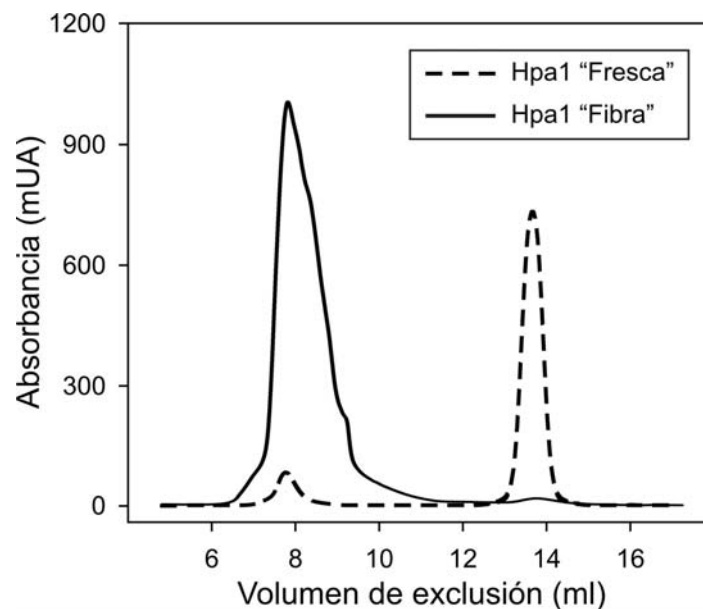


Figura 5.7. Perfil de salida de la columna de exclusión molecular Superdex 200. Se sembró una alícuota de Hpa1 recombinante recientemente purificada (línea de trazo cortado), y una alícuota de fibras de Hpa1 (línea de trazo continuo). Se puede observar que no sólo cambian las intensidades de los picos para cada caso, sino también lo hacen las relaciones entre ellos.

5.4. Cinética de formación de fibras de Hpa1 *in vitro*

Tal como se detalló en el capítulo anterior, la expresión del gen *hpa1* es temprana tanto durante el proceso infectivo en el apoplasto vegetal como sobre la superficie de hojas de naranja (Figuras 4.14 y 4.15). Además, Hpa1 de Xac es secretada en forma dependiente del SST3 de la bacteria (Figura 4.22), de la misma forma que lo hacen otras proteínas harpin (Galán y Collmer, 1999). Por otra parte, la HR desarrollada por su homólogo HpaG de Xag en plantas no hospedadoras es dependiente de la formación de su estructura amiloide, por lo tanto también dependiente del proceso de oligomerización y maduración de las fibras (Oh *et al.*, 2007). Debido a esta importancia, se decidió realizar un estudio de la cinética de formación de fibras amiloides por parte de Hpa1 de Xac.

El compuesto Tioflavina T (Thio-T) es un colorante altamente específico ampliamente utilizado para visualizar y cuantificar la presencia de agregados de amiloides, tanto *ex vivo* en tejidos animales como *in vitro* (Khurana *et al.*, 2005). Los ensayos desarrollados *ex vivo* se refieren a la experimentación realizada sobre tejidos de un organismo en un entorno externo. Las diferencias existentes entre los tejidos animales y vegetales hace que los ensayos realizados *ex vivo* en estos últimos utilizando Thio-T sean muy dificultosos de llevarse a cabo, por lo tanto se optó por utilizar un ensayo *in vitro*. Cuando este colorante fluoróforo se une a estructuras ricas en láminas β (como lo son las fibras amiloides), el mismo muestra un aumento de intensidad en el pico de emisión de fluorescencia a ~485 nm. Debido a ello, este colorante puede ser utilizado para hacer el seguimiento de formación de fibras amiloides a partir de proteínas frescas en solución (LeVine, 1993; Khurana *et al.*, 2005). En base a esta característica, nos propusimos realizar un análisis de la cinética de formación de fibras de Hpa1, y de esta forma tener mayor información sobre la función de esta proteína en el ambiente de la planta. Este análisis se realizó como es descrito por Fernández y colaboradores (Fernández *et al.*, 2004) (ver Materialies y Métodos 3.5.8.). En síntesis, se tomaron muestras de solución de proteína recién preparada (fracción tetramérica) y se incubaron en distintas condiciones en viales de vidrio bajo agitación constante con microbarras magnéticas. Las condiciones analizadas consistieron en utilizar dos temperaturas (28 °C y 37 °C) y dos medios para la incubación (*buffer* Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM y el medio de cultivo mimetizador del apoplasto vegetal XVM2). La necesidad de utilizar el medio XVM2 se debió a que, por motivos prácticos de la técnica, se requirieran

volúmenes relativamente altos de líquido apoplástico. Se tomaron alícuotas (7,5 μ l) a diferentes tiempos y se añadieron a 2 ml de una solución 10 μ M de Thio-T en MES 50 mM, pH 6,5. Utilizando una cubeta de cuarzo, se excitó esta mezcla a 446 nm y se generó el espectro de emisión registrado a través de un espectrofluorómetro, tomando en cuenta el valor del pico de emisión cercano a 480 nm. Posteriormente, estos valores de fluorescencia fueron normalizados utilizando el menor y el mayor valor obtenido, y graficados con respecto al tiempo (Figura 5.8) (Fernández *et al.*, 2004). Ajustando la gráfica a una curva sigmoidea, se logró obtener el punto de inflexión o punto medio (t_m) de cada una de las gráficas para las condiciones analizadas. Este valor es representativo para la proteína en cada condición, y señala el tiempo necesario para que la población de fibras alcance la mitad de su crecimiento. Así se logró determinar que Hpa1 forma fibras con mayor velocidad a 37 °C que a 28 °C en *buffer* Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, hecho que es esperado debido al aumento en la energía cinética de las moléculas de proteína. También se determinó la cinética de agregación a 28 °C en el medio XVM2 y se observó que, a pesar de ser levemente más lenta que en *buffer*, en este medio que mimetiza el apoplasto vegetal también se produce la agregación (Figura 5.8). Otra observación que deriva del gráfico es que las pendientes a 28 °C son iguales tanto en *buffer* Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM como en XVM2; y que la diferencia observada en el t_m para cada caso se debe a una fase “Lag” (fase de inicio donde mayoritariamente se forman estructuras oligoméricas) más larga en el caso del medio de cultivo XVM2, siendo las pendientes de crecimiento prácticamente iguales.

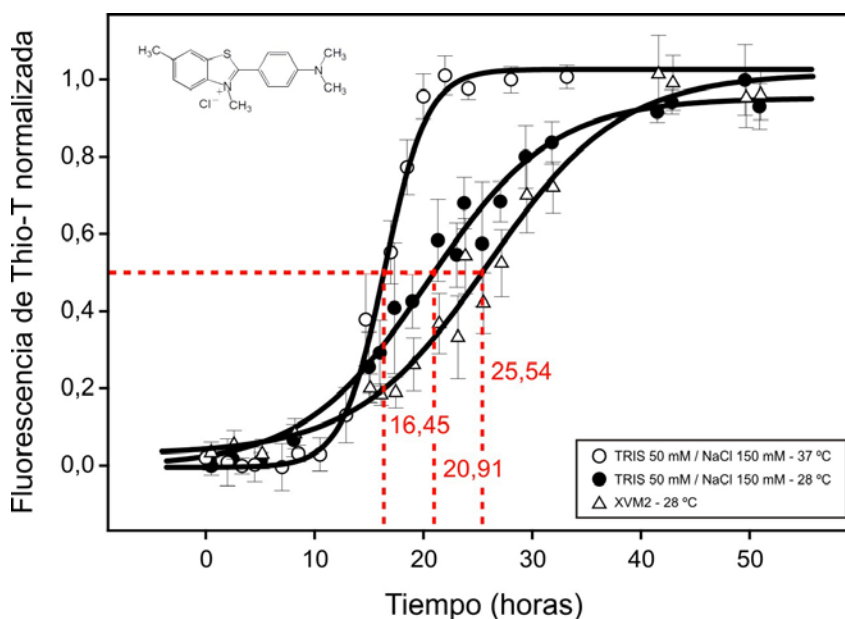


Figura 5.8. Cinética de agregación de fibras amiloides de Hpa1 seguida con Tioflavina T. Se muestran los gráficos de Fluorescencia de Thio-T normalizada vs. Tiempo para cada condición analizada; Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM a 37 °C (círculos blancos) y 28 °C (círculos negros), y medio XVM2 a 28 °C (triángulos blancos). Para todas las condiciones analizadas se muestran los valores ajustados a una curva sigmoidea y los valores correspondientes a los puntos de inflexión (t_m). Se muestra además, en el sector superior izquierdo, la estructura de una molécula de Tioflavina T.

Como se comentó anteriormente, Hpa1 tiene predicha en su estructura dos regiones de hélices α y una pequeña lámina β ubicada en la región amino terminal (Figura 5.3), aunque se sabe que las fibras amiloides son muy ricas en estructuras con láminas β . Con el objetivo de poder seguir en el tiempo estos cambios conformacionales de hélice α a lámina β , y así poder comprender mejor el proceso cinético de formación de fibras, se decidió determinar las distintas estructuras secundarias mediante el uso de espectroscopía de dicroísmo circular en la región de 190 nm a 260 nm a través del tiempo (ver Materiales y Métodos 3.5.5.). Así, se colocó ^6His -Hpa1 recién preparada (fracción tetramérica) a una concentración 50 μM en *buffer* HEPES 10 mM pH 7, NaCl 20 mM en un vial de vidrio junto con una microbarra magnética y se la colocó a 28 °C en agitación constante. Las pruebas realizadas con el medio XVM2 sólo (sin proteína) presentaron diversos picos en los espectros de CD, debido a que alguno de sus componentes absorbe luz polarizada circularmente. Esto obligó a utilizar un *buffer* regulado a un pH similar al de este medio, pero con una composición mucho más sencilla. A lo largo de casi 2 días se tomaron distintas alícuotas, se diluyeron 1:10 en agua destilada y se tomaron los espectro de CD correspondientes. De esta forma, se logró captar los cambios estructurales que sufre la proteína desde su estado inicial, una estructura secundaria que presenta hélices α y láminas β , a una conformación más parecida a la del tipo

todo lámina β (Figura 5.9), la cual se caracteriza por tener un sólo pico negativo entre los 215 nm y los 225 nm (Fasman, 1996). El ensayo también se realizó utilizando fibras ya formadas (chequeadas por otros ensayos), las cuales presentaron un espectro muy similar al obtenido a las 44 horas de iniciado el ensayo (Figura 5.9, línea amarilla y línea de trazos negra).

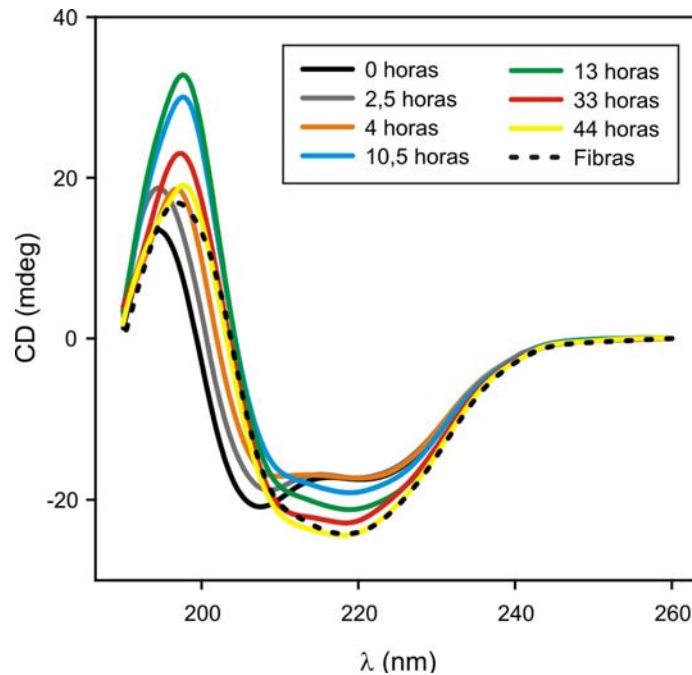


Figura 5.9. Cambios de conformación en el tiempo de Hpa1 seguido por dicroísmo circular. Se muestran los distintos espectros de CD obtenidos entre 190 nm y 260 nm para las alícuotas de proteína extraídas a lo largo del tiempo. Se pueden observar notablemente los cambios en la forma de las curvas, ubicando los más importantes entre las 4 horas y las 13 horas. En línea de trazos negra se muestra el espectro de CD obtenido utilizando como muestra fibras maduras de Hpa1. Los espectros graficados son representativos de 4 corridas espectroscópicas y están corregidos con respecto al *buffer* utilizado a la temperatura de trabajo.

5.5. Estabilidad de Hpa1 frente a la temperatura seguida a través de dicroísmo circular

Como se ha mencionado anteriormente, en términos generales, las proteínas harpin son proteínas ricas en residuos de glicina, que carecen de residuos de cisteína, que se secretan al medio de cultivo cuando se expresa el SST3, y que poseen actividad inductora de HR termoestable cuando se infiltran en hojas de diversas plantas no hospedadoras (Alfano y Collmer, 1997). Todas estas características fueron corroboradas para Hpa1 de Xac (Figuras 4.1, 4.5 y 4.22). Con el objetivo de determinar la estabilidad de Hpa1 frente a la temperatura, y basados en los cambios conformacionales que sufre esta proteína a lo largo del tiempo, se decidió analizar la estabilidad térmica de tanto la proteína purificada recientemente (fresca), como también de las fibras maduras (fibras). Para ello se siguieron los cambios conformacionales utilizando espectros de dicroísmo circular partiendo, en cada caso, desde temperaturas bajas (10 °C) hasta temperaturas altas (100 °C). Por otro lado, también se obtuvieron los espectros correspondientes al enfriamiento de las muestras, partiendo de altas temperaturas hasta llegar a bajas (desde 100 °C hasta los 10 °C). A cada temperatura se obtuvo un espectro de CD en el rango 190 nm a 260 nm (ver Materiales y Métodos 3.5.5.), y una vez terminado cada ensayo, se graficaron estos espectros a través del gradiente térmico. Así, se determinó que la proteína fresca a bajas temperaturas posee la conformación $\alpha+\beta$ ya definida anteriormente, la cual se pierde al aumentar la temperatura, tornando a espectros más parecidos a los encontrados en proteínas con dominios sin estructura definida (ovillo estadístico) (Figura 5.10, superior izquierda). Cuando esta muestra es previamente calentada, y luego se descende la temperatura, los espectros obtenidos muestran un proceso inverso de reestructuración a la conformación $\alpha+\beta$. Esto sugiere que cuando la proteína es purificada recientemente (fresca) el proceso de desnaturalización/renaturalización es reversible (Figura 5.10, superior derecha). Por otro lado, el calentamiento de las fibras de Hpa1 indica que aquí también se pierde la estructura rica en láminas β (pérdida del pico cercano a los 220 nm) para alcanzar una estructura de ovillo estadístico (Figura 5.10, inferior izquierda). Notable e interesantemente, cuando las fibras son previamente calentadas, y luego se descende la temperatura, los espectros obtenidos indican que la proteína toma conformaciones más similares a las alcanzadas por la proteína fresca

(conformaciones del tipo $\alpha+\beta$) (Figura 5.10, inferior derecha), y no similares a las de todo lámina β . Esto está indicando que, en el caso de las fibras, el proceso de desnaturalización/renaturalización no es reversible, generándose (en el proceso total de calentamiento/enfriamiento) el cambio conformacional desde una estructura de fibras ricas en láminas β a otra nuevamente con estructuras del tipo $\alpha+\beta$.

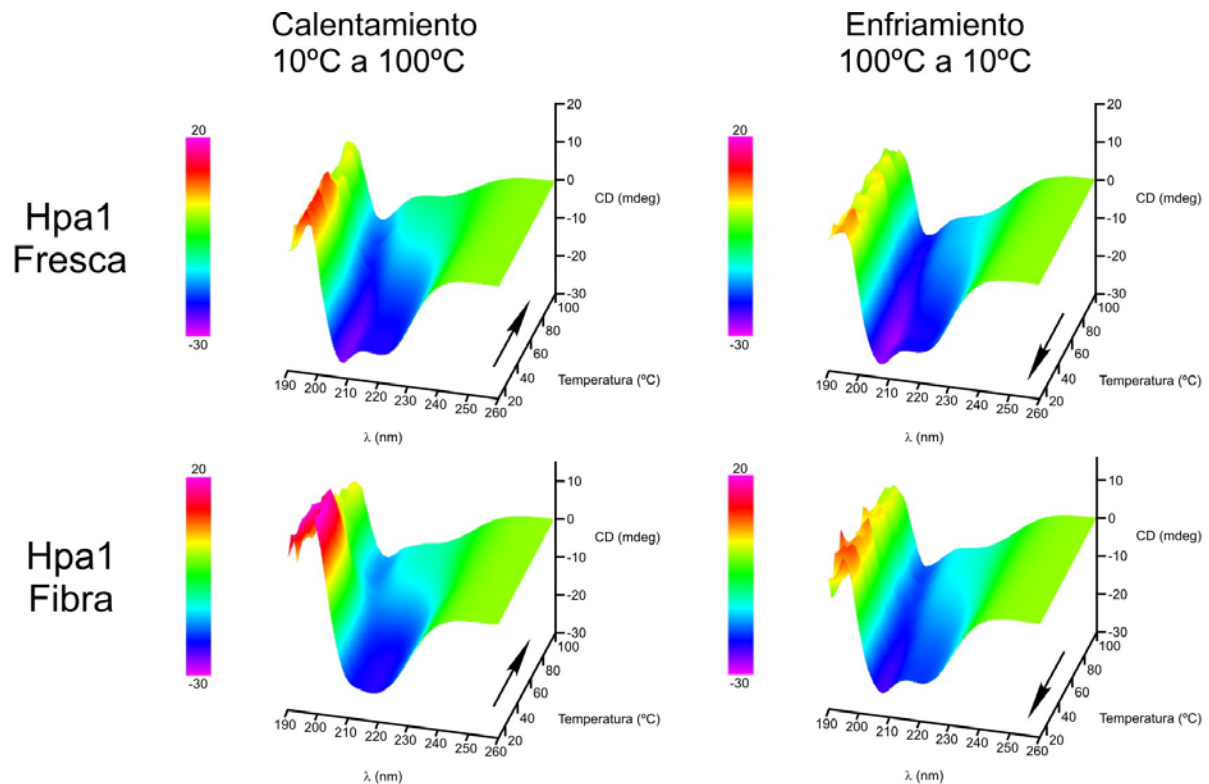


Figura 5.10. Gráficos en tres dimensiones de los espectros de CD versus temperatura. Se muestran los ensayos realizados para la proteína Hpa1 recientemente purificada (fresca) al ser calentada (**Superior izquierda**) y enfiada (**Superior derecha**); y los realizados para el caso de las fibras de Hpa1 al ser calentadas (**Inferior izquierda**) y enfiadas (**Inferior derecha**). Las flechas indican el sentido en el que se varió la temperatura durante los respectivos ensayos.

Los estudios de análisis del plegamiento de proteínas por lo general se realizan utilizando los valores de elipticidad (u otra unida de CD) a 220 nm, ya que los datos en longitudes de onda más altas suelen tener menor absorción y mayor relación señal a ruido. De esta forma, se pueden tomar los respectivos valores para las condiciones a analizar, y realizar un gráfico de elipticidad normalizada con respecto a la temperatura (Greenfield, 2006). Haciendo un análisis de estas curvas de fusión, se logró determinar la t_{melting} (temperatura necesaria para comenzar con la desnaturalización de la muestra) para los casos de calentamiento de tanto Hpa1 fresca como fibra (Figura 5.11). Se puede destacar que las mismas son muy

similares para ambas muestras. Es decir, que la estabilidad frente al calentamiento es similar tanto para Hpa1 recientemente purificada como para Hpa1 en fibras, existiendo una diferencia de temperatura muy pequeña entre ambas. Esto indica que la estabilidad térmica de al menos la proteína harpin Hpa1 de Xac, no está asociada a una conformación determinada por su estructura secundaria.

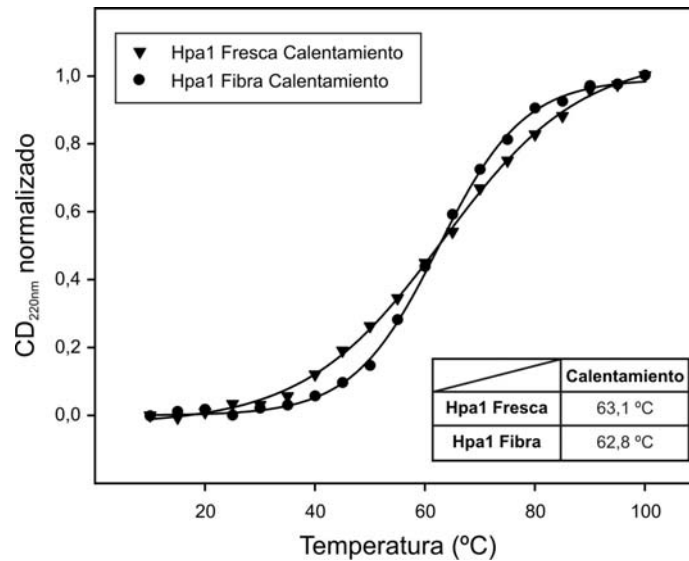


Figura 5.11. Gráficos del valor de CD a 220 nm normalizado de cada espectro realizado de la Figura 5.10 vs. Temperatura a la que se obtuvo. Cada serie de valores se ajustó a una curva sigmoidea, y se obtuvo el valor del punto de inflexión de la misma, t_{melting} , indicado en el recuadro inferior derecho.

5.6. Análisis de la capacidad de formación de fibras de las regiones amino terminal y carboxilo terminal de Hpa1

La proteína harpin Hpa1 de *X. oryzae* pv. *oryzae*, también posee predichas en su secuencia dos regiones de hélices α , tal como lo hace Hpa1 de Xac (Figura 5.2). La hélice α ubicada en el extremo amino terminal está implicada en la formación de agregados (Wang *et al.*, 2007). Por otro lado, una mutación en esta región pero en HpaG de Xag, HpaG (L50P), genera una forma de la proteína que no posee estructuras de hélices α , no forma tetrámeros ni otros oligómeros, y en última instancia tampoco desarrolla fibras de tipo amiloides (Oh *et al.*, 2007). Aunque estas regiones de las proteínas harpin han sido identificadas hace varios años, pocos estudios se han realizado para examinar la hélice α predicha ubicada en la región carboxilo terminal. Respecto a esto, Oh y colaboradores mostraron que diversas mutaciones desestructurantes en esta región no afectan la capacidad de desarrollo de formación de fibras amiloides, y sugirieron que debido a que la mutante HpaG (L50P) muestra una estructura desordenada, la hélice α predicha ubicada en el extremo carboxilo terminal no formaría una estructura helicoidal en forma espontánea; sin embargo, y a través de otros ensayos, indicaron que estaría modulando la velocidad de formación de fibras de HpaG, sugiriendo una posible interacción intramolecular entre las hélices α de ambas regiones (Oh *et al.*, 2007).

Por lo tanto, a continuación se decidió analizar si los dominios amino terminal y carboxilo terminal de Hpa1 de Xac están involucrados en la formación de fibras. Así, se expresaron y purificaron ambos dominios, Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇, fusionados a la proteína Trx a través del uso del vector de expresión pET32a, ya que su expresión sin esta última en el vector pET28a no pudo ser lograda, aún modificando una gran variedad de condiciones tanto en la inducción como en el proceso de purificación, probablemente debido a una labilidad intrínseca. Se realizaron ensayos de unión a CR (ver Materiales y Métodos 3.5.6.) utilizando los fragmentos purificados Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ de esta proteína harpin. El hecho de que estos fragmentos estén expresados como proteínas de fusión a Trx no presenta ningún inconveniente ya que, como se demostró previamente, esta proteína no genera fibras amiloides, invariando los espectros de CR (Figura 5.5). Al igual que ocurrió con Hpa1 en su secuencia completa, las muestras del fragmento Hpa1₁₋₅₇ se unieron al colorante, mostrando un desplazamiento hacia el rojo en el espectro del mismo, aunque con

una diferencia máxima en la absorbancia entre las curvas de CR unido a fibras y CR sólo a una longitud de onda menor que los 540 nm (Figura 5.12 A), valor observado para Hpa1 completa (Figura 5.5). Por otro lado, las muestras del fragmento Hpa1₅₈₋₁₃₇ no se unieron al colorante CR, teniendo un espectro prácticamente idéntico al obtenido con el colorante solo (Figura 5.12 B). Este resultado sugiere que Hpa1₁₋₅₇, si bien no lo hace de la misma forma que la proteína completa, también puede formar fibras del tipo amiloide.

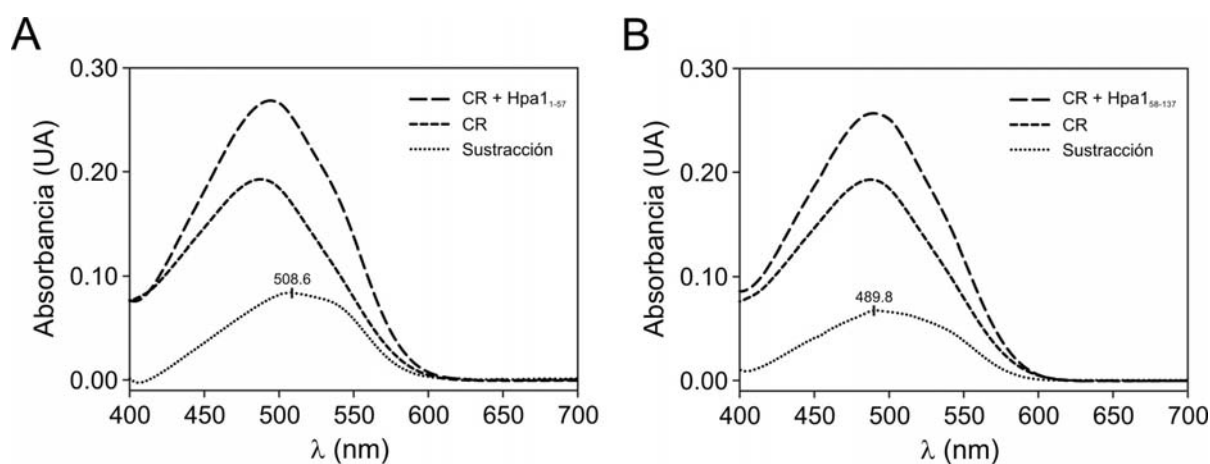


Figura 5.12. Análisis de los fragmentos de Hpa1 para la formación de fibras amiloides, reveladas por la unión a rojo congo (CR) y espectroscopía visible. Espectros de absorbancia de una solución de CR en ausencia (línea de trazos cortos) y presencia (línea de trazos largos) de muestras de Hpa1₁₋₅₇ (A) y de Hpa1₅₈₋₁₃₇ (B), corregidos respecto a los espectros de cada proteína sola. Las líneas de puntos indican, para cada proteína analizada, la diferencia entre el espectro de CR con proteína y CR solo. Cada espectro mostrado es el resultado de la acumulación de tres corridas espectroscópicas.

La formación de fibras amiloides de los fragmentos Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ también se analizó por tinción con CR y ensayo del efecto de birrefringencia (ver Materiales y Métodos 3.5.7.) mencionado anteriormente. De esta forma, se observó que sólo Hpa1₁₋₅₇ se tiñó y produjo el efecto de birrefringencia verde-manzana esperado (Figura 5.13). Por el contrario, el fragmento Hpa1₅₈₋₁₃₇ no tuvo tal efecto. Aún cuando la preparación del ensayo para éste se realizó con mayor cantidad de proteína, no se observó unión de la muestra al colorante; por el contrario, durante el proceso de tinción la muestra se disolvió indicando y corroborando así que este fragmento no produce fibras amiloides (datos no mostrados).

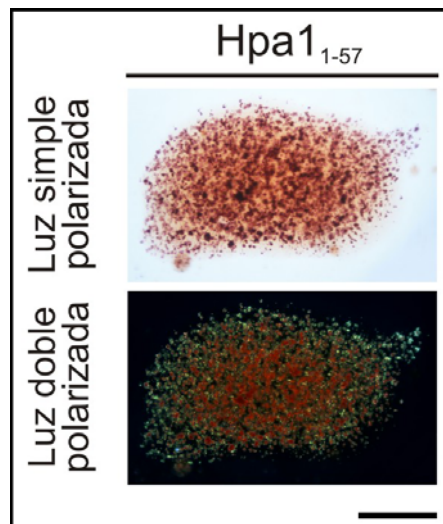


Figura 5.13. Birrefringencia de Hpa1₁₋₅₇. Microfotografías de fibras de Hpa1₁₋₅₇ teñidas con CR y visualizadas con luz simple polarizada y con luz doble polarizada. Se observa detalladamente el efecto de birrefringente verde-manzana esperado. La barra representa 40 μm .

5.7. Contribución de las regiones amino terminal y carboxilo terminal de Hpa1 a la inducción de HR en plantas no hospedadoras, formación de canchales y agregación bacteriana

En vista a los resultados anteriores, se decidió evaluar si la reacción de HR y la capacidad de agregar células bacterianas de Hpa1 son dependientes de su estructura fibrilar. Para tal fin, se utilizaron los dominios Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ separadamente en estos ensayos.

Al analizar el efecto que producen estos dominios en plantas no hospedadoras, ambas regiones de la proteína indujeron HR en tabaco, pimiento y *A. thaliana* de los cultivares Col-0, Ler, Ws, Nossen y C24 (Figura 5.14). Aquí también se procedió a infiltrar las proteínas a diversas concentraciones con la intención de determinar la sensibilidad a cada uno de los dominios (ver Materiales y Métodos 3.9.1.). La infiltración de los dominios en hojas de pimiento y tabaco mostró las típicas lesiones de HR a partir de 1 μ M y 2,5 μ M, respectivamente. En el caso de *A. thaliana*, se infiltraron mitades de hojas de los cultivares Col-0, Ler, Ws, Nossen y C24 con cada dominio a una concentración 5 μ M, y en todos los casos se visualizó el desarrollo de una HR (Figura 5.14). Teniendo en cuenta que la proteína completa no genera HR, el ensayo utilizando estos dominios no se realizó en hojas de plantas de algodón.

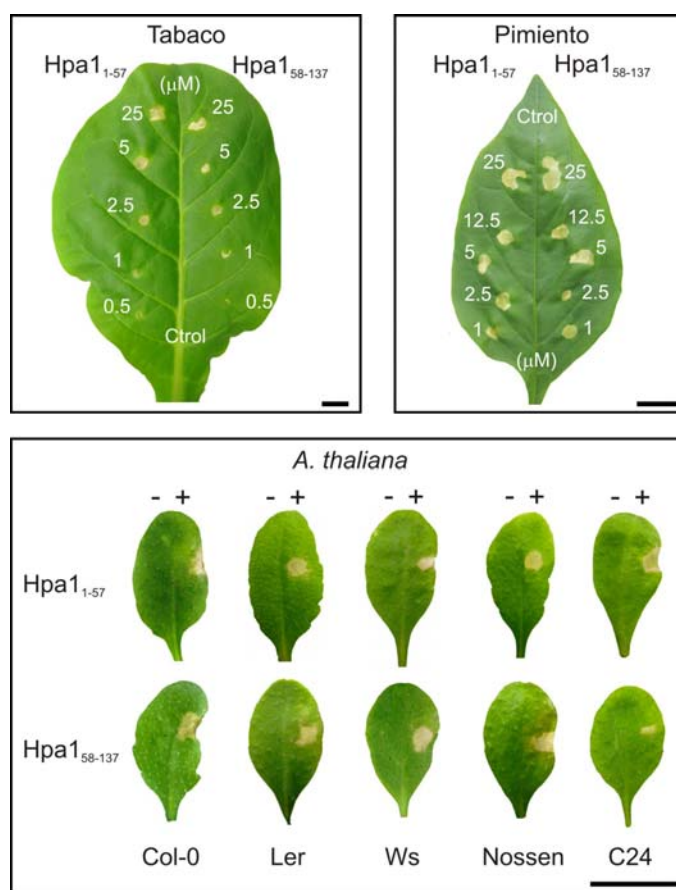


Figura 5.14. Contribución de los dominios amino y carboxilo terminales de Hpa1 a la respuesta de plantas no hospedadoras. Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ provocan HR en el tabaco, pimienta y *A. thaliana* Col-0, Ler, Ws, Nossen y C24 en las concentraciones indicadas. Las barras indican 1 cm.

A fin de analizar la contribución de estos dominios a la formación de canchros por parte de Xac, ambos péptidos fueron co-infiltrados a una concentración 5 μM junto con la cepa Xac tipo salvaje a 5×10^3 , 1×10^5 y 5×10^6 UFC/ml. Significativamente se observó un mayor número de canchros en presencia de Hpa1₁₋₅₇, mientras que no se observaron diferencias significativas cuando la infiltración se realizó junto con Hpa1₅₈₋₁₃₇ (Figura 5.15 A y B). A la concentración bacteriana más baja utilizada (5×10^3 UFC/ml) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (con y sin cada uno de los dominios), probablemente debido a la aleatoriedad y/o a la baja cantidad de canchros observados en esta concentración de inóculo bacteriano (Figura 5.15 A y B).

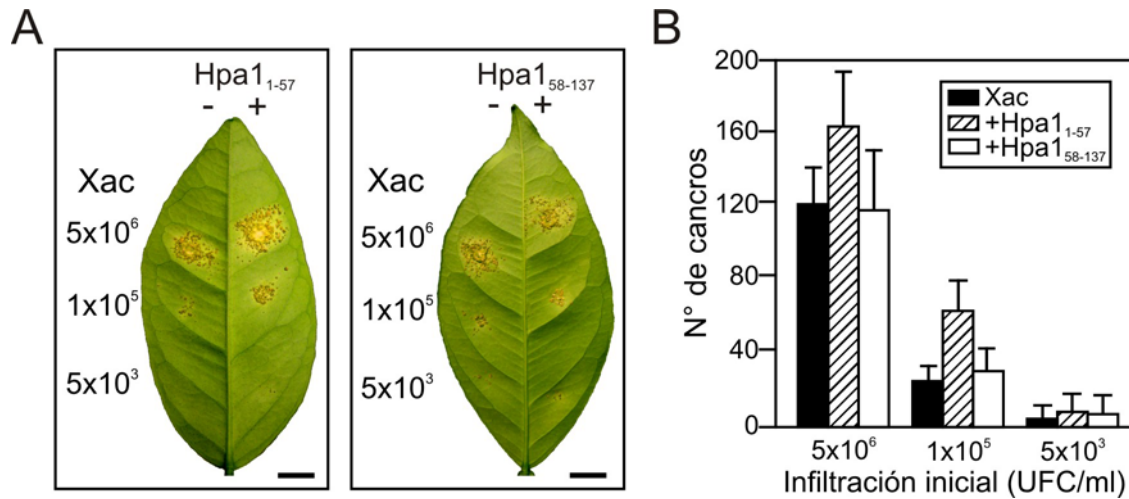


Figura 5.15. Contribución de los dominios amino y carboxilo terminales de Hpa1 a la virulencia de Xac. (A) Hpa1₁₋₅₇ mejora la virulencia de Xac en hojas de cítricos, mientras que Hpa1₅₈₋₁₃₇ no lo hace. Las mitades izquierdas de las hojas fueron co-infiltradas con Xac y Trx-⁶His a una concentración 5 μ M como control, y las mitades derechas fueron co-infiltradas con los péptidos de fusión a una concentración 5 μ M cada uno. Las barras indican 1 cm. (B) Cuantificación del número de canchales en hojas de cítricos inoculados como se describe en (A). Las barras son la media de seis hojas ensayadas y las barras de error son las desviaciones estándar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para analizar la contribución de los dominios a la agregación bacteriana, se llevó a cabo el mismo ensayo realizado anteriormente con la proteína completa, incubando en un portaobjetos por 3 horas cada uno de los dominios a una concentración 5 μ M con Xac tipo salvaje expresando GFP crecida en XVM2 con agitación a 28 °C, para luego visualizar el preparado por microscopía confocal láser de barrido (ver Materiales y Métodos 3.6.2.). De acuerdo con los resultados anteriormente comentados, sólo Hpa1₁₋₅₇ causó agregación bacteriana de células de Xac, visualizado por microscopía confocal; mientras que la región carboxilo terminal sólo produjo raramente algunos agregados, siendo estos además pequeños (Figura 5.16). Pese a estas observaciones, es necesario aclarar que los agregados obtenidos con la proteína Hpa1 completa fueron de un tamaño considerablemente mayor (Figura 4.20 B) que los observados con la región amino terminal. También es interesante el hecho de que cuando este ensayo se realizó utilizando ambos fragmentos de Hpa1 al mismo tiempo, los agregados bacterianos obtenidos tampoco fueron del tamaño desarrollado por la proteína completa (datos no mostrados). Esto sugiere que se requiere de toda secuencia de la proteína Hpa1 para observar una completa actividad de agregación por parte de la misma. Como control, se incubaron las bacterias con la proteína Trx-⁶His, nuevamente no observándose ningún agregado (Figura 5.16).

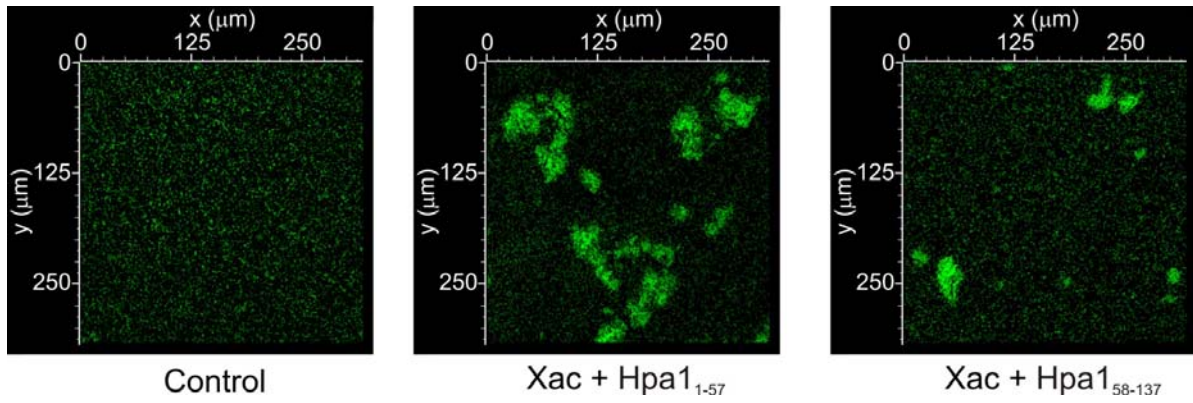


Figura 5.16. Contribución de los dominios amino y carboxilo terminales de Hpa1 a la agregación de Xac. Fotografías representativas de microscopía confocal láser de barrido de Xac tipo salvaje expresando la proteína verde fluorescente (GFP) incubadas por 3 horas a 28 °C con Trx-⁶His (Control), Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ a una concentración de 5 μM.

5.8. Discusión

Varias funciones han sido atribuidas a las proteínas harpin de fitopatógenos. Uno de los más caracterizado es su capacidad para unirse a las membranas celulares y formar poros conductores de iones (Engelhardt *et al.*, 2009; Haapalainen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2001). Aunque se ha determinado que pueden modular la formación de canales iónicos (Lee *et al.*, 2001; Rebutier *et al.*, 2007), la base bioquímica de la desestabilización de la membrana celular vegetal por harpin es aún desconocida. Es de destacar que la característica prominente de las harpin es su alto contenido de residuos de glicina, que desempeña un papel importante en la unión de membranas hidrófobas (Kourie y Henry, 2002). Además, se ha demostrado que la región rica en glicinas de la proteína β Amiloide modula la estructura secundaria de láminas β de la proteína, así como la actividad citotóxica y la agregación (Pike *et al.*, 1995). En este contexto, se ha demostrado que HpaG de Xag, en condiciones similares al apoplasto vegetal, puede formar oligómeros esféricos biológicamente activos, protofibrillas y fibrillas ricas en láminas β , y que la forma fibrilar de HpaG es amiloide (Oh *et al.*, 2007). Otras harpin, como HrpN de *E. amylovora* y HrpZ de *P. syringae*, también pueden formar protofibrillas o fibrillas curvilíneas, y se ha sugerido que la amiloidogénesis es una característica común de las proteínas harpin (Oh *et al.*, 2007). Además, HpaG de Xag comparte características bioquímicas comunes con las proteínas relacionadas con enfermedades amiloides animales responsables de la degeneración neuronal y la muerte celular, lo que sugiere mecanismos de acción similares en la inducción de la muerte celular en plantas y animales.

Diferentes técnicas, tales como cromatografía de exclusión molecular, microscopía electrónica, espectroscopia de dicroísmo circular, tinción con el colorante rojo congo, y resistencia a proteasa se han utilizado para demostrar que HpaG de Xag puede oligomerizar primero como un tetrámero, a continuación, formar fibrillas ricas en láminas β y, finalmente, fibras de tipo amiloide (Oh *et al.*, 2007). Por otro lado, la oligomerización de HrpZ1 de *P. syringae* fue examinada por al menos cuatro métodos diferentes, y todos los datos de estos ensayos mostraron que HrpZ1 es purificada como dímero, y que puede formar oligómeros de 16 monómeros como máximo (Haapalainen *et al.*, 2011). Los ensayos realizados con Hpa1 de Xac revelaron características similares a las observadas con las proteínas harpin

nombradas. Hpa1 de Xac mostró ser purificada en forma de tetrámero a partir de células de *E. coli*, aunque en el proceso de purificación también es evidente una pequeña población de mayor tamaño. Esto es indicativo de que el proceso de oligomerización puede ser espontáneo y continuo. Al analizar la estructura secundaria de la fracción tetramérica de Hpa1, la misma mostró ser rica en estructuras de hélices α , concordante con la predicción realizada previamente, y lo encontrado en otras proteínas harpin (Oh *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Además, la estructura secundaria se analizó con respecto al pH, indicando que la proteína presenta estabilidad entre los valores de pH desde 6 a 9. Valores inferiores de pH generaron cambios radicales en la estructura, promoviendo la precipitación de la proteína.

Al igual que HpaG de Xag, Hpa1 de Xac mostró generar fibras del tipo amiloides, lo que fue demostrado a través de ensayos con el colorante rojo congo, como el corrimiento hacia el rojo de la absorbancia del colorante y el efecto birrefringente característico, al estar unido a este tipo de fibras. Todos los resultados obtenidos a partir de los diversos ensayos realizados estarían sugiriendo que esta característica le confiere la capacidad de agregar células bacterianas de manera dependiente de su estructura fibrilar. Por otro lado, se analizó *in vitro*, aunque emulando el entorno apoplástico de la planta, la cinética de formación de estas fibras por parte de Hpa1 de Xac a través del uso del colorante Tioflavina T, o realizando un seguimiento del cambio conformacional de la proteína por espectroscopia de dicroísmo circular. Esto indicó que la misma tiene una cinética de formación relativamente rápida, lo que avala la hipótesis sobre la importancia de las proteínas harpin durante el proceso infectivo de los fitopatógenos. Por otro lado, una vez iniciado el proceso de oligomerización y formación de fibras, se observó la desaparición de la fracción tetramérica de Hpa1, indicando que el proceso es altamente favorable hacia la formación de la fibras, probablemente por un proceso cooperativo, aunque esto último no está aún definido, aún en sistemas amiloides extensamente estudiados (Jiang *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2013). Las proteínas harpin son estables al calor, probablemente debido a la falta de estructuras terciarias obvias estabilizadas por puentes de cisteína (He *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1992). Estudios sobre estabilidad térmica, tanto de la fracción tetramérica como de las fibras de Hpa1, indicaron que ambas formas son muy similares en estabilidad, siguiendo un camino de desnaturalización similar. Curiosamente, al calentar las

fibras y luego enfriarlas, produce que a bajas temperaturas las mismas tengan espectros similares a los obtenidos en la fracción tetramérica, mostrando una mezcla de estructuras de hélices α y láminas β . Todo esto indica, junto al hecho de obtener a Hpa1 recombinante en forma tetramérica, la existencia de alguna forma de estructura terciaria en esta proteína, lo que estaría en desacuerdo con lo enunciado previamente sobre la falta de éstas.

La expresión de las regiones amino y carboxilo terminal de Hpa1 de Xac, y los análisis para determinar su importancia y aporte a las características observadas en la proteína completa, mostraron que ambas regiones son capaces de elicitar HR.

Varias proteínas de la familia Hpa1 de diversas *Xanthomonas* han sido diseccionadas para caracterizar el péptido mínimo requerido para el desarrollo de HR. Por análisis mutacional en HpaG de Xag, un péptido de 23 aminoácidos, de Asn31 a Gln53, ha demostrado ser suficiente para inducir HR (Kim *et al.*, 2004). Haciendo un análisis de la secuencia de HpaG, se puede observar que esta región de 23 residuos aminoacídicos contiene la secuencia con estructura de hélice α amino terminal predicha para esta proteína (Oh *et al.*, 2007); lo que se cumple en otras proteínas harpin de otras *Xanthomonas* (Kim *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2010b). Otra observación que deriva de estas comparaciones es que el extremo amino terminal de esta secuencia es más conservado que el extremo carboxilo terminal (Figura 4.1), lo que sugiere que probablemente la capacidad de inducción de HR en plantas no hospedadoras está comandada por esta región conservada dentro de los 23 residuos. Por otra parte, deleciones en 12 codones para aminoácidos altamente hidrofílicos en el péptido equivalente de Hpa1 de Xoo causaron una pérdida del desarrollo de HR en hojas de tabaco (Wang *et al.*, 2008). Además, dos mutaciones de aminoácidos individuales en Hpa1 de Xoo (L51P) y Hpa1 de Xooc (L53P), que destruyen la integridad de la región predicha de formar un estructura de hélice α , y por lo tanto inhibiendo la formación de oligómeros, eliminan la capacidad elicitora de HR en tabaco (Wang *et al.*, 2008). Una mutante de HpaG de Xag incapaz de formar fibras del tipo amiloides (L50P) tampoco logró desarrollar HR, lo que indica una correlación positiva entre la fibrilogénesis y la actividad inductora de HR (Oh *et al.*, 2007). En Hpa_{Xm} de *Xanthomonas malvacearum*, esta actividad inductora de HR se limitó a un péptido de

14 residuos, LDQLLTQLIMALLQ, perteneciente a la región de hélice α amino terminal predicha comentada anteriormente para las otras proteínas harpin (Miao *et al.*, 2010b). Hpa1 de Xac posee todas las características enunciadas recientemente en una región conservada localizada en su extremo amino terminal, la cual también posee predicha una estructura de hélice α . Al parecer, el factor desestructurante mayoritario es el residuo Leu50 de HpaG (o su equivalente en cada harpin), el cual también posee Hpa1 de Xac. En este sentido, y al igual que las otras proteínas harpin estudiadas de esta familia, en Hpa1 de Xac existiría una dependencia obligada entre la fibrillogénesis y el desarrollo de HR en plantas no hospedadoras, estando esto estrechamente asociado a la región de hélice α de la región amino terminal.

Como se comentó anteriormente, pocos estudios se han realizado para examinar la hélice α predicha ubicada en la región carboxilo terminal. Oh y colaboradores mostraron que diversas mutaciones en esta región no afectan la capacidad de desarrollo de formación de fibras amiloides o de HR en plantas no hospedadoras, destacando que la hélice α predicha ubicada en el extremo carboxilo terminal no formaría una estructura helicoidal de forma espontánea (Oh *et al.*, 2007). Por otro lado, Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2007) demostraron que la delección de la región conservada de la hélice α amino terminal de HpaG de Xag, Hpa1 de Xoo y Hpa1 de Xooc, produce el mismo efecto negativo sobre la producción de HR en estas proteínas. Contrariamente a esto, recientemente Ji y colaboradores (Ji *et al.*, 2011) demostraron que el péptido correspondiente a la región con estructura de hélice α ubicada en el extremo carboxilo terminal de Hpa1 de Xoo, produce HR cuando es infiltrado en hojas de plantas de tabaco. En el presente trabajo de tesis, se aisló y estudió la capacidad de desarrollo de HR de la región carboxilo terminal de Hpa1 de Xac, la cual contiene la hélice α predicha conservada, y se determinó que la misma genera HR en plantas no hospedadoras, al igual que se observó con Hpa1 de Xoo (Ji *et al.*, 2011).

Tomando todos estos resultados y análisis en conjunto, se puede plantear una hipótesis enunciando que la hélice α carboxilo terminal poseería una capacidad inductora de HR innata, la cual sería inhibida o impedida de alguna forma por una región ubicada en el amino terminal de la proteína que no pertenece a la hélice α de ese extremo. Para poder explicarlo en una manera más sencilla, se llamará a la

hélice α amino terminal como H1 y a la carboxilo terminal como H2. Con esta hipótesis se podría justificar que las mutaciones desestructurantes en H1 (Oh *et al.*, 2007), o la delección íntegra de la misma (Wang *et al.*, 2007) produzcan que el resto de la proteína no desarrolle HR. A su vez, explicaría que H2 por su cuenta sí desarrolle HR (Ji *et al.*, 2011), de la misma forma que la región analizada en este trabajo de tesis (Hpa1₅₈₋₁₃₇) lo hace. Un punto interesante sobre esta hipótesis lo presenta Kim (Kim *et al.*, 2004) al estudiar la región carboxilo terminal analizando un péptido de HpaG de Xag desde el residuo D68 al Q133, y observando que el mismo no desarrolla HR. Respecto a esto, se puede decir que en este fragmento de HpaG faltaba una pequeña región definida por Oh y colaboradores que abarca los residuos Q59 a G67, la cual es flexible por ser rica en residuos de glutamina y glicina, y a la cual le fue sugerida una posible importancia en la interacción intramolecular entre H1 y H2 (Oh *et al.*, 2007). Por lo tanto, pareciera que la capacidad innata de H2 para generar HR es dependiente de esta pequeña región si la misma es a su vez expresada con el resto de la secuencia proteica carboxilo terminal, sugiriendo la existencia de otra región inhibidora para el desarrollo de HR por H2, probablemente en el extremo carboxilo terminal. De todas formas, por lo estudiado en este trabajo de tesis pareciera que el desarrollo de HR por parte de Hpa1₅₈₋₁₃₇ no dependiera de la formación de fibras amiloides, como fue planteado en otros trabajos. La hipótesis enunciada no plantea una justificación para este hecho observado, al menos de manera directa. Por lo tanto como perspectiva a futuro, y para poder aclarar estas dudas, se realizarán en nuestro laboratorio estudios diseccionando a Hpa1 de Xac teniendo en cuenta las distintas regiones de la proteína que aún no han sido caracterizadas estructural/funcionalmente, ahondando en los estudios que relacionan la fibrillogénesis, la agregación bacteriana y el desarrollo de HR en plantas no hospedadoras.

La prácticamente indiscutible correlación entre la fibrillogénesis y la capacidad de desarrollar HR en plantas no hospedadoras otorgada a la región de hélice α amino terminal, apoyada por la gran cantidad de trabajos científicos al respecto, se contraponen con la falta de información disponible producto de los escasos estudios en los que se ha analizado la región carboxilo terminal *per se* de estas proteínas harpin, lo que plantea y demanda a futuro emplear un mayor esfuerzo abocado al estudio de esta región.

De acuerdo con la mayor probabilidad de formación de una estructura amiloide por parte de la región amino terminal, se observó una promoción de la agregación bacteriana y un aumento de la virulencia cuando este péptido fue analizado, lo que sugiere una importante participación de la formación de fibras amiloides en este proceso de agregación bacteriana. De todas formas, los efectos observados con la región amino terminal fueron menores a aquellos obtenidos con la proteína completa, lo que sugiere que la región carboxilo terminal contribuye, de alguna manera, a la actividad global de la proteína.

Capítulo 3

Estudios sobre HrpE, la proteína componente del Pilus Hrp

6. Estudios sobre HrpE, la proteína mayoritaria del Pilus Hrp

6.1. Análisis *in silico* de las proteínas pilinas Hrp de fitopatógenos

Diversos estudios en los que se realizaron análisis bioinformáticos sugieren que las principales subunidades del Pilus Hrp de fitopatógenos Gram negativos pueden compartir la misma organización estructural, una estructura de hélice α predominante (Weber *et al.*, 2005). Los estudios comparativos con una mutante HrpA, la pilina de Hrp de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, y el análisis del perfil de hidrofobicidad de varias pilinas Hrp no homólogas sugieren una arquitectura común entre estas proteínas de diferentes bacterias fitopatógenos (Weber y Koebnik, 2005).

Las principales subunidades del Pilus Hrp de *P. syringae* pv. *tomato* (HrpA), de *R. solanacearum* (HrpY), y de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (HrpE_{Xcv}) se ensamblan para formar estructuras de pilus que son casi idénticos en características dimensionales como el diámetro y la longitud (Roine *et al.*, 1997; van Gijsegem *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2005). Sorprendentemente, sus secuencias no están conservadas, lo que implica la existencia de otras propiedades comunes, necesarias para su función (Weber y Koebnik, 2005), con la excepción esperada entre HrpE_{Xac} y HrpE_{Xcv}, donde el grado de homología es alto debido a la cercanía evolutiva de estas especies de fitopatógenos (Figura 6.1). Para encontrar alguna homología estructural entre las pilinas Hrp a pesar de la baja conservación de secuencias, se analizaron las características fisicoquímicas *in silico* de las pilinas de Xac, Xcv, Rs y Pst.

	HrpE _{Xac}	HrpE _{Xcv}	HrpY	HrpA
HrpE _{Xac}		77%	NC	17%
HrpE _{Xcv}	88%		25%	31%
HrpY	NC	43%		20%
HrpA	39%	40%	28%	

Similitud

Identidad

Figura 6.1. Identities and similarities of the amino acid sequences of the Hrp pilins of four phytopathogens (HrpE of Xac, HrpE of Xcv, HrpY of Rs, and HrpA of Pst). The values were calculated using the BLASTp tool for sequence analysis. NC: No Calculado, la baja identidad entre las secuencias impidió que el programa bioinformático calcule un valor.

Se cree que la hidrofobicidad es una de las principales fuerzas que impulsan el plegamiento de las proteínas. En general, los residuos hidrófobos se localizan preferentemente en el *core* estructural de la proteína, mientras que los residuos polares tienden a hacerlo en la superficie de la proteína plegada (Moelbert *et al.*, 2004; Kyte y Doolittle, 1982). Para realizar este análisis se utilizó el programa computacional ProtScale Tool de Expasy (<http://web.expasy.org/protscale/>). Todas las pilinas analizadas tuvieron perfiles de hidrofobicidad muy similares, con tres tramos alternados hidrófilos e hidrófobos en la mitad carboxilo terminal de su secuencia, indicando que esta parte de la proteína contiene regiones expuestas y ocultas al entorno. La región cercana al residuo 40 de todas las proteínas presenta un tramo hidrófobo común también. Además, las regiones amino terminales muestran patrones de hidrofobicidad similares, y una caída pronunciada de la hidrofiliidad entre los primeros 20 residuos de cada proteína (Figura 6.2).

El índice de inestabilidad proporciona una estimación de la estabilidad de una proteína en tubo de ensayo (Gasteiger *et al.*, 2005; Guruprasad *et al.*, 1990). Una proteína cuyo índice de inestabilidad es menor que 40 se prevé como estable, y un valor por encima de 40 predice que la proteína puede ser inestable. Por otro lado, el índice alifático de una proteína se define como el volumen relativo ocupado por cadenas laterales alifáticas (residuos de alanina, valina, isoleucina y leucina), y puede ser considerado como un factor positivo para el aumento de la termoestabilidad de las proteínas globulares (Gasteiger *et al.*, 2005; Akai, 1980). Los valores del índice de inestabilidad (HrpE_{Xac} 22,5; HrpE_{Xcv} 25,4; HrpA 18,34; HrpY 18,3) e índice alifático (HrpE_{Xac} 77,74; HrpE_{Xcv} 72,47; HrpA 85,66; HrpY 57,44), calculados utilizando el programa computacional ProtParam Tool de ExpASY (web.expasy.org/protparam/), fueron similar en los cuatro casos. Estos hallazgos sugieren un plegamiento común de las subunidades de Pilus Hrp de las los cuatro bacterias patógenas de plantas analizadas.

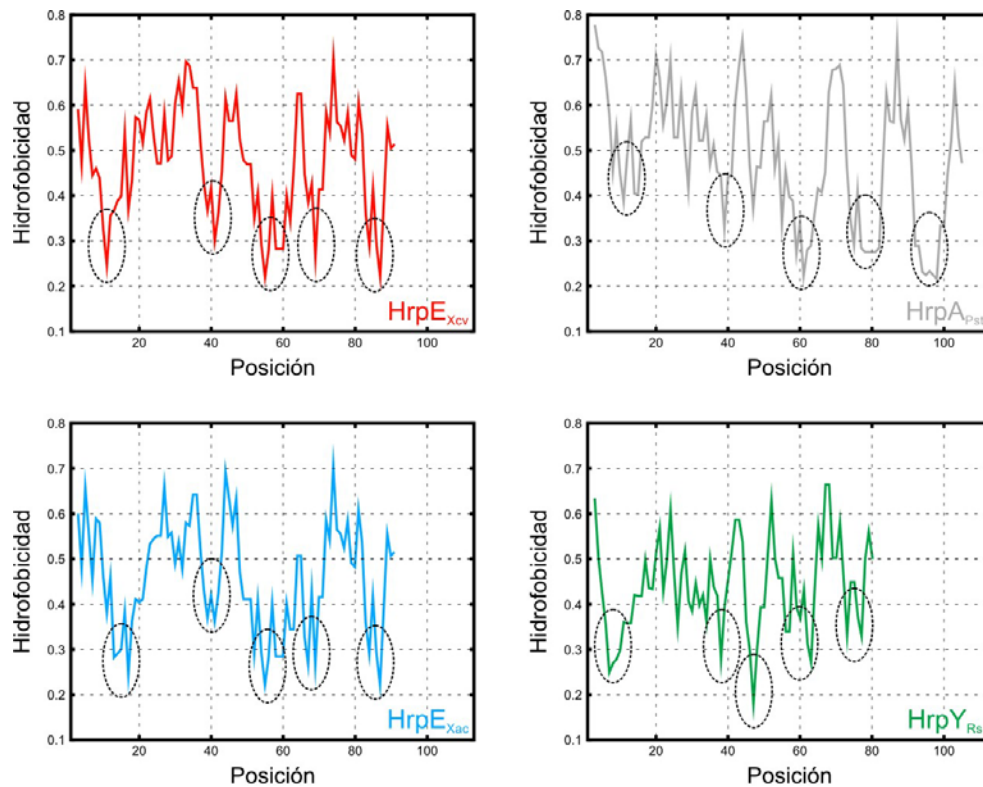


Figura 6.2. Gráficos de hidrofobicidad de las pilinas Hrp, calculadas utilizando la herramienta ProtScale del compendio de programas bioinformáticos ExPASy, usando la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle. Los valores están graficados normalizándolos con respecto a cada proteína analizada. Se destacan encerrados en óvalos los patrones de picos de baja hidrofobicidad conservados.

Las comparaciones de la secuencia aminoacídica de HrpE de Xac con la base de datos de proteínas utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico para proteínas (BLASTp, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) no revelaron secuencias homólogas, a excepción de proteínas altamente relacionadas pertenecientes a otras especies del género *Xanthomonas*, por ejemplo, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, y *X. axonopodis* pv. *glycines*, entre otras. Por otro lado, del análisis por apilamiento de las secuencias aminoacídicas utilizando la herramienta bioinformática ClustalW (www.genome.jp/tools/clustalw/) de 10 especies de *Xanthomonas*, se pudo observar que la mitad carboxilo terminal es altamente similar, estando los últimos 24 residuos de todas las diferentes proteínas HrpE 100% conservados. Solamente se observaron cambios mínimos con dos especies de *Xanthomonas*, en las que un residuo de Asp (D) cambia a uno de Glu (E), conservando de todas formas las características ácidas del residuo. La alta homología en esta región entre pilinas de especies bacterianas con diferentes patovares, es un indicativo de que la misma podría estar conformando el *core* del Pilus Hrp, y que el resto de la secuencia

estaría involucrada en generar la especificidad de cada patovar, y por lo tanto más expuesta (Figura 6.3).

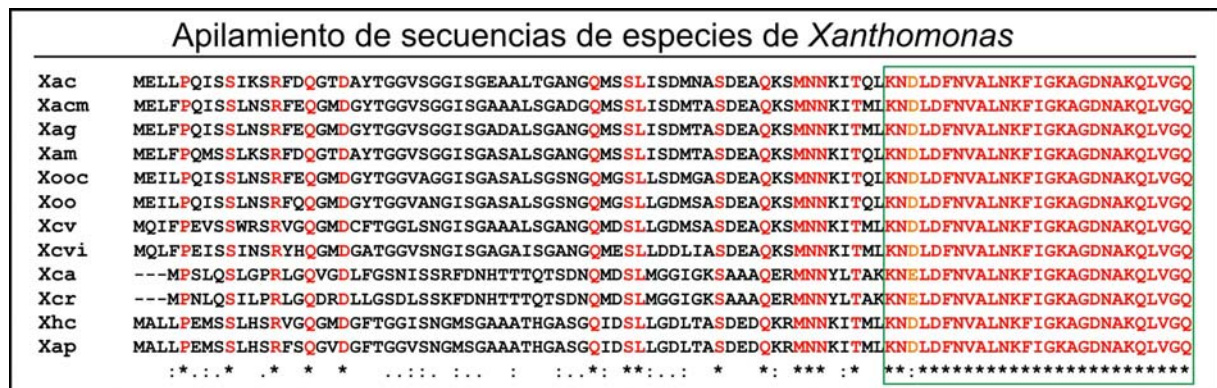


Figura 6.3. Apilamiento de secuencias de proteínas pilinas HrpE pertenecientes a 10 especies del género *Xanthomonas*. Se utilizó la herramienta bioinformática ClustalW. En letras rojas se muestran los residuos idénticos en todas las especies analizadas. Encerrado en el rectángulo verde se muestra la región carboxilo terminal altamente conservada en todas las proteínas HrpE. En letras naranjas se indican los residuos de Glu y Asp conservados en esta región. Xac: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Xacm: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*; Xag: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*; Xam: *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*; Xooc: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; Xoo: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; Xcv: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; Xcvi: *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*; Xca: *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*; Xcr: *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*; Xhc: *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*; Xap: *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*.

Hasta la fecha no existe un modelo cristalográfico que esquematice la estructura espacial de HrpE u otras proteínas pilinas. Por esto, se decidió realizar una predicción de la estructura utilizando programas bioinformáticos disponibles para tal fin. Así, se utilizó la secuencia aminoacídica de HrpE de Xac en programas computacionales como Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/) y PSIPred (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/). Las predicciones realizadas por ambos programas indicaron que HrpE no contiene ningún dominio con estructuras de láminas β . Por el contrario, es altamente rica en dominios hélices α , más aún en la mitad carboxilo terminal donde se predicen, dependiendo del programa computacional utilizado, entre 3 y 4 hélices α desde el residuo Gln41. La región amino terminal sólo mostró poseer 1 o 2 hélices α , aunque estas predicciones fueron controversiales entre los programas bioinformáticos, habiendo diferencias principalmente en los grados de confianza de la predicción. De todas formas, ambos programas indicaron que gran parte de la región amino terminal se predice como desordenada (Figura 6.4). El hecho de que la región carboxilo terminal sea altamente conservada (Figura 6.3), y que la misma presente un estructura secundaria predicha con una confianza de predicción alta, apoya la idea de que esta

región sea la que podría estar conformando el core del Pilus Hrp.

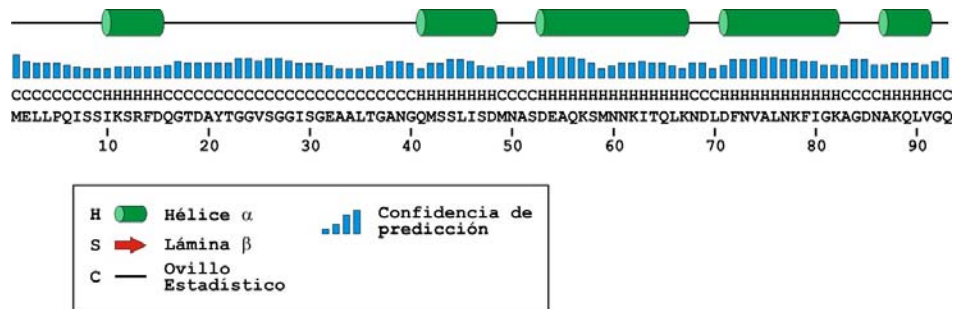


Figura 6.4. Boceto de la estructura secundaria predicha de la proteína HrpE de Xac. Se muestra la secuencia de la proteína en su totalidad. Las predicciones se realizaron utilizando los servidores de predicción de estructura secundaria de proteínas Phyre2 y PSIPred como se detalla en el texto. Se muestran las regiones de la proteína que tienen estructuras de hélices α , y en barras verticales azules el grado de confianza en la predicción, tal como es representado por PSIPred.

6.2. Expresión y purificación de la proteína HrpE de Xac

Como se mencionó anteriormente, en otras especies de bacterias fitopatógenas se ha demostrado que HrpE es la principal proteína componente del Pilus Hrp, una estructura organelar de la que se conoce actualmente en detalle su rol en la secreción de proteínas de patogenidad (Büttner y Bonas, 2002 y 2006). Sin embargo, no existen estudios acerca de otros posibles roles para este pilus, o de sus proteínas componentes (HrpE, HrpF y HrpB2). Por este motivo, en este trabajo de tesis se plantearon diversos objetivos con la intención de analizar y encontrar nuevos posibles roles para HrpE, evaluando los efectos que esta proteína produce en las plantas, tanto hospedadoras como no hospedadoras.

Con la intención de realizar los estudios planteados, se decidió comenzar con el clonado, la expresión, y purificación de la proteína HrpE de Xac. Para ello, a partir de una preparación de ADN genómico de Xac (ver Materiales y Métodos 3.3.2.) se amplificó por PCR el gen *hrpE* utilizando el par de oligonucleótidos cebadores específicos (Tabla 3.4). Posteriormente el producto de amplificación obtenido se clonó entre los sitios de restricción BamHI y HindIII del vector de expresión pET28a (ver Materiales y Métodos 3.4.1.), dando el vector pET28a-*hrpE*, al cual se le verificó el correcto marco de lectura del gen insertado por secuenciación. El vector construido permite expresar la proteína de fusión con una cola de residuos de histidina colocada en el extremo amino terminal, ⁶His-HrpE, y permite la purificación de la misma por cromatografía de afinidad, utilizando columnas que poseen cationes divalentes, como Ni²⁺. Para analizar la expresión, y sabiendo por publicaciones en la bibliografía de la dificultad de lograrlo con este tipo de proteínas, el vector se transformó en una gran variedad de cepas de *E. coli* disponibles en el laboratorio por transformación química, incluyendo BL21 pLysS, BL21 Codon Plus, C41, y las cepas BL21 pLysS conteniendo vectores sobreexpresantes de diversas proteínas chaperonas. Así, para cada cepa transformada se ensayaron diferentes condiciones de expresión de la proteína recombinante, variando la temperatura de inducción, el tiempo de inducción, y la concentración del inductor IPTG (ver Materiales y Métodos 3.4.2.). Lamentablemente no se pudieron encontrar condiciones favorables para la expresión de ⁶His-HrpE. Sólo en el caso de la cepa *E. coli* C41 se logró obtener expresión, pero la misma sólo se pudo observar utilizando *Western blot* revelando con anticuerpos comerciales anti-⁶His, indicando bajos niveles de expresión de la proteína (datos no mostrados).

Frente esta situación, se decidió cambiar la estrategia de obtención de HrpE cambiando por el vector de expresión diseñado y desarrollado en el laboratorio pET32am. Este vector es idéntico al vector comercial pET32a; pero se obtuvo eliminando la región inmunogénica correspondiente al S-tag y el sitio de corte de la proteasa Enteroquinasa (EK), dejando así sólo el sitio de corte para la proteasa Trombina (TR) (Figura 6.5). Como se comentó previamente, la serie de vectores pET32 permite fusionar la proteína deseada a la proteína Tiorredoxina (Trx), la cual promueve la expresión y permite estabilizar la fusión, dando buenos resultados al expresar proteínas inestables. La modificación y uso del nuevo vector se basó en que, por un lado los cortes con la proteasa Enteroquinasa suelen ser muy inespecíficos, lo que conlleva a cortes en otros sitios dentro de la proteína blanco con la posibilidad de perder gran parte de la proteína deseada y, por otro lado, en que el corte con la proteasa Trombina de la proteína de fusión obtenida del vector pET32a (sin modificaciones) genera dos fragmentos proteicos de peso molecular casi idéntico, lo que dificulta las futuras identificaciones.

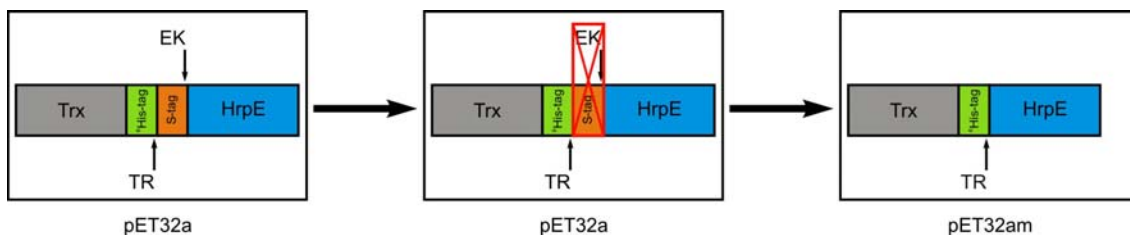


Figura 6.5. Bosquejos en los que se indican la modificación del vector de expresión pET32a, eliminando la región correspondiente al S-tag y el sitio de corte para Enteroquinasa, dejando sólo el sitio para Trombina apenas unos 4 aminoácidos (GlySerGlySer) antes de la Met inicial de HrpE.

Por lo tanto, se clonó el gen *hrpE* utilizando el mismo fragmento amplificado anteriormente entre los sitios BamHI y HindIII dando como resultado el nuevo vector pET32am-*hrpE*, el cual posteriormente, se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 pLysS. Luego se ensayaron diferentes condiciones de expresión para la proteína recombinante, y se determinó que las más favorables se observaron cuando se realizó a 18 °C durante 5 horas con el inductor IPTG a una concentración final de 0,25 mM (ver Materiales y Métodos 3.4.2.). Luego de la interrupción de las células por sonicación, el lisado fue clarificado por centrifugación y la proteína fue purificada utilizando una resina de Ni-NTA Agarosa (ver Materiales y Métodos 3.4.3.). A modo de ejemplo, se muestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al

18% (SDS-PAGE) de una de las purificaciones realizadas, donde se señala la banda correspondiente a la proteína de fusión Trx-⁶His-HrpE de 23,9 kDa de peso molecular teórico (Figura 6.6).

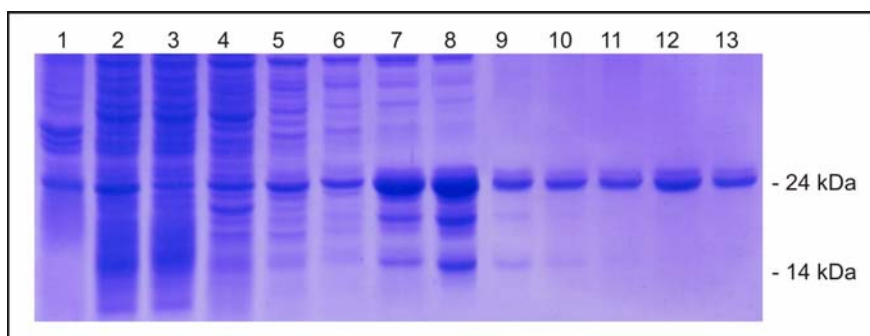


Figura 6.6. Gel de SDS-PAGE al 18% mostrando los pasos de la purificación de Trx-⁶His-HrpE de Xac. Calle 1: Pellet; Calle 2: Sobrenadante; Calle 3: Fracción no unida a resina; Calles 4, 5 y 6: Lavados; Calles 7 a 13: Eluidos.

Una vez obtenida la proteína purificada, y con el objetivo de separar HrpE del resto de la proteína de fusión (Trx-⁶His), se prosiguió a realizar diversas pruebas de corte con la proteasa Trombina en diferentes condiciones variando la composición del *buffer* de corte utilizado, el tiempo y la temperatura de corte, y la relación Proteína:Proteasa, entre otras. A modo de ejemplo se muestra un gel de SDS-PAGE al 16% de tricina en el que se analizó una de las pruebas de corte las pruebas de corte (Figura 6.7 A). En esta figura se puede observar además que la banda correspondiente a los 10,1 kDa (peso molecular esperado para HrpE) no es reconocida por anticuerpos anti-⁶His al realizar el correspondiente *Western blot* del corte (Figura 6.7 A), lo que está confirmando que esa banda corresponde a la proteína de nuestro interés. Los geles de SDS-PAGE de tricina se utilizan comúnmente para separar proteínas en el rango de pesos moleculares bajos, y es el sistema electroforético preferido para la resolución de mezclas de proteínas más pequeñas que los 30 kDa (Schägger, 2006). Una vez logrado el corte de la proteína de fusión, se presentaron inconvenientes al querer separar HrpE de Trx-⁶His, ya que la primera es una proteína muy inestable y se obtiene con un rendimiento muy bajo luego del corte. Se diseñaron diversas estrategias con el objetivo de obtener HrpE pura, que incluyeron la separación mediante el uso de una columna de Ni-NTA agarosa, el corte de la banda del gel de SDS-PAGE de tricina y su posterior electroelución, la separación utilizando una columna de intercambio iónico DEAE-

Celulosa, y el corte de la proteína de fusión una vez que la misma es pegada a la resina de Ni-NTA agarosa. De todas las estrategias planteadas y llevadas a cabo sólo el corte en resina permitió obtener HrpE pura, aunque el rendimiento para la obtención de la misma tomando en cuenta todos los pasos a seguir en este proceso fue mucho menor que el esperado (Figura 6.7 B), lo que se puede observar al analizar la banda que evidencia la cantidad de proteína de fusión inicial (Figura 6.7 B, Calle 1) y la banda de HrpE pura (Figura 6.7 B, Calle 3).

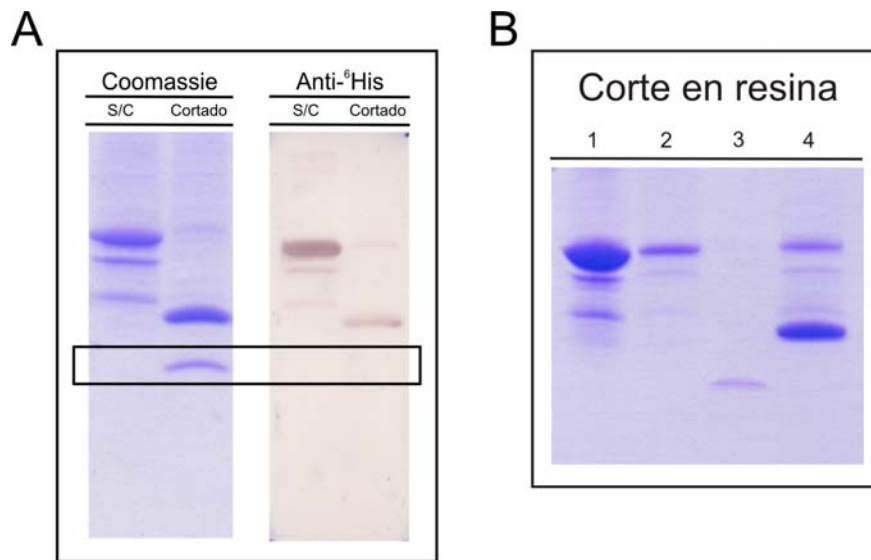


Figura 6.7. (A) Gel de SDS-PAGE al 16% de tricina donde se sembraron las pruebas de corte de ⁶His-Trx-HrpE con Trombina. Se puede observar la banda correspondiente a HrpE a la altura de los 10,1 kDa. Se muestra además el ensayo de *Western blot* con anticuerpos anti-⁶His. S/C: Proteína de fusión sin cortar; Cortado: Proteína de fusión cortada. **(B)** Gel de SDS-PAGE al 16% de tricina donde se muestra el proceso realizado para la obtención de HrpE pura a través del corte de la proteína de fusión en resina Ni-NTA agarosa. Calle 1: Proteína de fusión sin cortar, Calle 2: Fracción que no se unió a la resina, Calle 3: Fracción eluída por el corte, Calle 4: Fracción que quedó unida a la resina.

El hecho de tener tan bajo rendimiento al intentar obtener HrpE pura hizo que todos los experimentos ensayados posteriormente con esta proteína se realizaran utilizando la proteína de fusión Trx-⁶His-HrpE, lo que por su parte obligó a incluir los controles apropiados para cada caso.

De todas formas, el protocolo desarrollado para la obtención de la proteína HrpE de Xac pura, el cual se encuentra detallado en la Figura 6.8, permitió producir una cantidad suficiente de esta proteína con una buena pureza para la obtención de anticuerpos policlonales (Sección 6.6.).

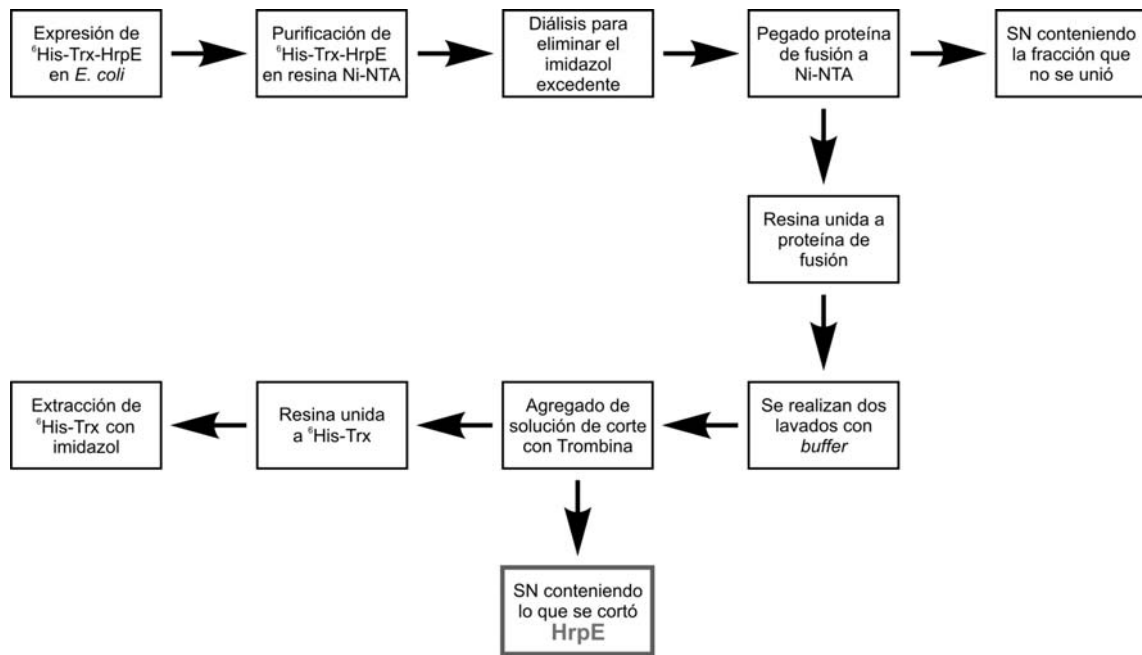


Figura 6.8. Resumen del protocolo desarrollado para la obtención de la proteína HrpE pura, a partir de la expresión de la proteína recombinante Trx-⁶His-HrpE en *E. coli*.

6.3. Caracterización del efecto de HrpE de Xac en plantas no hospedadoras y hospedadoras

6.3.1. Determinación del efecto de HrpE de Xac en plantas no hospedadoras y hospedadoras

Con la proteína HrpE purificada (Trx-⁶His-HrpE) se realizaron ensayos con la intención de caracterizar el efecto que produce la misma en las plantas, infiltrando hojas de diversas especies de plantas no hospedadoras (ver Materiales y Métodos 3.9.1.). Así, la infiltración de la proteína pura se hizo en hojas de pimiento, tomate y tabaco, entre las concentraciones 0,5 μM y 5 o 10 μM , lo que permitió determinar la sensibilidad de cada especie. Luego de 1 día de infiltración las hojas mostraron la lesiones típicas de HR a partir de los 2,5 μM en pimiento y tomate, y 5 μM en tabaco (Figura 6.9). Para cada caso se realizó el control de infiltración utilizando el *buffer* en el que estaba contenida HrpE. Por lo analizado y enunciado en capítulos anteriores de esta tesis, la proteína Tiorredoxina (Trx-⁶His) no genera ningún tipo de lesión en las hojas de las especies de plantas evaluadas, lo que asegura que el efecto observado con Trx-⁶His-HrpE es específico de la pilina Hrp.

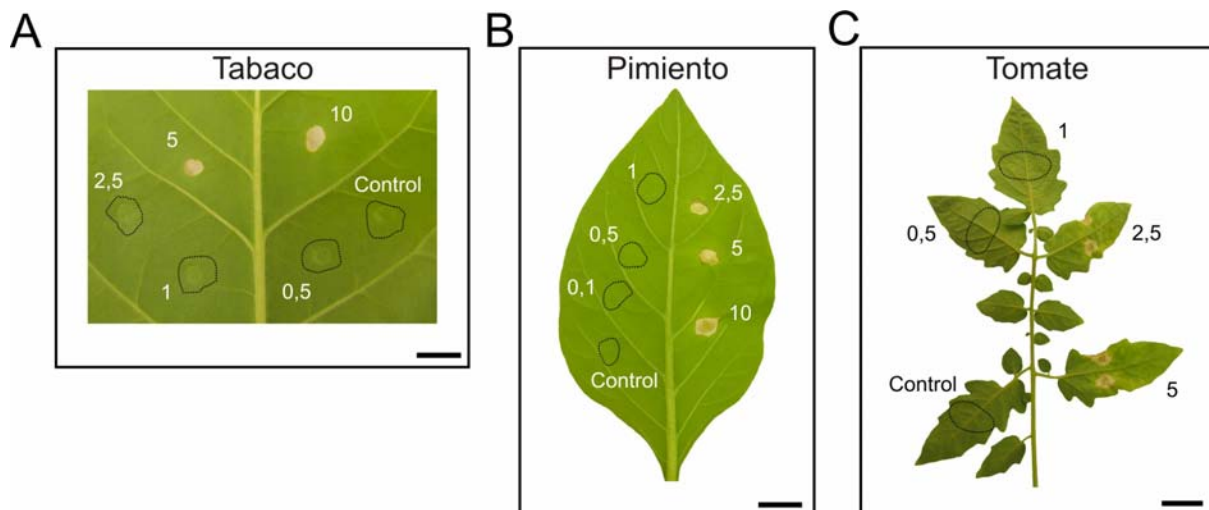


Figura 6.9. Efectos de HrpE analizados en plantas no hospedadoras. **(A)** HrpE desarrolla HR en hojas de tabaco. La hoja de tabaco se infiltró con Trx-⁶His-HrpE en las concentraciones indicadas (en μM) utilizando como *buffer* Tris 50 mM pH 8. **(B)** HrpE desarrolla HR en hojas de plantas de pimiento en las concentraciones indicadas (en μM). **(C)** HrpE causa HR en hojas de tomate a las concentraciones detalladas (en μM). En todos los casos evaluados el control utilizado fue *buffer* Tris 50 mM pH 8. Las fotografías fueron tomadas 1 día después de la inoculación. Las barras inferiores indican 1 cm, en cada caso.

Una vez analizadas estas especies de plantas no hospedadoras, se decidió evaluar si HrpE también podría provocar una HR en hojas de plantas hospedadoras (naranja). De esta forma, Trx-⁶His-HrpE pura se infiltró en hojas de cítricos a distintas concentraciones, observándose luego de los 7 días de infiltración una reacción de clorosis en las zonas infiltradas (Figura 6.10). Esta clorosis se evidenció a partir de una concentración 0,5 μM de proteína. La clorosis es una condición fisiológica anormal en la que el follaje produce insuficiente clorofila. Cuando esto ocurre, las hojas no tienen la coloración normal verde; por el contrario la coloración es de un verde pálido, amarillo, o hasta amarillo blanquecino. Este resultado indicó que en plantas de cítricos HrpE también está involucrada en el desencadenamiento de una respuesta por parte de la planta, aunque contrariamente a lo sucedido en plantas no hospedadoras, en este caso no se observó muerte celular visible.

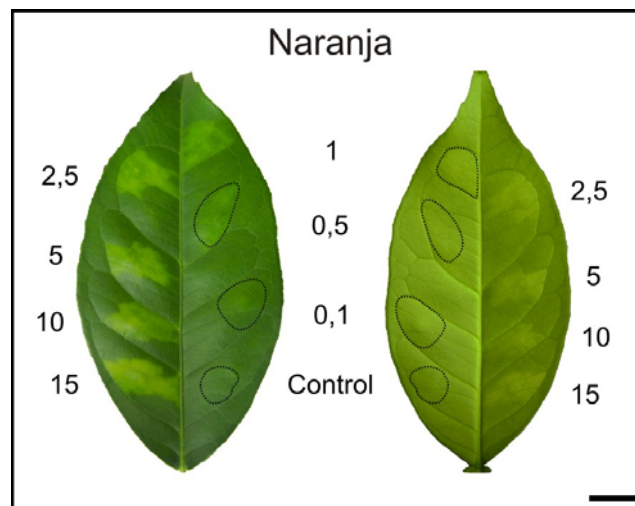


Figura 6.10. Análisis del efecto de HrpE en hojas de cítricos. Se infiltraron hojas de *C. sinensis* con Trx-⁶His-HrpE a las concentraciones indicadas (en μM) en Tris 50 mM pH 8. Como control se utilizó el mismo *buffer* Tris 50 mM pH 8. Se observa un efecto de clorosis (pérdida de color verde) en las zonas de la hoja infiltradas a partir de los 0,5 μM de proteína. Las fotografías fueron tomadas 7 días después de la inoculación. La barra inferior indica 1 cm.

6.3.2. Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno

Como se enunció anteriormente, una característica temprana de la HR es la generación rápida de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lamb y Dixon, 1997). Por ello se decidió realizar tinciones con el colorante DAB, que se oxida en presencia de H_2O_2 formando coloraciones marrones (ver Materiales y Métodos 3.12.2.). El ensayo se realizó utilizando hojas de plantas de tabaco, usada como modelo de plantas no hospedadoras, debido a la facilidad en el manejo y en la observación. La proteína Trx-⁶His-HrpE fue entonces infiltrada en hojas de plantas de tabaco a una concentración 5 μ M. Al mismo tiempo se realizaron los controles necesarios para validar el ensayo, los que incluyeron la infiltración con *buffer* y con la proteína Trx-⁶His como controles negativos, y con la bacteria Xac tipo salvaje como control positivo de HR. Luego de 4 horas de infiltración se colectaron las hojas y se realizó la tinción. Se detectaron coloraciones marrones en el tejido de tabaco tratado con HrpE; indicando que la misma induce la producción de H_2O_2 en la planta. Estas coloraciones se observaron principalmente en los vasos y en las nervaduras cercanas a la zona infiltrada (Figura 6.11). Para una mejor observación de las tinciones, se tomaron fotografías utilizando un microscopio óptico y un objetivo de aumento de 4X.

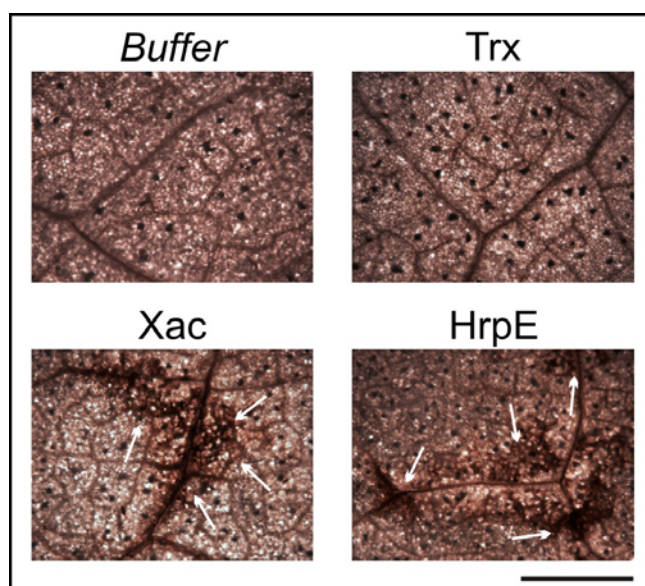


Figura 6.11. Tinciones con DAB para evidenciar la producción de H_2O_2 en tabaco tratado con HrpE. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados. Los controles negativos realizados para este ensayo fueron *Buffer* (Tris 50 mM pH 8) y *Trx* (Trx-⁶His a una concentración 5 μ M en Tris 50 mM pH 8). El control positivo de HR realizado fue infiltrando con Xac (*X. axonopodis* pv *citri*, suspensión a 10^8 UFC/ml). Las coloraciones marrones indicadas con flechas blancas son indicativas de la presencia de H_2O_2 en hojas tratadas con Xac y HrpE. Estas coloraciones no se observaron en los controles negativos, tal como era esperado. La barra inferior indica 1 mm.

Por otra parte, el ensayo de tinción con DAB también se realizó en hojas de plantas de naranja con la intención de observar producción de ROS (H_2O_2) al enfrentarlas a HrpE (ver Materiales y Métodos 3.12.2.). Para ello, Trx-⁶His-HrpE fue infiltrada en hojas de plantas de naranja a una concentración 5 μ M. Como controles negativos se realizó la infiltración con *buffer* y con la proteína Trx-⁶His y, en este caso, se utilizó la bacteria Xcv como control positivo de HR. Luego de 8 horas de infiltración se colectaron las hojas y se realizó la tinción correspondiente. Así, se detectaron coloraciones marrones en las zonas tratadas con HrpE y con el control positivo, no siendo así con los controles negativos. Estas coloraciones se lograron observar a simple vista en las cercanías de la zona infiltrada. Para una mejor observación de las tinciones, además se tomaron fotografías de cada tratamiento realizado utilizando un microscopio óptico y un objetivo de aumento de 4X (Figura 6.12).

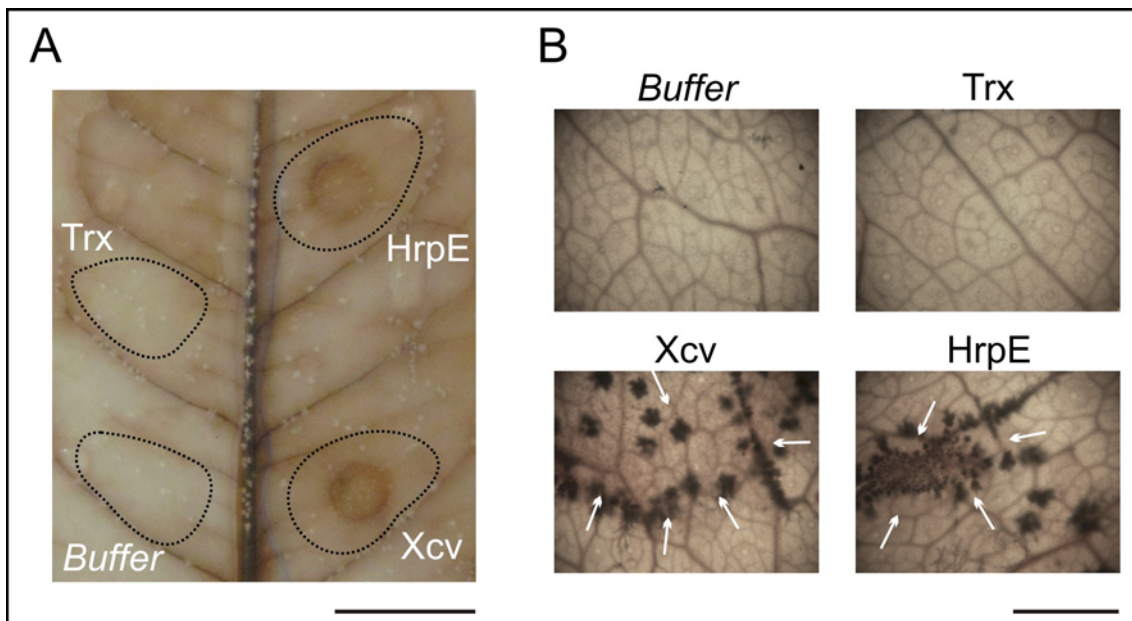


Figura 6.12. Tinciones con DAB para evidenciar la producción de H_2O_2 en naranja tratada con HrpE. **(A)** Fotografía de una hoja representativa del ensayo de tinción con DAB. Se indican las zonas donde se infiltraron las muestras con líneas de puntos. Se puede observar la coloración marrón característica de este colorante en las zonas donde se trataron las hojas con HrpE y Xcv. Los controles negativos utilizados fueron *Buffer* (Tris 50 mM pH 8) y Trx (Trx-⁶His a una concentración 5 μ M en Tris 50 mM pH 8). El control positivo realizado fue infiltrando con Xcv (*X. campestris* pv *vesicatoria* (suspensión a 10^8 UFC/ml). **(B)** Microfotografías realizadas con un microscopio óptico y un aumento 4X para evidenciar mejor las tinciones observadas en **(A)**. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados. Se indican con flechas blancas los depósitos de colorante formados en los casos positivos para la tinción, HrpE y Xcv. La barra inferior en **(A)** indica 1 cm y en **(B)** 1 mm.

6.3.3. Análisis de la deposición de calosa

Una de las respuestas que forman parte de la defensa innata de las plantas es la producción de depósitos de calosa, lignina y otros compuestos que fortifican la pared celular (Ligterink *et al.*, 1997). A fin de analizar los niveles de deposición de calosa en tejidos de plantas, tanto no hospedadoras como hospedadoras, infiltrados con la proteína HrpE, se realizó una tinción con el colorante Azul de Anilina, el cual produce fluorescencia al estar unido al polisacárido cuando es excitado con luz UV (ver Materiales y Métodos 3.12.3.). Así, el ensayo de tinción se realizó utilizando hojas de plantas de pimiento, tabaco y tomate como modelos de plantas no hospedadoras, y con hojas de naranja como hospedadora. Se infiltró Trx-⁶His-HrpE a una concentración 5 μ M. Además se realizaron los controles necesarios para validar el ensayo. Como controles negativos se realizó la infiltración con *buffer* y con la proteína Trx-⁶His a una concentración 5 μ M y, según el caso de cada tipo de planta, se utilizó la bacteria Xac o Xcv, suspendida a 10⁸ UFC/ml como control positivo. Luego de 8 horas de infiltración se colectaron las hojas y se realizó la tinción correspondiente.

En todas las especies de plantas evaluadas, los depósitos de calosa se observaron sólo con los tratamientos realizados con HrpE y con los respectivos controles positivos, no observándose en los tratamientos con la proteína Trx-⁶His a una concentración 5 μ M o con *buffer*. En los casos de plantas no hospedadoras, los depósitos se encontraron mayoritariamente ubicados contorneando las paredes celulares vegetales; hecho que en el caso de naranja no fue del mismo modo, observándose solamente depósitos aislados (Figura 6.13). Además, se cuantificaron los depósitos de calosa midiendo la fluorescencia en las imágenes obtenidas tomando en cuenta al menos 30 fotos de diferentes campos dentro de la zona analizada, y cuantificándose el porcentaje de *pixels* coloreados, tomados a partir de una intensidad determinada, sobre el total de *pixels* que conforman la foto (Luna *et al.*, 2011). La intensidad de fluorescencia utilizada fue la obtenida como promedio de la encontrada en los controles negativos para cada caso. De esta forma, se logró graficar cuánto mayor fue la deposición de calosa en los distintos tratamientos, con respecto a sus respectivos controles negativos (Figura 6.13). En conjunto estos resultados estarían indicando que la proteína HrpE es reconocida por las plantas e induce la deposición de calosa, generando una respuesta inmune basal mucho más

fuerte en los casos de plantas no hospedadoras con respecto al caso de plantas hospedadoras.

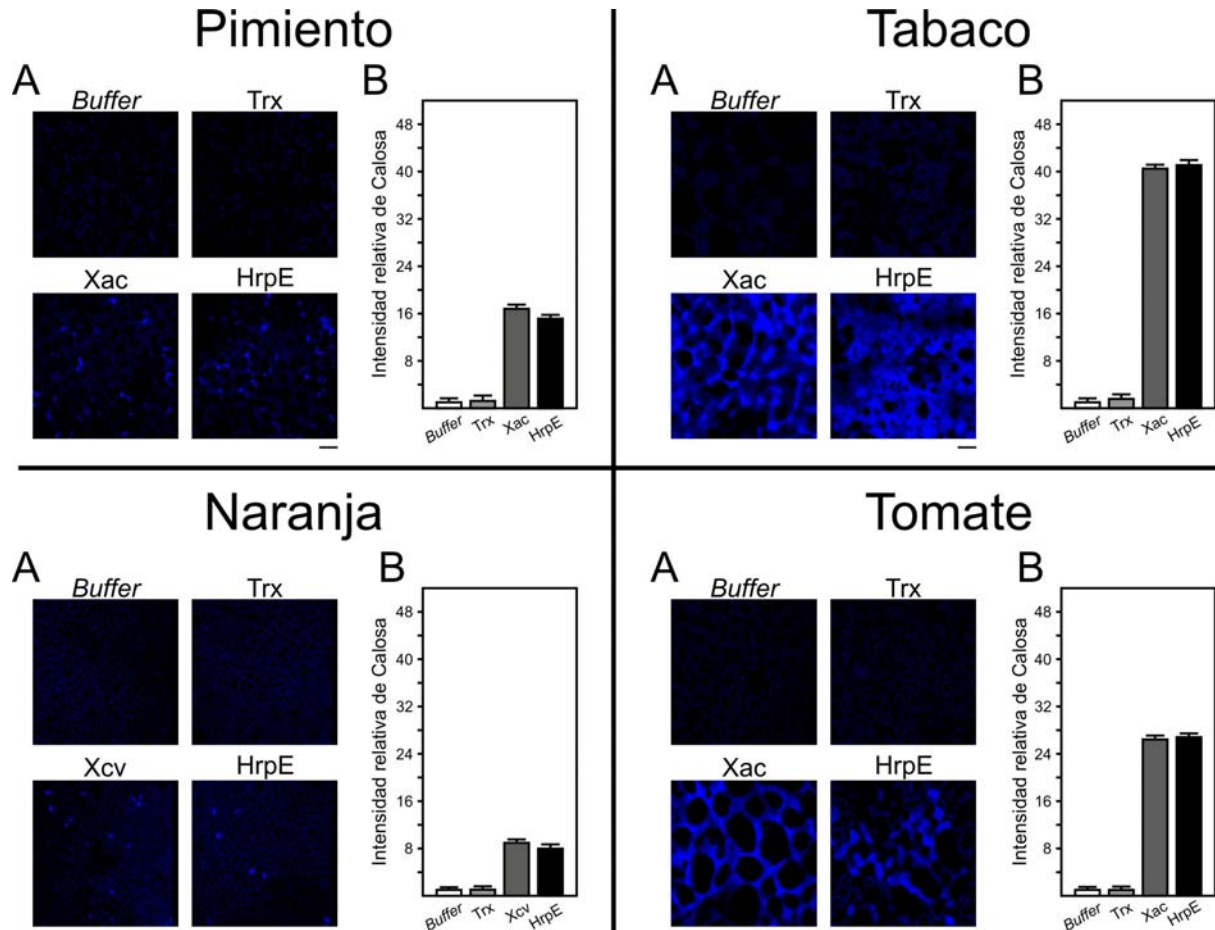


Figura 6.13. Tinción con Azul de Anilina para detectar depósitos de calosa generados en respuesta a HrpE en pimiento, tabaco, tomate y naranja. **(A)** Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados. Se observa la deposición de calosa como fluorescencia de color azul en las paredes de las células vegetales en los tratamientos realizados con Trx-⁶His-HrpE y los controles positivos para cada especie de planta no hospedadora, y en forma de depósitos aislados para el caso de naranja. En todos estos casos las muestras se tomaron y analizaron 8 horas luego de la infiltración. **(B)** Para cada caso analizado, también se graficó el porcentaje de depósitos de calosa sobre la superficie total de cada foto. Las barras representan el promedio obtenido tomando en cuenta al menos 30 campos representativos de cada tratamiento obtenidos a partir de 3 ensayos independientes, normalizados con respecto al tratamiento con *buffer*. Las barras de error indican las desviaciones estándar en el caso del tratamiento control, y el error propagado en los casos de los tratamientos deseados. Las barras inferiores representan 20 μ m.

6.4. Análisis de la expresión transcripcional de genes involucrados en respuestas de defensa de plantas en presencia de HrpE

En estudios previos se observó que muchas moléculas que actúan como PAMPs producen la inducción de la expresión de ciertos genes involucrados en respuestas de defensa en las plantas. Estos genes pertenecen a un amplio rango de grupos funcionales, incluyendo receptores del tipo quinasa, factores de transcripción y genes involucrados en los mecanismos de recambio proteico (Navarro *et al.*, 2004). En tomate se han optimizado los genes indicadores para PTI a través de diversos estudios. Los genes estudiados fueron o bien homólogos de los genes de *Arabidopsis* ya conocidos que están inducidos por PAMP, o genes de tomate conocidos por ser inducidos en respuesta a patógenos virulentos o no virulentos (Mayrose *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2010). Entre los genes para los cuales se observaron los mayores niveles de inducción en respuesta a la infiltración con la bacteria no patogénica *Pseudomonas fluorescens* se encuentran *SILrr22*, *SIPti5* y *SIGras2*, siendo la expresión de los mismos aproximadamente 5, 16 y 7 veces mayor que en plantas no inoculadas, respectivamente (Nguyen *et al.*, 2010). El gen *SIWrky28* también se indujo significativamente en experimentos similares (Kim *et al.*, 2009).

El gen *SIPti5* codifica para un factor de transcripción de la familia de factores de respuesta a etileno (Zhou *et al.*, 1997); *SIGras2* codifica para un factor de transcripción relacionado al estrés tanto biótico como abiótico (Mayrose *et al.*, 2006); *SIWrky28* codifica para un homólogo de tomate del factor de transcripción WRKY28 de *Arabidopsis* (Navarro *et al.*, 2004); y *SILrr22* codifica para un homólogo de tomate similar al receptor de quinasa LRR22 de *Arabidopsis* (Navarro *et al.*, 2004).

Por esto, y a fin de corroborar si HrpE de Xac induce una respuesta de defensa en plantas no hospedadoras, se decidió analizar la expresión de estos genes mediante qRT-PCR en hojas de plantas de tomate infiltradas con Trx-⁶His-HrpE a una concentración 5 μ M. La expresión de estos genes se analizó a dos tiempos post infiltración, 1 hora y 4 horas. Ambos tiempos son relativamente cortos con respecto al mecanismo de defensa de la planta, lo que permite observar el inicio del proceso. Se realizaron los respectivos controles para validar el ensayo, los que incluyeron los tratamientos con *buffer* y Trx-⁶His (5 μ M) como controles negativos, y con Xac (suspensión a 10⁸ UFC/ml) como control positivo de la inducción de los genes de defensa. Una vez infiltradas las hojas, a cada tiempo se realizó la

extracción del ARN total de las mismas (ver Materiales y Métodos 3.14.1.), seguida de una retrotranscripción (ver Materiales y Métodos 3.14.4.). La reacción de PCR cuantitativa (ver Materiales y Métodos 3.14.6.) se realizó utilizando los oligonucleótidos cebadores específicos diseñados para amplificar fragmentos de 200 pb de los genes de interés (Tabla 3.4). Como control interno de expresión constitutiva y normalización se amplificaron 200 pb del gen *SIRp12*, el cual codifica para una proteína ribosomal y es ampliamente utilizado para tal fin (Løvdaal y Lillo, 2009; Dekkers *et al.*, 2012).

En cada caso, los resultados obtenidos de la expresión para cada gen fueron relativizados con respecto al tratamiento control realizado con *buffer*. Se observó que, luego de 1 hora post infiltración el único gen cuya expresión se vio aumentada en respuesta tanto a Xac como HrpE fue *SIPti5* (Figura 6.14 B). Sin embargo, luego de 4 horas post infiltración se observó un aumento en la expresión de todos los genes analizados (*SILrr22*, *SIPti5*, *SIGras2* y *SIWrky28*) en respuesta a estos tratamientos (Figura 6.14 A). El aumento de la expresión de los genes en el tratamiento con HrpE se observó en los mismos tiempos, aunque con diferente intensidad, que con el tratamiento realizado con Xac, lo que estaría sugiriendo que esta proteína induce una respuesta similar a la HR desencadenada por la bacteria en estas plantas no hospedadoras. Llamativamente, en todos los casos excepto para *SIPti5*, el tratamiento con HrpE elevó los genes a valores similares a los del tratamiento con Xac; en el caso del gen *SIPti5* los valores obtenidos con HrpE fueron menores que con Xac, sugiriendo que la inducción de este gen podría estar dependiendo de otros factores aportados por la bacteria. Se puede decir entonces que la inducción del gen *SIPti5* es más temprana que la inducción de los otros genes indicadores de PTI analizados, y que el mismo es probablemente inducido por diversos factores aportados por las células bacterianas de Xac, incluyendo a su pilina HrpE.

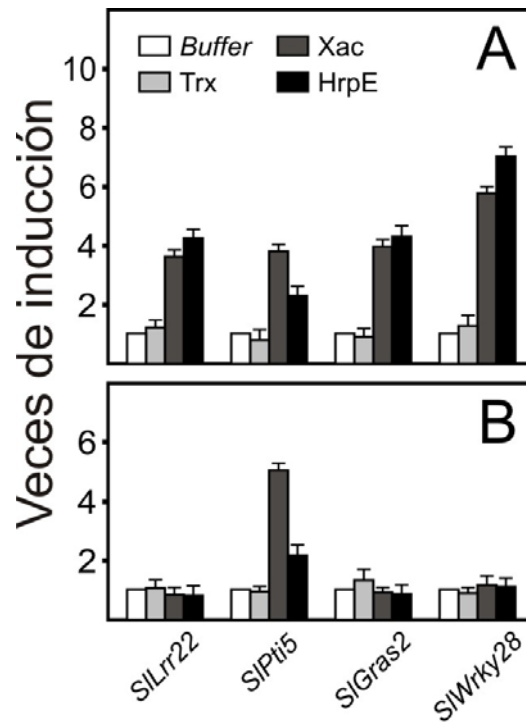


Figura 6.14. Análisis de la expresión de los genes *SILrr22*, *SIPTi5*, *SIGras2*, y *SIWrky28* en hojas de tomate infiltradas con *Buffer* (Tris 50 mM pH 8), *Trx* ($\text{Trx}^{-6}\text{His}$ 5 μM), *Xac* (*X. axonopodis* pv. *citri* 10^8 UFC/ml), y *HrpE* ($\text{Trx}^{-6}\text{His-HrpE}$ 5 μM), realizado 1 hora post infiltración (**B**) y 4 horas post infiltración (**A**). Se observan graficados los valores relativos de inducción de cada uno de los genes respecto al gen control (*SIRp2*), y respecto al tratamiento control (*Buffer*), para cada tratamiento. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

Con el objetivo de determinar si *HrpE* está implicada en la modulación de las respuestas de resistencia de las plantas hospedadoras, se realizó un análisis de expresión de genes por qRT-PCR. Se estudiaron los genes *CsMAPK3*, *CsMKK4*, *CsGST*, *CsMSOD*, *CsPrxA*, *CsPR1*, *CsPR4*, *CsHMGR* y *CsPAL*; todos ellos conocidos por su relación con la inmunidad innata, el estrés oxidativo y las respuestas de defensa en plantas (Asai *et al.*, 2002; Garavaglia *et al.*, 2010; Datta y Muthukrishnan, 1999).

Los genes *CsMAPK3* y *CsMKK4* codifican para proteína quinasas componentes de la cascada de quinasas de la respuesta basal de plantas (Asai *et al.*, 2002). Los genes *CsGST*, *CsMSOD*, y *CsPrxA* codifican para las proteínas Glutación-S-Transferasa (GST), Superóxido Dismutasa de Manganeso (MSOD) y Peroxirredoxina (PrxA), respectivamente, siendo todos ellos marcadores de estrés oxidativo (Tausz *et al.*, 2004; Overmyer *et al.*, 2003; Garavaglia *et al.*, 2010). Los genes *CsPR1* y *CsPR4*, codifican para las proteínas relacionadas a la patogénesis pertenecientes a las familias 1 (PR1) y 4 (PR4), respectivamente (van Loon *et al.*, 2006; Mitsuhashi *et al.*, 2008; Datta y Muthukrishnan, 1999). Los genes *CsHMGR* y *CsPAL* codifican para enzimas relacionadas con la formación de metabolitos

secundarios 3-Hidroxi-Metilglutaril CoA Reductasa (HMGR), Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) (Yang *et al.*, 1991; Keith *et al.*, 1991).

Así, se analizó la expresión de estos genes mediante qRT-PCR en hojas de plantas de naranja infiltradas con Trx-⁶His-HrpE a una concentración 5 μ M. La expresión de los genes se analizó a dos tiempos post infiltración, 8 hora y 16 horas. Ambos tiempos son relativamente cortos con respecto al mecanismo de defensa en plantas de naranja, lo que permite observar el inicio del proceso. Los controles realizados incluyeron los tratamientos con *buffer* y Trx-⁶His (5 μ M) como controles negativos, y con Xcv (suspensión a 10⁸ UFC/ml) como control positivo. Luego de infiltradas las hojas, a cada tiempo se realizó la extracción del ARN total de las mismas, seguida de una retrotranscripción (ver Materiales y Métodos 3.14.1. y 3.14.4.). La cuantificación de la expresión de los genes de interés (ver Materiales y Métodos 3.14.6.) se realizó utilizando oligonucleótidos cebadores específicos diseñados para amplificar fragmentos de 200 pb de los mismos (Tabla 3.4). Se utilizó un fragmento de 200 pb del gen *CsAct*, el cual codifica para la proteína Actina, como control interno de expresión constitutiva y normalización (Garavaglia *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos indicaron que luego del tratamiento realizado por 8 horas ninguno de los genes analizados sufrió modificaciones en su expresión, con la única excepción del gen *CsPR1* para el tratamiento con Xcv, el cual tuvo un aumento pequeño pero significativamente considerable (Figura 6.15 B). Los resultados obtenidos al realizar las mediciones luego del tratamiento por 16 horas, indicaron que la expresión de todos los genes analizados se encuentra aumentada para los tratamientos realizados con HrpE y Xcv (Figura 6.15 A), excepto *CsPrxA* que sólo aumentó con Xcv, con respecto al tratamiento control realizado con *buffer*. De esta forma, el aumento de la expresión con el tratamiento con HrpE se observó junto con, aunque en diferente intensidad, el tratamiento realizado con Xcv en casi todos los genes analizados. En los casos particulares de los genes *CsMAPK3*, *CsMKK4*, *CsGST*, *CsPR1* y *CsHMGR* la expresión de los mismos fue mayor para el caso de Xcv; aunque para los genes *CsMSOD* y *CsPR4*, los valores de inducción fueron mayores en los tratamientos con HrpE. Por otra parte los valores obtenidos para el gen *CsPAL* fueron muy similares para ambos tratamientos.

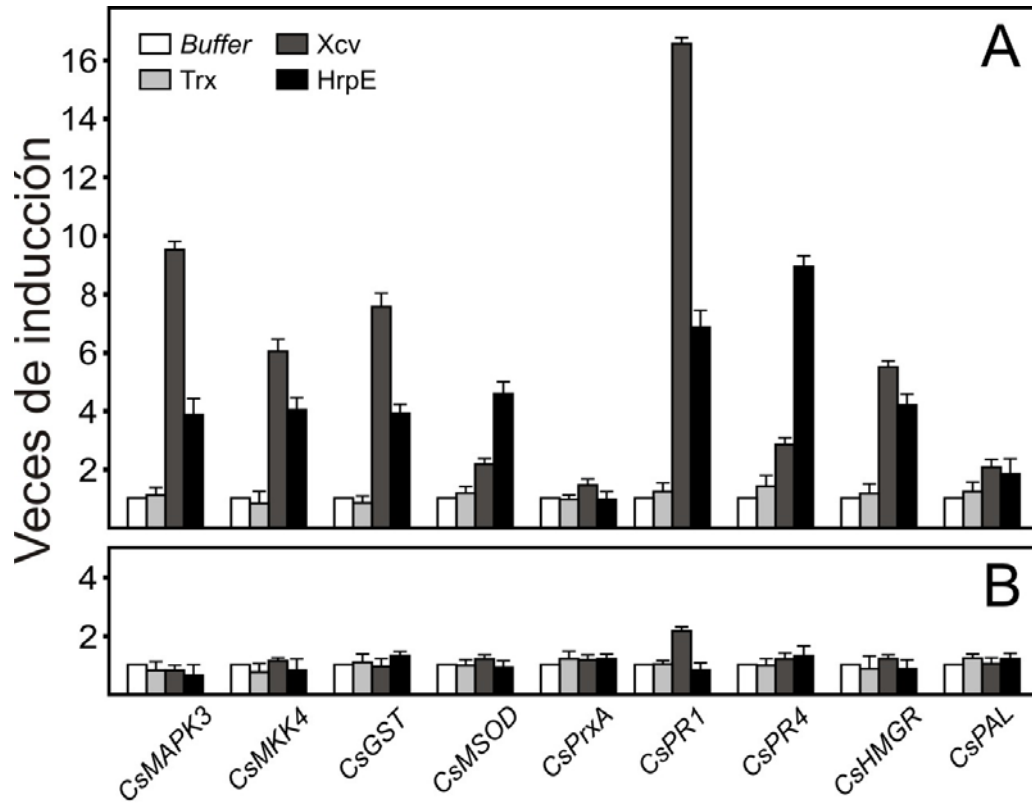


Figura 6.15. Análisis de la expresión de los genes *MAPK3*, *MKK4*, *GST*, *HMGR*, *PR1*, *PR4*, *MSOD*, *PrxAI*, y *PAL* en hojas de naranja infiltradas con *Buffer* (Tris 50 mM pH 8), *Trx* ($\text{Trx}^{\text{-6His}}$ 5 μM), *Xcv* (*X. campestris* pv. *vesicatoria* 10^8 UFC/ml), y *HrpE* ($\text{Trx}^{\text{-6His-HrpE}}$ 5 μM), realizado 8 horas post infiltración (**B**) y 16 horas post infiltración (**A**). Se observan graficados los valores relativos de inducción de cada uno de los genes respecto al gen control (*CsAct*), y respecto al tratamiento control (*Buffer*), para cada tratamiento. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

6.5. HrpE induce *priming* en plantas hospedadoras y no hospedadoras

El tratamiento previo con PAMPs tales como flg22, elf18 y Lipopolisacárido (LPS) en *Arabidopsis* induce una respuesta PTI, lo que efectivamente restringe el crecimiento de bacterias patógenas inoculadas posteriormente (Kunze *et al.*, 2004; Mishina y Zeier, 2007; Newman *et al.*, 2002). Lo mismo fue observado en planta de tomate al ser analizadas las PAMPs flg22 y PGN (Nguyen *et al.*, 2010). Como se enunció previamente, esta resistencia inducida (*priming*) se asocia a menudo con una mayor capacidad para movilizar las respuestas de defensa celular inducidas por una infección, y una reducción en el *priming* ha sido correlacionada con una falta de resistencia a patógenos bacterianos no virulentos en tabaco (Conrath *et al.*, 2002).

De acuerdo a esto, se decidió analizar si la infiltración previa de HrpE en hojas de naranja produce inmunidad a posteriores inoculaciones con Xac (ver Materiales y Métodos 3.10.1.). Así, se infiltró la proteína Trx⁶His-HrpE (a una concentración 5 μ M) y, luego de 8 horas, se infiltró la misma zona del tejido con la cepa Xac tipo salvaje (suspensión a 10⁶ UFC/ml). Para validar el ensayo de *priming*, se realizaron infiltraciones previas con *buffer* como control negativo y, como control positivo, con la cepa mutante en el SST3, XachrpB⁻ (Dunger *et al.*, 2005) (suspensión a 10⁹ UFC/ml). El uso de cepas no patogénicas para la inducción de la respuesta PTI característica del *priming* es ampliamente utilizada (Chakravarthy *et al.*, 2009). Como último control, se realizaron infiltraciones con Xac sin infiltrar previamente ninguna sustancia en el tejido de la hoja; de esta manera se tuvo en cuenta que el efecto de *priming* no se vea asociado a la manipulación realizada sobre la hoja. Así, a los 21 días post infiltración se observó que en las zonas previamente tratadas con HrpE, Xac creció menos que en el caso de los controles de omisión de tratamiento (sin infiltrar) y previa infiltración del tejido con *buffer*, en los cuales no se observó disminución del crecimiento bacteriano y la infección se desarrolló con normalidad (Figura 6.16 A). Estos resultados sugieren que la infiltración previa de HrpE despertaría una respuesta de resistencia en la planta, la que produciría el efecto de *priming*. Un tratamiento realizado infiltrando el tejido previamente con la proteína Trx⁶His, dio como resultado las mismas observaciones obtenidas en los casos controles de omisión de tratamiento e infiltración con *buffer*, indicando que el efecto obtenido con HrpE es propio de esta pilina Hrp (datos no mostrados). Para comprobar lo observado, se cuantificó también el crecimiento bacteriano en cada una de estas condiciones durante los primeros 7 días post

infiltración. Para ello, se tomaron a los 0, 3 y 7 días, discos de las zonas tratadas previamente e infiltradas posteriormente con Xac. Estos discos se disgregaron con la ayuda de un *tip* en un volumen de *buffer* de resuspensión, se realizaron las diluciones necesarias, las cuales se plaquearon para el conteo de colonias (ver Materiales y Métodos 3.11.). Tal como se esperaba, se observó que Xac creció menos en las zonas previamente tratadas con HrpE o con XachrpB⁻, mientras que el tratamiento control con *buffer* no tuvo diferencias respecto a lo observado sin infiltrar ninguna sustancia (Figura 6.16 B).

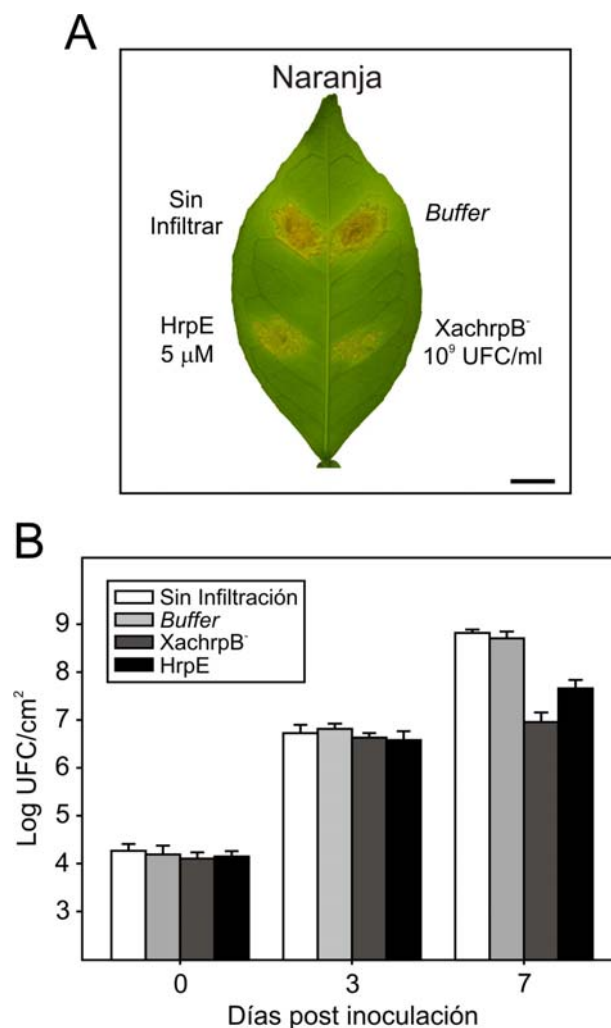


Figura 6.16. El tratamiento previo de hojas de naranja con HrpE afecta el crecimiento bacteriano de posteriores inoculaciones. **(A)** Se muestra una foto representativa de una hoja de naranja tratada y los efectos desarrollados en las diferentes condiciones. Como control se realizó la infiltración previa con *buffer* (Tris 50 mM pH 8); otros controles incluyeron la omisión de tratamiento (Sin Infiltrar), y la infiltración de la cepa mutante del SST3 XachrpB⁻ (suspensión a 10⁹ UFC/ml). Se observa así el efecto *priming* de la proteína HrpE. Las leyendas indican el tratamiento previo que recibieron las hojas. Las fotos fueron sacadas 21 días post infiltración de la cepa patógena. **(B)** Cuantificación de las bacterias a lo largo del tiempo. Las barras indican la media de 3 ensayos independientes, y las barras de error las desviaciones estándar para cada caso. La barra inferior en **(A)** representa 1 cm.

Por otra parte, se decidió analizar si la infiltración previa de HrpE en hojas de plantas no hospedadoras también produce inmunidad a posteriores inoculaciones con sus patógenos (ver Materiales y Métodos 3.10.2.). Este ensayo de *priming* se realizó utilizando dos modelos de plantas no hospedadoras para Xac, tomate y pimiento, con su respectivo patógeno *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), el cual produce la enfermedad Mancha o Sarna Bacteriana, en ambas especies de plantas.

La proteína Trx-⁶His-HrpE (a las concentraciones 1 y 5 μ M) se inoculó por *spray* realizándose 3 dosificaciones de proteína dejando pasar 2 días entre cada una y, luego de los 6 días de la primer inoculación por *spray*, se infiltraron las mismas hojas con la cepa Xcv tipo salvaje (suspensión a 10^7 UFC/ml). Para validar el ensayo de *priming*, se realizaron inoculaciones previas con *buffer* como control negativo, y con la cepa mutante en el SST3, XachrpB⁻ (suspensión a 10^9 UFC/ml). El hecho de utilizar dos concentraciones para la proteína pilina se debió a que, como se comentó previamente en este capítulo de tesis, HrpE desarrolla HR a partir de la concentración 2,5 μ M de proteína; de este modo, se analizó si se producía *priming* a concentraciones inferiores y superiores a la necesaria para observar HR con muerte celular. La inoculación por *spray* se debió a la necesidad de utilizar un protocolo de inoculación que no sea agresivo, ya que los tejidos foliares de estas especies de plantas no soportan una manipulación repetitiva e invasiva (Li *et al.*, 2013). De esta forma, el protocolo de *priming* se llevó a cabo en ambas especies de plantas, con la diferencia de que en pimiento se logró utilizar una misma hoja para las pruebas infectivas, mientras que en tomate se debieron utilizar distintas hojas tratadas. Así, a los 4 días post infiltración se observó que en las zonas previamente tratadas con HrpE, Xcv creció menos que en ausencia de la proteína (tratamiento con *buffer*), indicando que también en pimiento (Figura 6.17 A) y tomate (Figura 6.18 A) la infiltración previa de HrpE despertaría una respuesta de resistencia en la planta y tendría el efecto de *priming*. En el caso control realizado, la previa infiltración del tejido con *buffer* no produjo una disminución del crecimiento bacteriano; por el contrario en esta condición se desarrolló la infección del tejido con normalidad (Figuras 6.17 A y 6.18 A). Además, para comprobar lo observado se cuantificó también el crecimiento bacteriano en cada uno de los tratamientos por los primeros 4 días. Para ello, se tomaron a los 0, 1 y 4 días, discos de las zonas tratadas previamente e infiltradas posteriormente con Xcv, y se realizó el correspondiente recuento de colonias (ver Materiales y Métodos 3.11.). Tal como se esperaba, se

observó que Xcv creció menos en los tejidos previamente tratados con HrpE o con XachrpB⁻, mientras que el tratamiento control con *buffer* tuvo el crecimiento normal esperado (Figuras 6.17 B y 6.18 B). Cabe destacar que se produjo *priming* en ambas concentraciones de HrpE, indicando que este proceso se logra tanto a concentraciones inferiores como superiores a la necesaria para observar HR con muerte celular.

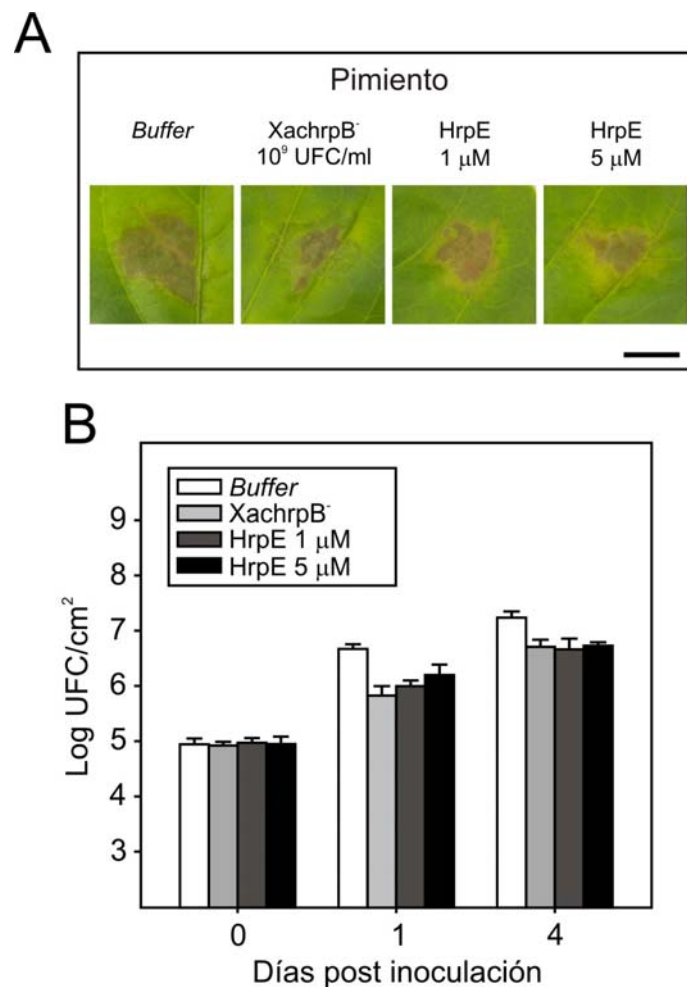


Figura 6.17. El tratamiento previo de hojas de pimiento con HrpE afecta el crecimiento bacteriano de posteriores inoculaciones. **(A)** Se muestran fotos representativas de hojas de pimiento tratadas, y los efectos desarrollados en las diferentes condiciones. Como control se realizó la infiltración previa con *buffer* (Tris 50 mM pH 8); otro control fue incluye la infiltración de la cepa mutante del SST3 XachrpB⁻ (suspensión a 10⁹ UFC/ml). Se observa así el efecto *priming* de la proteína HrpE a ambas concentraciones, 1 y 5 μM. Las leyendas indican el tratamiento previo que recibieron las hojas. Las fotos fueron sacadas 4 días post infiltración de la cepa patógena. **(B)** Cuantificación de las bacterias a lo largo del tiempo. Las barras indican la media de 3 ensayos independientes, y las barras de error las desviaciones estándar para cada caso. La barra inferior en **(A)** representa 1 cm.

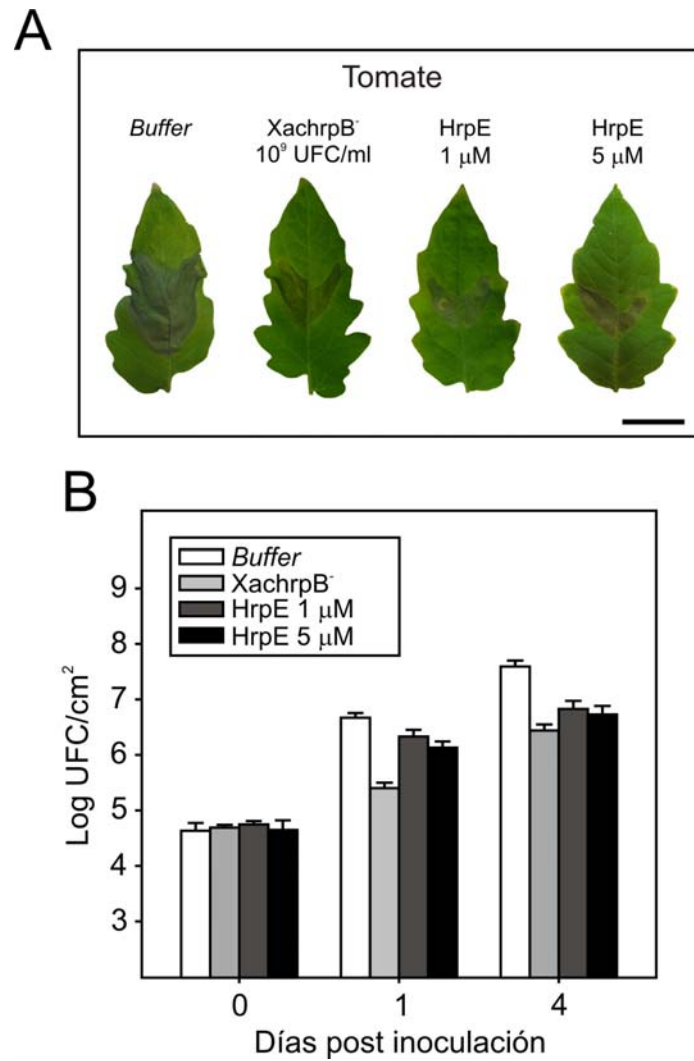


Figura 6.18. El tratamiento previo de hojas de tomate con HrpE afecta el crecimiento bacteriano de posteriores inoculaciones. **(A)** Se muestran fotos representativas de hojas de tomate tratadas, y los efectos desarrollados en las diferentes condiciones. Como control se realizó la infiltración previa con *buffer* (Tris 50 mM pH 8); otro control realizado fue la infiltración de la cepa mutante del SST3 XachrpB⁻ (suspensión a 10⁹ UFC/ml). Se observa así el efecto *priming* de la proteína HrpE a ambas concentraciones, 1 y 5 μM. Las leyendas indican el tratamiento previo que recibieron las hojas. Las fotos fue sacada 4 días post infiltración de la cepa patógena. **(B)** Cuantificación de las bacterias a lo largo del tiempo. Las barras indican la media de 3 ensayos independientes, y las barras de error las desviaciones estándar para cada caso. La barra inferior en **(A)** representa 1 cm.

6.6. Rol de HrpE en la interacción bacteria-bacteria

En un trabajo recientemente publicado por nuestro laboratorio se encontró además un nuevo papel para el SST3 de Xac, ya que estaría involucrado en la modulación de la formación de *biofilms* bacterianos de esta especie (Zimaro *et al.*, 2014). En este trabajo se compararon las capacidades de formación de *biofilms* de diferentes mutantes en el SST3 de Xac con respecto a la cepa tipo salvaje, y se observó que este sistema de secreción es necesario para este proceso. Las mutantes SST3 se adhirieron normalmente a las superficies de las hojas, pero el crecimiento asociado a estas (epifítico) se vio deteriorado. La complementación de lo observado con un estudio proteómico de las células del *biofilm* mostró que la falta del SST3 provoca cambios en la expresión de proteínas implicadas en los procesos metabólicos, la generación de energía, la producción de exopolisacáridos (EPS) y la motilidad bacteriana, así como proteínas de membrana externa (Zimaro *et al.*, 2014). La formación de *biofilms* clásicamente es considerada como un proceso de cuatro pasos, donde primeramente se produce la unión inicial de las células bacterianas; posteriormente la agregación de estas células y la acumulación de las mismas en múltiples capas; seguido de la maduración del *biofilm*; y por último el desprendimiento de células del *biofilm* en un estado planctónico para iniciar un nuevo ciclo en otro nicho (Arciola *et al.*, 2012).

Ya que el SST3 de Xac está involucrado en la formación de *biofilms*, surge la hipótesis de que posiblemente el pilus este funcionando como una molécula de adherencia. Por este motivo, y con la posibilidad de producir la proteína HrpE pura, se decidió estudiar su posible rol de en la agregación bacteriana. Para ello, se realizaron estudios por microscopía confocal láser de barrido incubando en un portaobjetos por 3 horas a la proteína Trx-⁶His-HrpE a una concentración 5 μ M con la cepa Xac tipo salvaje, la cepa mutante en el SST3 (XachrpB⁻) y la cepa mutante en el regulador del cluster *hrp* (XachrpG⁻), todas ellas expresando GFP y crecidas en XVM2 con agitación a 28 °C (ver Materiales y Métodos 3.6.2.). Luego de ocurrido el tiempo de incubación, los preparados se observaron en el microscopio confocal, donde se observó que HrpE permitió la formación de agregados solamente en el caso de la cepa tipo salvaje. En el resto de las cepas ensayadas (ambas deficientes en la formación del SST3 por diferentes motivos) no se observaron ningún tipo de agregados. Por el contrario, las células bacterianas se encontraron completamente dispersas (Figura 6.19). Como control, se incubaron las mismas cepas bacterianas

con la proteína $^6\text{His-Trx}$, no observándose ningún agregado en todos los casos. Se puede plantear entonces, que la formación de agregados para la subsiguiente formación de estructuras de *biofilms* se puede deber al accionar de la proteína HrpE, la cual actuaría a través de los SST3 ubicados en la superficie de las células de Xac.

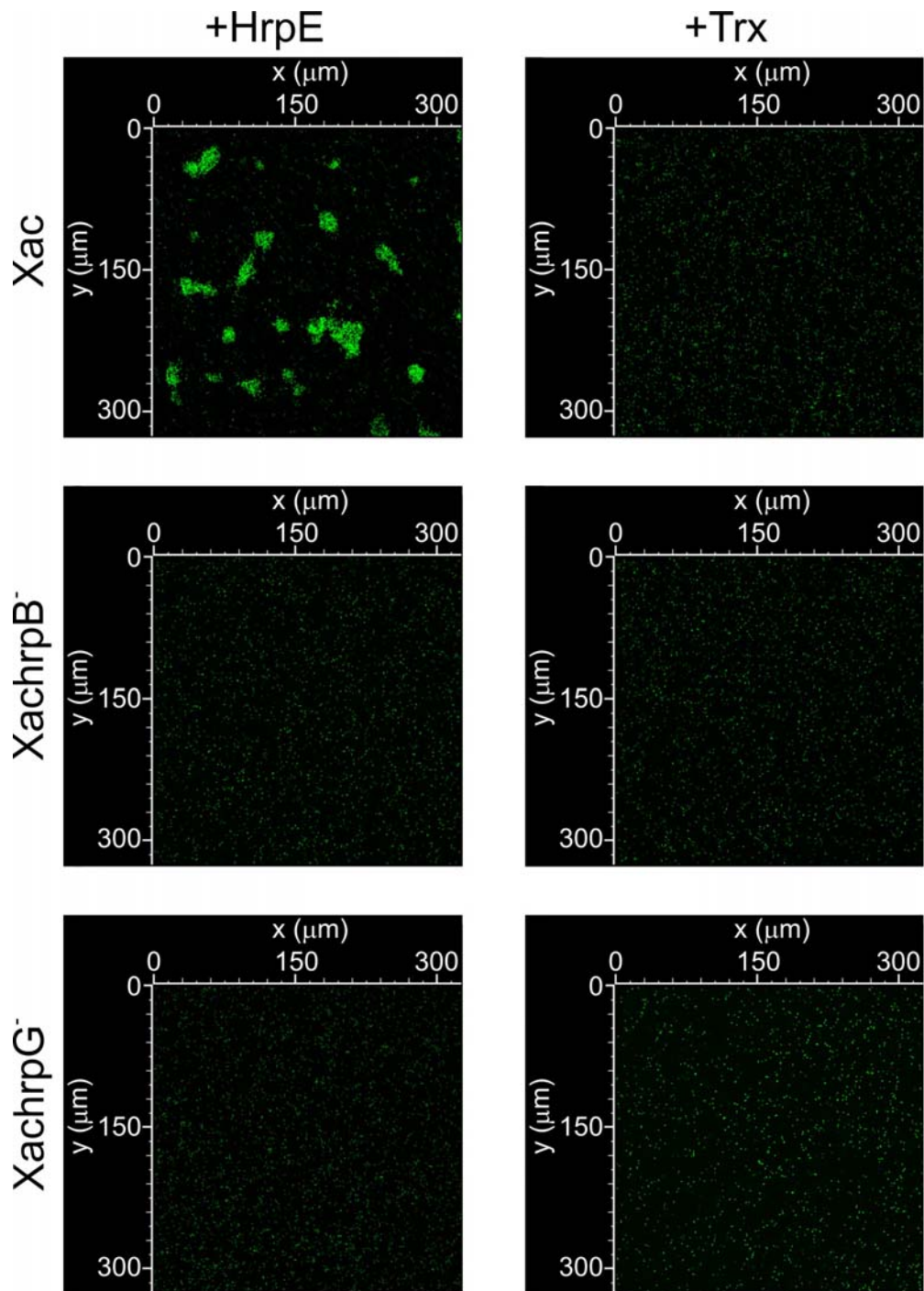


Figura 6.19. HrpE agrega células bacterianas de Xac. Fotografías representativas de microscopía confocal de barrido láser de la cepa Xac tipo salvaje, la cepa mutante en el SST3 (*XachrpB*⁻), y la cepa mutante en el regulador del cluster *hrp* (*XachrpG*⁻), todas ellas expresando GFP e incubada por 3 horas con y sin la proteína Trx- $^6\text{His-HrpE}$ a una concentración de 5 μM .

6.7. Estrategia para la obtención de plantas resistentes a la Cancrosis de los Cítricos

6.7.1. Introducción

Las enfermedades de las plantas son una gran amenaza para el suministro mundial de alimentos, ya que hasta un 15% de la producción se pierde debido a los patógenos. En el pasado, el control de las enfermedades y la generación de líneas de plantas resistentes protegidas contra la infección de patógenos virales, bacterianos o fúngicos, se logró mediante el mejoramiento convencional basado en las cruces, análisis de mutantes, y el retrocruzamiento. Actualmente, los avances en las técnicas de biología molecular han hecho modificar el enfoque planteado para la obtención de plantas resistentes a microorganismos patógenos. Varias estrategias, incluyendo la expresión de secuencias derivadas de patógenos o de agentes anti-patogénicos, se han desarrollado para diseñar una mejor resistencia a los patógenos en plantas transgénicas (Beachy, 1997; Lomonossoff, 1995). Hace décadas se demostró que los anticuerpos policlonales y monoclonales pueden neutralizar virus, bacterias y hongos selectivamente. La resistencia basada en anticuerpos es una estrategia relativamente novedosa para la generación de plantas transgénicas resistentes a los patógenos (Fecker *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998; Le Gall *et al.*, 1998). La ventaja de este enfoque es que los anticuerpos pueden ser diseñados contra casi cualquier molécula *target* lo que confiere una protección eficaz contra sólo los patógenos. La eficacia de la resistencia de plantas a base de anticuerpos fue demostrada por primera vez en virus de plantas, pero su aplicación a otros fitopatógenos es cada vez mayor (Schillberg *et al.*, 2001).

Debido a que HrpE es la principal proteína componente del Pilus Hrp, constituye un buen blanco para la inhibición de la maquinaria del SST3 de Xac. Por lo tanto se propuso generar anticuerpos monoclonales que reconozcan a HrpE de Xac, y que además inhiban su funcionalidad, de esta forma brindando las bases para la generación a futuro de plantas transgénicas de cítricos que expresen estos anticuerpos monoclonales y sean resistentes a Xac. A fin de analizar la factibilidad y funcionalidad de esta estrategia, se decidió generar anticuerpos policlonales contra HrpE y analizar su capacidad inhibitoria sobre la actividad de esta proteína.

6.7.2. Producción de anticuerpos contra HrpE

Aplicando el protocolo desarrollado tal como se muestra en la Figura 6.8, se logró obtener la proteína HrpE libre de Trx-⁶His y de otras proteínas. Realizando varios ciclos de expresión y obtención de esta proteína (el rendimiento de obtención de HrpE pura calculado fue de aproximadamente 3%, tomando en cuenta la cantidad de proteína de fusión de partida), se procedió a la posterior inoculación de conejos con la intención de obtener anticuerpos contra la misma. Primeramente, el suero proveniente del animal elegido (suero pre-inmune) fue probado en un ensayo de *Western blot* contra una muestra de la proteína de fusión Trx-⁶His-HrpE parcialmente digerida con la proteasa Trombina con la intención de corroborar la factibilidad del uso del animal (datos no mostrados). Una vez visto que no existiera reconocimiento de ninguna de las bandas de interés, se prosiguió con la inoculación del animal siguiendo el protocolo recomendado (ver Materiales y Métodos 3.16.). Al término del mismo, se realizaron varias extracciones de sangre al animal, se aisló el suero de la misma, y se procedió a su análisis, también a través de *Western blot* (Figura 6.20) Como control para validar el suero obtenido, se utilizaron además anticuerpos anti-⁶His comercial.

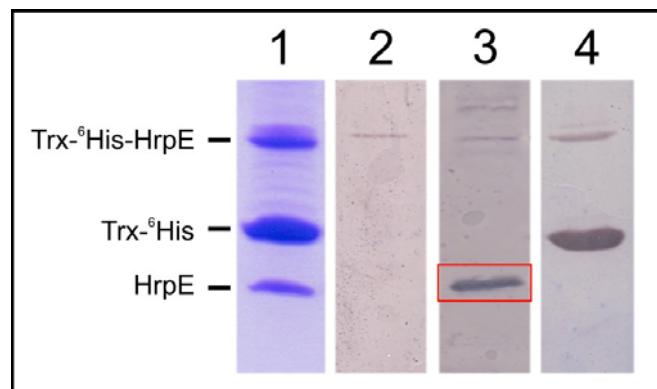


Figura 6.20. Análisis de los sueros de conejo previo y posterior a la inoculación con la proteína HrpE. Una muestra de proteína de fusión (Trx-⁶His-HrpE) parcialmente digerida con Trombina fue resuelta en un gel de SDS-PAGE al 16% con tricina y teñida con Coomassie Blue (1); o transferida a membrana de nitrocelulosa, y posteriormente incubada con suero pre-inmune 1:250 (2), suero inmune 1:1000 (3), y suero comercial anti-⁶His 1:1000 (4). Como anticuerpo secundario se utilizó suero comercial anti-IgG de conejo (1:3000). Se puede observar que el suero inmune reconoce la banda de HrpE con una alta especificidad (recuadro rojo)

6.7.3. Análisis *in vivo* de los anticuerpos contra HrpE

Previamente a la realización de los ensayos utilizando el suero anti-HrpE obtenido, y debido a que la composición del mismo es muy compleja, se decidió analizar primeramente su inocuidad en los tejidos de hojas. Para ello, se infiltraron diversas diluciones del suero en hojas de naranja y se observó que todas causaron un efecto indeseado, aún en las diluciones más bajas analizadas. Por lo tanto se procedió a purificar los anticuerpos específicos anti-HrpE a partir de este suero total (ver Materiales y Métodos 3.16.), con la intención de eliminar los factores nocivos para la planta. Una vez realizado esto, se reiteró la prueba de nocividad infiltrando hojas de plantas de naranja con diversas diluciones del suero purificado. Así, se logró observar que el suero purificado fue inocuo en todas las diluciones analizadas (datos no mostrados).

Los ensayos *in planta* se realizaron utilizando Trx-⁶His-HrpE pura infiltrada en hojas de cítricos a distintas concentraciones junto con una dilución 1:10 del suero anti-HrpE, o sin el agregado de este último. A los 7 días post infiltración, el efecto de clorosis establecido por HrpE dejó de evidenciarse, o fue de una intensidad menor cuando la proteína fue infiltrada junto con el suero anti-HrpE. Este efecto se observó para todas las concentraciones de proteína analizadas (Figura 6.21). De esta manera se puede decir que los anticuerpos, al unirse a HrpE, lograron evitar que la misma sea reconocida por la planta, evitando entonces la respuesta de esta, evidenciada por la disminución de la clorosis en las zonas infiltradas (Figura 6.21).

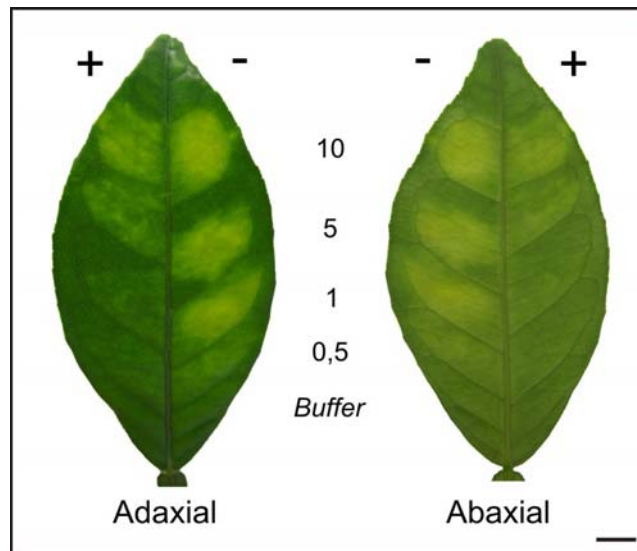


Figura 6.21. Análisis de la inhibición del efecto de HrpE en hojas de cítricos utilizando anticuerpos anti-HrpE. Se infiltraron hojas de *C. sinensis* con Trx⁶-His-HrpE a las concentraciones indicadas (en μM) con (+) o sin (-) una dilución 1:10 de los anticuerpos previamente purificados. Como control se utilizó *Buffer* (Tris 50 mM pH 8). Se observa la eliminación o disminución del efecto de clorosis en las zonas infiltradas con suero. Se muestra la foto de una hoja representativa del ensayo. Las fotografías fueron tomadas 6 días luego de la inoculación, tanto en la cara adaxial como abaxial de la hoja. La barra inferior representa 1 cm.

Aunque no es mostrado en el presente trabajo de tesis, la estabilidad de los anticuerpos al entorno apoplástico fue analizada con la intención de determinar la factibilidad de su uso en semejantes condiciones. Se probaron diferentes tratamientos modificando el tiempo de espera entre la aplicación del suero y la posterior inoculación con HrpE, dando como resultado que los mismos son resistentes al ambiente apoplástico de la planta, al menos al corto y mediano plazo.

Este resultado demostró la validez del uso del suero de conejo purificado como inhibidor de los efectos producidos por la proteína, y planteó la posibilidad de tener efectividad al ser usado contra células bacterianas. Así, se decidió analizar si anti-HrpE es capaz que inhibir la HR que produce Xac en plantas de pimiento. Para ello, se infiltraron hojas de pimiento con una suspensión de la cepa Xac tipo salvaje (10^8 UFC/ml) con o sin una dilución 1:10 del suero inmune purificado previamente. Luego de 5 días post infiltración se logró observar que, mientras la zona infiltrada únicamente con Xac mostraba lesiones típicas de HR, la que fue infiltrada junto con el suero inmune anti-HrpE tuvo lesiones mucho menos marcadas y severas (Figura 6.22). Esto permitió definir que efectivamente el suero fue funcional contra Xac, probablemente por reconocer las estructuras de Pilus Hrp de la bacteria, bloqueando la secreción de proteínas que son reconocidas por la planta para el desarrollo de HR, y evitando así que la planta de pimiento reaccione frente a las células bacterianas.

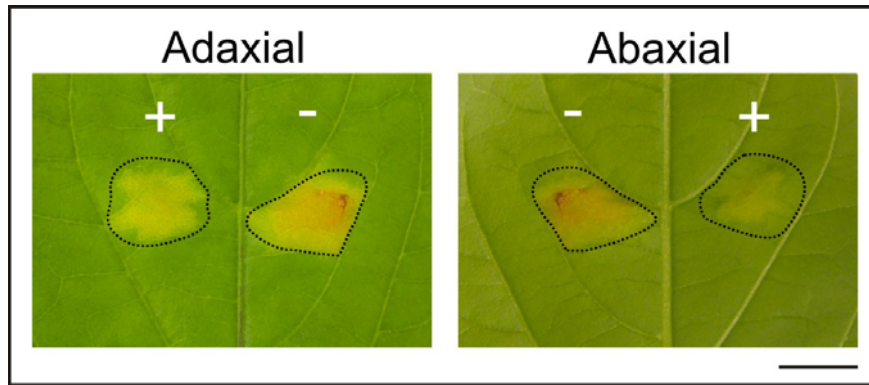


Figura 6.22. Análisis de la inhibición del efecto de Xac en hojas de pimiento utilizando anticuerpos anti-HrpE. Se infiltraron hojas de *Capsicum annuum* (pimiento) con una suspensión de la cepa tipo salvaje de Xac (a 10^8 UFC/ml) con (+) o sin (-) una dilución 1:10 de los anticuerpos previamente purificados. Se observa la disminución de la lesión típica de HR en las zonas infiltradas con suero. Se muestra la foto de una hoja representativa del ensayo. Las fotografías fueron tomadas 6 días luego de la inoculación, tanto en la cara adaxial como abaxial de la hoja. La barra inferior representa 1 cm.

Una vez observado y determinado que el suero producido es funcional *in planta* contra suspensiones bacterianas de Xac en interacciones con plantas no hospedadoras, se planteó estudiar si este anticuerpo es también funcional para inhibir la HR desarrollada por Xcv en plantas de cítricos. Se infiltraron hojas de naranja con la cepa tipo salvaje de Xcv (10^8 UFC/ml) con o sin una dilución 1:10 del suero inmune purificado previamente. Luego de 6 días post infiltración nuevamente se logró observar que, mientras la zona infiltrada únicamente con Xcv mostraba lesiones típicas de HR, la que había sido infiltrada junto con el suero inmune anti-HrpE tuvo lesiones mucho menos marcadas (Figura 6.23). De esta forma, se logró corroborar que el suero fue funcional también contra Xcv, probablemente por un mecanismo similar al planteado anteriormente para la interacción Xac-pimiento.



Figura 6.23. Análisis de la inhibición del efecto de Xcv en hojas de naranja utilizando anticuerpos anti-HrpE. Se infiltraron hojas de *C. sinensis* con una suspensión de la cepa tipo salvaje de Xcv (a 10^8 UFC/ml) con (+) o sin (-) una dilución 1:10 de los anticuerpos previamente purificados. Se observa la disminución de la lesión típica en las zonas infiltradas con suero. Se muestra la foto de una hoja representativa del ensayo. Las fotografías fueron tomadas 6 días luego de la inoculación, tanto en la cara adaxial como abaxial de la hoja. La barra inferior representa 1 cm.

Por último, y en vista de lo observado anteriormente, se planteó analizar la funcionalidad del suero anti-HrpE en suspensiones bacterianas de Xac en la interacción con plantas hospedadoras. Así, se infiltraron hojas de naranja con la cepa tipo salvaje de Xac (10^6 UFC/ml) en cuatro zonas y, luego de 24, 48 y 72 horas, se infiltró nuevamente la zona pero con el suero inmune purificado previamente. En este caso, y debido al efecto que se deseaba observar, no se realizó ninguna dilución del suero. Como control del desarrollo de la enfermedad, se infiltró una de las zonas inoculadas previamente con Xac con el mismo *buffer* que se utilizó con anterioridad para purificar los anticuerpos anti-HrpE (ver Materiales y métodos 3.16.). Luego de 20 días de la infiltración inicial de bacterias se logró observar que la zona tratada con *buffer* mostraba las lesiones típicas de la enfermedad, caracterizada por el engrosamiento del tejido y la expansión de la infección. Por el contrario, las zonas que se trataron con el suero anti-HrpE no presentaron semejantes características, siendo lo observado similar a una HR, caracterizada por tener una zona necrótica que impide el desarrollo posterior de la enfermedad (Figura 6.24). Por lo observado en este ensayo, se puede decir además que mientras más temprano se realizó el tratamiento de la zona con suero, menor fue la posterior lesión desarrollada. Esto estaría indicando que es importante la inmunización temprana del tejido para evitar la proliferación de las bacterias dentro del mismo. Cabe destacar que de todas formas se observaron canchales en los casos tratados con suero, muy probablemente debido a que se utilizó una suspensión muy concentrada de bacterias, lo que evitó una efectividad mayor del suero. Una concentración bacteriana en un foco infectivo de esas magnitudes no es factible en la Naturaleza. La cantidad de canchales en las zonas tratadas con suero inmune se pudieron contabilizar a simple vista, mientras que los desarrollados en el tratamiento con *buffer* cubrieron toda la zona inoculada, impidiendo individualizarlos. Así, se logró comprobar que el suero anti-HrpE también fue funcional para inhibir la patogenicidad de Xac al ser enfrentada a plantas hospedadoras.

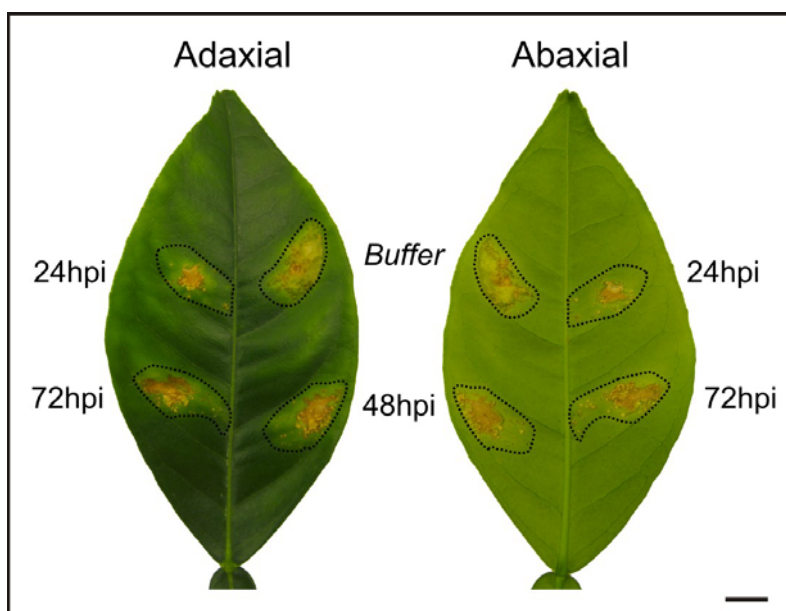


Figura 6.24. Análisis de la inhibición de la patogenicidad de Xac en hojas de naranja utilizando anticuerpos anti-HrpE. Se infiltraron hojas de *C. sinensis* con una suspensión de la cepa tipo salvaje de Xac (a 10^6 UFC/ml) y, luego de 24, 48 y 72 horas, se trataron con el suero de anticuerpos anti-HrpE previamente purificado. Se observa la disminución de la lesión típica en la zona infiltrada sin suero. Por el contrario, se desarrollaron lesiones más parecidas a una HR en los 3 tratamientos con suero. La menor expansión fue encontrada en el tratamiento con suero a las 24 horas, indicando la necesidad de una inmunización temprana para evitar la expansión de las bacterias. Se muestran las fotos de una hoja representativa del ensayo. Las fotografías fueron tomadas 20 días luego de la inoculación bacteriana, tanto en la cara adaxial como abaxial de la hoja.

6.8. Discusión

En *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* HrpE fue identificada como la subunidad principal del Pilus Hrp, ya que esta proteína fue el componente predominante de las preparaciones de pilus; los Pili Hrp se marcan fuertemente por un antisuero anti-HrpE monoespecífico, mutaciones en *hrpE* conducen a la pérdida del Pilus Hrp. Teniendo en cuenta la distribución dentro del cluster *hrp* y la homología de secuencias con HrpE de Xac, se puede deducir que esta última proteína es la pilina del SST3 de Xac.

A través de los años se han realizado investigaciones referidas a esta pilina (y otras) desde el punto de vista de la secreción y translocación de proteínas, y los diversos efectos que producen mutaciones dentro del gen *hrpE* sobre dichos procesos (Koebnik, 2001; Weber *et al.*, 2005). Llamativamente no se han abordado estudios sobre otros posibles roles de HrpE en la interacción planta-patógeno. En el presente trabajo de tesis, se realizaron diversos estudios para determinar el grado de reconocimiento que tienen las plantas sobre HrpE de Xac, los efectos que la misma produce sobre los tejidos foliares de las plantas, y la capacidad de respuesta de defensa de las plantas en presencia de esta proteína pilina. Al mismo tiempo, se analizó un posible rol de esta pilina en la adherencia bacteriana basados en un reciente trabajo publicado por nuestro grupo sobre la importancia que presenta el SST3 sobre la formación de *biofilms* (Zimaro *et al.*, 2014). El estudio en profundidad de HrpE permitirá determinar nuevas características que posibiliten, a futuro, el desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de resistencia en las plantas.

Como se enunció anteriormente, cuando las bacterias fitopatógenas son enfrentadas a plantas en sus tejidos, se produce la expresión de los genes del SST3 (Wengelnik y Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996), por lo tanto las pilinas son una de las primeras proteínas en ser expuestas y potencialmente reconocidas por las plantas. La proteína HrpE de Xac mostró desarrollar HR cuando fue infiltrada en plantas no hospedadoras, como tabaco, pimiento y tomate; y cuando fue infiltrada en hojas de naranja, las mismas desarrollaron una respuesta clorótica y sin muerte celular visible. Al realizar un análisis más profundo sobre el desarrollo de HR en plantas de tabaco, se observó que el daño y desarrollo de HR está asociado a la producción de ROS. Particularmente, en plantas de naranja se observó también una producción de ROS cuando fueron tratadas con HrpE de Xac. La deposición de calosa es otro marcador de la inmunidad disparada por PAMPs (Nguyen *et al.*,

2010). Los ensayos realizados con HrpE de Xac tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras indicaron que, en diferente medida, la deposición de este polisacárido aumenta al enfrentarlas con esta proteína pilina. Según el análisis de los depósitos de calosa obtenidos, la respuesta desarrollada es más débil en naranja con respecto a las plantas no hospedadoras. De esta forma se puede explicar por qué en plantas de naranja no se desarrolló HR con muerte celular visible. El motivo de este hecho puede deberse a que la hoja de naranja (o de los cítricos en general) es naturalmente más dura o resistente que la de las de plantas no hospedadoras. Para poder comprobar esta idea, en el laboratorio se desea en el futuro con los estudios de los efectos que produce HrpE en otras plantas no hospedadoras modelo. Por otra parte, y basándose en que no existe hasta la fecha evidencia sobre proteínas de plantas que interactúen con HrpE, este hecho se puede deber a que HrpE da una mayor respuesta de defensa en plantas no hospedadoras probablemente a través de algún dominio que no es reconocido por las células de plantas de naranja. Una posibilidad es que lo haga con el dominio no conservado de las pilinas (ver Figura 6.3), el cual está sugerido como el responsable de la especificidad en la interacción planta-patógeno.

Los efectos desarrollados por HrpE en plantas no hospedadoras también fueron caracterizadas por un aumento en la expresión de distintos genes de defensa en tomate, tal como fue evidenciado con la expresión de los genes para los cuales previamente se observó inducción en respuesta a la infiltración con la bacteria no patogénica *P. fluorescens* (Nguyen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009). Por otro lado, en naranja se observó la inducción de los genes que codifican para proteínas componentes de la cascada de quinasas de la respuesta basal de plantas (Asai *et al.*, 2002), proteínas consideradas marcadores de estrés oxidativo (Tausz *et al.*, 2004; Overmyer *et al.*, 2003; Garavaglia *et al.*, 2010), proteínas relacionadas a la patogénesis (van Loon *et al.*, 2006; Mitsuhara *et al.*, 2008; Datta y Muthukrishnan, 1999), y enzimas relacionadas con la formación de metabolitos secundarios (Yang *et al.*, 1991; Keith *et al.*, 1991). Tomando todos estos resultados en conjunto, se puede decir que en plantas no hospedadoras HrpE provocó un nivel de inducción de genes igual o levemente mayor a la obtenida en respuesta a Xac (excepto en el gen *SlPTi5* donde la inducción siempre fue menor); en cambio, en naranja los niveles de expresión de los genes fueron mayoritariamente menores que los desarrollados por Xcv (excepto por los genes *CsMSOD* y *CsPR4* donde fue mayor). Esto sugiere e

indica nuevamente que las plantas hospedadoras responden con menor intensidad a HrpE con respecto al desarrollo de defensa probablemente debido a una falta en el reconocimiento de esta proteína, o a una resistencia natural por parte de los tejidos foliares. El hecho de observar mayor expresión de los genes *CsMSOD* y *CsPR4* frente a HrpE en plantas de naranja, puede deberse a que diferentes proteínas secretadas por *Xcv* inhiban, o modulen negativamente, la expresión de los mismos, lo que no ocurre con HrpE sola.

A través de un análisis predictivo, se logró determinar que la proteína HrpE posee características comunes con otras proteínas pilinas pertenecientes a diferentes patógenos. Aunque HrpE no mostró similitud a otras subunidades de pilus de bacterias no relacionadas a las *Xanthomonas* a nivel de secuencia, compartió varias características con estas proteínas siendo pequeña, predominantemente α -helicoidal (con además una propensión helicoidal más alta en la región carboxilo terminal), y con patrones de hidrofobicidad similares. Llamativamente, del análisis de apilamiento de secuencia de distintas pilinas HrpE de diversos patógenos pertenecientes al género *Xanthomonas*, se encontró que existe una región altamente conservada entre ellas. Esta región, que conforma el extremo carboxilo terminal, esta compuesta por los últimos 24 residuos aminoacídicos de las proteínas en cuestión. La alta homología en esta región entre pilinas de especies bacterianas con diferentes patovares, es un indicativo de que la misma podría estar conformando el *core* del Pilus Hrp. El resto de la secuencia de las proteínas pilinas presenta un menor grado de homología con pocos residuos conservados, lo que sugiere que esta región estaría involucrada en generar la especificidad de cada patovar. Como se comentó anteriormente, no existen trabajos donde se planteen estudios respecto a otros posibles roles que poseen las pilinas, además del estructural dentro del SST3. Como perspectivas a futuro, sería de gran importancia continuar con los estudios referidos a las funciones de la proteína pilina HrpE de *Xac*, no sólo utilizando la proteína en toda su secuencia, sino también analizando las regiones comentadas anteriormente. Particularmente, poder comprender si las respuestas observadas en las plantas pueden ser atribuidas a alguna de las regiones. A su vez, es de similar importancia analizar si el rol agregativo observado para HrpE en las bacterias se debe también a alguna de estas regiones. Estudios de esta índole permitirán avanzar sobre la hipótesis actual de la ubicación de las regiones amino y

carboxilo terminal de HrpE, expuesta y oculta al entorno, respectivamente, planteada en la actualidad.

El proceso por el cual se activan las respuestas de defensa de la planta sin el desarrollo de una HR, a partir de un tratamiento sobre las plantas, se llama *priming*. Existen ejemplos de este proceso, aumentando las respuestas de defensa a diversos patógenos de plantas, incluyendo hongos, oomicetos, bacterias y virus, sin muerte celular (Dong *et al.*, 1999; Fontanilla *et al.*, 2005a y b). Cuando HrpE de Xac fue estudiada con respecto a este proceso en plantas de naranja, la misma generó un *priming* que disminuyó la subsiguiente infección con Xac. Muy llamativamente, el mismo efecto se logró al utilizar otros modelos planta-patógeno, como tomate-Xcv y pimiento-Xcv, obteniendo el mismo resultado de *priming*. Esta característica es novedosa para las proteínas del Pilus Hrp, siendo aún más interesante al observar que el efecto puede ser intercambiable entre distintos modelos de interacción planta-patógeno.

En el pasado, el control de las enfermedades y la generación de líneas de plantas resistentes protegidas contra la infección de patógenos virales, bacterianos o fúngicos, se logró mediante el mejoramiento convencional basado en las cruza, análisis de mutantes, y el retrocruzamiento. Actualmente, varias estrategias que incluyen la expresión de secuencias derivadas de patógenos o de agentes anti-patogénicos, se han desarrollado para diseñar una mejor resistencia a los patógenos en plantas transgénicas (Beachy, 1997; Lomonossoff, 1995). En base a los resultados obtenidos a través del estudio de HrpE como proteína promotora de *priming*, se considera factible el desarrollo de plantas transgénicas que expresen esta proteína como estrategia para la obtención de líneas de plantas de cítricos resistentes a Xac, y consecuentemente a la Cancrosis de los Cítricos. Al mismo tiempo, la misma estrategia es también aplicable a otras especies de plantas, como tomate y pimiento, al menos con respecto a su fitopatógeno *X. campestris* pv. *vesicatoria*. En vista de la potencialidad del efecto de *priming* a través de diversas especies de plantas, es también interesante continuar con estos ensayos ampliando no sólo la variedad de fitopatógenos, sino también de especies o cultivares de plantas.

Otra estrategia diferente para la obtención de plantas transgénicas resistentes

a la Cancrosis de los Cítricos es la utilización de anticuerpos que inhiban la secreción de proteínas por el SST3. La resistencia basada en anticuerpos es una estrategia relativamente novedosa para la generación de plantas transgénicas resistentes a los patógenos (Fecker *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998; Le Gall *et al.*, 1998). La eficacia de la resistencia de plantas a base de anticuerpos fue demostrada por primera vez en virus de plantas, pero su aplicación a otros fitopatógenos es cada vez mayor (Schillberg *et al.*, 2000; de Jaeger *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 1998; Fecker *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998). En este trabajo de tesis se desarrollaron anticuerpos policlonales contra HrpE de Xac, y se determinó que efectivamente estos anticuerpos inhiben los efectos de HR o clorosis que produce la misma tanto en plantas no hospedadoras como hospedadoras, respectivamente. Además, estos anticuerpos fueron capaces de inhibir las reacciones de HR provocadas por Xac y por Xcv en hojas de plantas de pimiento o de naranja, respectivamente. Estos resultados indican que la efectividad de los anticuerpos desarrollados no sólo tiene especificidad contra las estructuras del Pilus Hrp de Xac, sino que también la tiene sobre el pilus de especies fitopatogénicas relacionadas, como Xcv. Este hecho probablemente se deba al alto grado de conservación que existe entre las pilinas de estas especies de *Xanthomonas*, donde el porcentaje de identidad resultó ser del 77% y el de similitud del 88%, tal como fue observado en el análisis de secuencias *in silico* (Figura 6.1). Al analizarse los anticuerpos en el modelo deseado (naranja-Xac), se encontró nuevamente que su funcionalidad y efectividad fueron las esperadas, disminuyendo las lesiones por cancrrosis, y sustituyéndolas por lesiones más similares a las encontradas en una respuesta de defensa con HR. A futuro, y teniendo en cuenta que el suero de anticuerpos purificados también fue efectivo al ser utilizado con Xcv frente a su planta no hospedadora naranja, es interesante a futuro realizar estudios para determinar si lo mismo es observado al utilizarlos con Xcv frente a pimiento o tomate. Si bien el modelo de enfermedad en este caso es diferente al de la Cancrosis de los Cítricos, se espera obtener resultados positivos.

Todos estos resultados indican que la estrategia de obtención de plantas de naranjas resistentes a Xac, y por ende a la Cancrosis de los Cítricos, utilizando la expresión de anticuerpos específicos contra la proteína pilina de este patógeno, sea considerada viable y potencialmente efectiva.

Capítulo 4

**Estudios e identificación de proteínas de
C. sinensis blancos de HrpE y Hpa1**

7. Estudios e identificación de proteínas de *C. sinensis* blancos de HrpE y Hpa1

7.1. Identificación de interacciones entre proteínas de Xac y de hojas de plantas de naranja

Como se mencionó en capítulos anteriores de esta tesis, muchas de las proteínas del patógeno que desencadenan inmunidad en las plantas lo hacen mediante la interacción de las mismas con proteínas de las plantas, las que se encargan luego de traducir esta interacción a una respuesta. Existen diversos ejemplos de proteínas efectoras de patógenos que son capaces de modificar a proteínas vegetales durante el desarrollo de la enfermedad (Ribet y Cossart, 2010; Kim *et al.*, 2013). Un ejemplo interesante de modificación de proteínas blanco de plantas es HopPtoD2 de *P. syringae*. Esta proteína efectora posee actividad proteína tirosina fosfatasa (PTP), y puede inactivar proteínas fosforiladas en tirosina (Bretz *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2003). Se ha observado que blancos principales de HopPtoD2 son las vías MAPK, estando las PTP de plantas involucradas en la regulación de estas vías. Con respecto a las proteínas harpin existen evidencias de la existencia de posibles blancos en la membrana plasmática de las células vegetales ya que se encontró que HrpZ1 de *P. syringae* pv. *phaseolicola* se une a la membrana de células de tabaco (Lee *et al.*, 2001). Además, HrpN de *Erwinia amylovora* interactúa con las proteínas de manzana llamadas HIPM, y sus ortólogos AtHIPM en *Arabidopsis thaliana* y OsHIPM en arroz (Oh y Beer, 2007), las que se localizan en la membrana plasmática de las células de plantas. Ya que por su parte Hpa1 y HrpE de Xac desencadenan respuestas de defensa en plantas de cítricos, se decidió analizar la existencia de proteínas de esta especie vegetal que interactúen con estas proteínas bacterianas. Para ello, se realizó un estudio de interacción proteína-proteína mediante el ensayo de doble híbridos en levaduras (Y2H, del inglés Yeast Two Hybrid). Este ensayo consiste en la activación de un gen reportero por la unión de un factor de transcripción corriente arriba de su secuencia. Para el estudio de dos híbridos, el factor de transcripción se divide en dos fragmentos separados, uno llamado dominio de unión (BD, del inglés Binding Domain) y el otro llamado dominio de activación (AD, del inglés Activation Domain). El BD es el dominio responsable de la unión al ADN promotor del gen, y el AD es el dominio

responsable de la activación de la transcripción, y cada uno se encuentra en un vector plasmídico replicativo en levaduras y selectivo por auxotrofia (pOAD y pOBD). El Y2H es por lo tanto un ensayo de complementación proteína-proteína donde, si existe interacción entre éstas, se reconstruye el factor de transcripción y por lo tanto la expresión del gen reportero (van Criekinge y Beyaert, 1999). Existen diversos sistemas de dos híbridos en levaduras, basados en el factor de transcripción a reconstruir. En el sistema Gal4 de dos híbridos, utilizado en este trabajo, las colonias transformantes se siembran en placas selectivas para los dos plásmidos y para el gen reportero auxótrofo *HIS3*. Las colonias capaces de crecer en este medio selectivo (Sc-WHL) están transformadas con ambos vectores (pOAD libera la auxotrofia por Leu y pOBD por Trp) y, en principio, induciendo *HIS3* como resultado de las interacciones proteína-proteína que reconstituyen un Gal4 funcional.

Los genes *hpa1* y *hrpE* se amplificaron y clonaron en el vector pOBD, diseñado para este ensayo (ver Materiales y Métodos, 3.15.2.). El clonado se realizó de forma tal que estos genes queden en el mismo marco de lectura que el dominio de unión a ADN del factor de transcripción Gal4 de este vector. Las construcciones obtenidas se secuenciaron para corroborar la estrategia de clonado, antes de dar comienzo a los ensayos de interacción. Se realizó la transformación de células de la cepa PJ69-4a de *Saccharomyces cerevisiae* (ver Materiales y Métodos 3.15.3.) con los vectores pOBD-*hpa1* y pOBD-*hrpE* (Figura 7.1).

Dado que los resultados del sistema de dos híbridos demuestran un evento de transcripción, uno de los experimentos más cruciales a realizar inicialmente es comprobar si la proteína a analizar es capaz de iniciar la transcripción del gen reportero por sí sola; si este es el caso, a la proteína se la denomina autoactivadora, y por lo general no es posible analizar este tipo de proteínas en ensayos de dos híbridos, debido a que los resultados pueden verse perjudicados por la alta frecuencia de falsas interacciones (van Criekinge y Beyaert, 1999). Una forma de evidenciar si la proteína a analizar es una proteína autoactivadora, es la utilización por selección nutricional a través del gen *HIS3*. Debido a que el promotor incorporado corriente arriba del gen *HIS3* responde al dominio BD de Gal4, en los ensayos de doble híbrido puede utilizarse el reactivo 3-amino-1,2,4-triazol (3AT), un inhibidor competitivo del producto de este gen (van Criekinge y Beyaert, 1999). A fin de determinar si las construcciones a estudiar poseían la capacidad de activar por sí solas este promotor, se realizó una prueba de autoactivación sobre las levaduras

transformadas (ver Materiales y Métodos 3.15.4.) (Figura 7.1). Para este ensayo se utilizó el compuesto 3AT en distintas concentraciones en el medio de cultivo de selección (Sc-WH), y permitió determinar que la proteína Hpa1 posee una autoactivación muy marcada, hasta los 200 mM de 3AT, por lo que se decidió no utilizarla para los ensayos de interacción posteriores. Ante esta situación, y con la intención de determinar las posibles proteínas blanco de Hpa1, se decidió realizar el ensayo utilizando diversos fragmentos de la misma. La posibilidad de utilizar fragmentos de una proteína cuando la misma presenta una autoactivación muy marcada en ensayos de Y2H ha sido reportada en la bibliografía, proponiendo que la eliminación/modificación de partes de la proteína ayuda a disminuir este efecto indeseado (Causier y Davies, 2002; van Crielinge y Beyaert, 1999). De esta forma, y realizando previamente un análisis detallado de la bibliografía encontrada sobre la estructura y función de los diferentes dominios de la proteína Hpa1 (Wang *et al.*, 2007 y 2008; Yap *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2007), se determinó que sería interesante realizar el ensayo de doble híbrido con diversos fragmentos de esta proteína a fin de obtener la mayor cantidad de información posible. Los fragmentos determinados fueron 5: Hpa1₁₋₃₂, Hpa1₁₋₅₇, Hpa1₃₃₋₁₀₅, Hpa1₅₈₋₁₃₇ y Hpa1₁₀₆₋₁₃₇, que se definieron tomando en cuenta las dos hélices α predichas de la proteína. Hpa1₁₋₃₂, y Hpa1₁₀₆₋₁₃₇ representan los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente, sin contener ningún residuo perteneciente a las hélices α predichas. Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ representan las regiones analizadas en el Capítulo 2 de este trabajo, y cada uno contiene una de las hélices α . Por último, Hpa1₃₃₋₁₀₅ representa la región que contiene ambas hélices α y no contiene ningún residuo anterior o posterior a las mismas (Figura 5.2). Los distintos fragmentos se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector pOBD en marco con el gen *gal4* y se secuenciaron para corroborar la correcta construcción de los mismos (ver Materiales y Métodos 3.15.2.). Luego se realizó la transformación de células de la cepa PJ69-4a, y se realizó la correspondiente prueba de autoactivación (ver Materiales y Métodos 3.15.3. y 3.15.4.) (Figura 7.1).

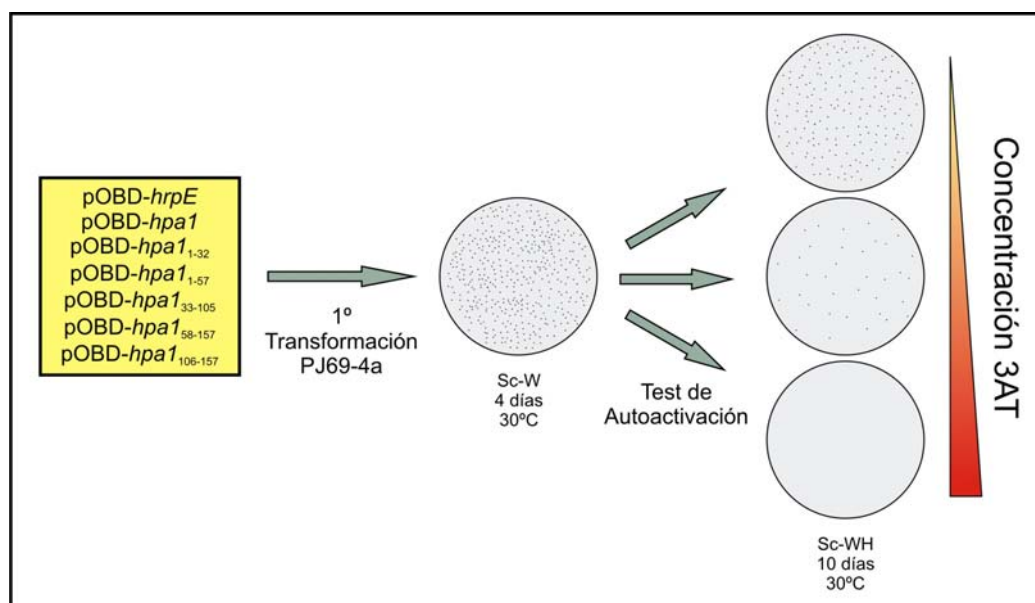


Figura 7.1. Diagrama de los pasos seguidos y las condiciones de selección para la 1ª transformación de las células de levaduras con los clones del vector pOBD conteniendo el gen *hrpE*, el gen *hpa1*, y los fragmentos génicos diseñados de este último. También se muestra la subsiguiente prueba de autoactivación de las levaduras para determinar las condiciones para el desarrollo de los estudios de interacción.

Las concentraciones de 3AT determinadas como críticas, o sea, la concentración a la que no crecen colonias de levadura en medio selectivo Sc-WH, se muestran en la Tabla 7.1. Esta concentración crítica fue la que se utilizó en todos medios de cultivo selectivos de los siguientes pasos del ensayo de doble híbrido en levaduras.

Construcción	[3AT] _{crítica}
pOBD- <i>hrpE</i>	35
pOBD- <i>hpa1</i> (*)	200
pOBD- <i>hpa1</i> ₁₋₃₂	25
pOBD- <i>hpa1</i> ₁₋₅₇	115
pOBD- <i>hpa1</i> ₃₃₋₁₀₅	5
pOBD- <i>hpa1</i> ₅₈₋₁₃₇	115
pOBD- <i>hpa1</i> ₁₀₆₋₁₃₇	35

Tabla 7.1. Concentraciones del inhibidor 3AT (en mM) determinadas para cada una de las construcciones analizadas. (*) Este clon no fue utilizado para los siguientes pasos del ensayo de doble híbrido.

Una vez determinada la concentración de trabajo del inhibidor 3AT para cada caso, se prosiguió a evaluar la interacción entre la proteína HrpE y los 5 fragmentos de Hpa1 con la biblioteca de ADNc de plantas de naranja. Así, los pasos siguientes

consistieron en la transformación con la biblioteca de naranja (previamente realizada y clonada en el vector pOAD en el laboratorio del Dr. Chuck Farah de la Universidad de San Pablo, Brasil) de las levaduras ya transformadas con cada construcción en el vector pOBD (ver Materiales y Métodos 3.15.5.), tal como se esquematiza en la Figura 7.2. Esta biblioteca fue generada tomando el ARN total vegetal a partir de hojas de *C. sinensis* infiltradas con Xac tipo salvaje por 2 días. Se infiltraron sólo mitades de las hojas con Xac, pero se procesaron las hojas completas con el objetivo de tener representatividad de todos los ARN expresados.

De los diversos ensayos realizados se obtuvieron distintas cantidades de levaduras doblemente transformadas y seleccionadas en el medio Sc-WHL (y su correspondiente concentración de 3AT), por ejemplo para HrpE se obtuvieron alrededor de 1300 colonias, para Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇ alrededor de 1000 colonias, para Hpa1₁₋₃₂ y Hpa1₁₀₆₋₁₃₇ alrededor de 600, y para Hpa1₃₃₋₁₀₅ sólo 36 colonias.

La cepa PJ69-4a es extremadamente sensible a las interacciones débiles y elimina casi todos los falsos positivos ya que contiene el gen reportero *ADE2* bajo el control de un promotor diferente, *GAL2*, que responde al mismo activador Gal4. Por lo tanto, para la confirmación de la interacción se utilizó el medio selectivo Sc-WHLA (ver Materiales y Métodos 3.15.1.), en el cual se analizaron (en los casos posibles) hasta 600 colonias de levaduras. Este paso nos indicó como resultado que entre el 40 al 60% de las interacciones eran positivas, con la excepción de Hpa1₃₃₋₁₀₅ donde el 100% de las colonias crecieron en este medio.

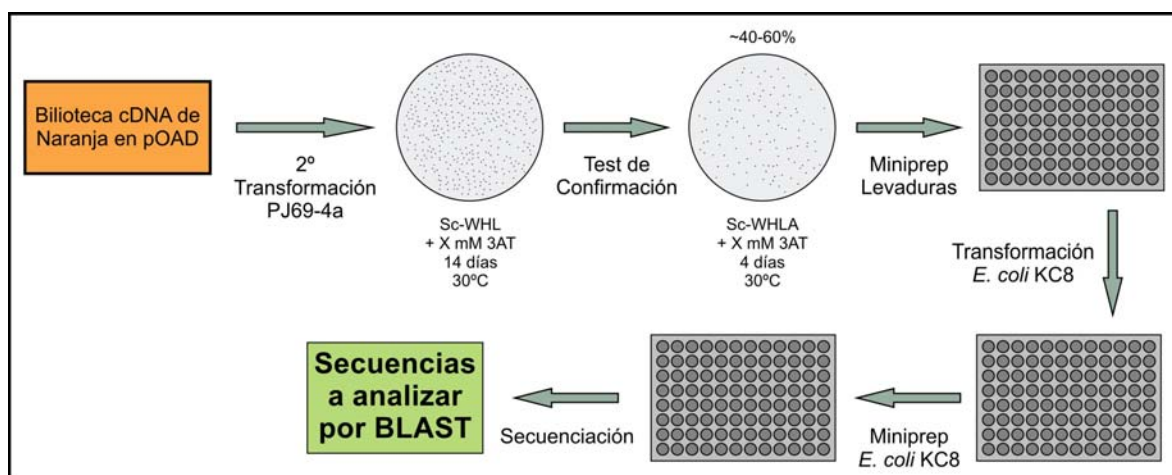


Figura 7.2. Diagrama con los subsiguientes pasos en el desarrollo del ensayo de doble híbrido en levaduras, indicando desde la 2º transformación de las mismas hasta el análisis de los clones y consecuente identificación.

Luego, fueron seleccionados 144 clones positivos de HrpE; 126 clones de Hpa1₁₋₅₇ y Hpa1₅₈₋₁₃₇; 96 clones de Hpa1₁₋₃₂ y Hpa1₁₀₆₋₁₃₇; y 36 clones de Hpa1₃₃₋₁₀₅ para su posterior secuenciación. A estas colonias se les extrajo el ADN plasmídico (ver Materiales y Métodos 3.15.6.), el cual se introdujo en la cepa de *E. coli* KC8, la que permite seleccionar específicamente el vector pOAD conteniendo la sección de ADNc codificante para la proteína que presentó la interacción de interés. A continuación, se realizó una nueva extracción de ADN plasmídico (pOAD) y una secuenciación del fragmento de ADNc clonado en él, el que fue utilizado para realizar una búsqueda por homología de la secuencia traducida a proteína enfrentándola con bases de datos públicas. Se utilizó la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), más en particular BLASTx, que permite realizar la búsqueda de proteínas a partir de una secuencia de nucleótidos. Así, mediante esta metodología se analizaron los diferentes clones positivos, dentro de los cuales se encontraron no sólo proteínas potencialmente de interés, sino también secuencias correspondientes al vector pOAD vacío, recombinaciones producidas al azar con fragmentos génicos de levadura y secuencias erróneas en el proceso de secuenciación. También se encontraron un número considerable de falsos positivos. Los falsos positivos son clones de la biblioteca de presas (clonadas en el vector pOAD) que codifican para proteínas que tienen una alta ocurrencia en los ensayos de Y2H, aún utilizando una gran variedad de proteínas carnadas (clonadas en el vector pOBD), por lo tanto se consideran indeseados y suelen ser desechados en los subsiguientes análisis. Para cada biblioteca generada existe un grupo de proteínas que conforman la lista de falsos positivos, los que únicamente se pueden identificar empíricamente. La información general encontrada en este análisis se resume en la Tabla 7.2.

Proteína o Fragmento	Clones totales	Clones con potencial interés	Clones descartados
HrpE	144	18 ^(12,5)	126 ^(87,5)
Hpa1 ₁₋₃₂	96	18 ^(18,75)	78 ^(81,25)
Hpa1 ₁₋₅₇	126	28 ^(22,2)	98 ^(77,8)
Hpa1 ₃₃₋₁₀₅	36	3 ^(8,3)	33 ^(91,7)
Hpa1 ₅₈₋₁₃₇	126	13 ^(10,3)	113 ^(89,7)
Hpa1 ₁₀₆₋₁₃₇	96	5 ^(5,2)	91 ^(94,8)

Tabla 7.2. Resumen de la cantidad de clones analizados para cada construcción, indicando cuantas presas con potencial interés fueron encontradas. Dentro de la última columna (Clones descartados) se encuentran todos los clones que fueron considerados como negativos, como se detalla en el texto. Se indica en cada caso el porcentaje (%) que representan del total de clones analizados.

En ausencia de una interacción proteína-proteína, el gen reportero *ADE2* no se transcribe, y por lo tanto se acumula un intermedio de la vía metabólica de adenina de color rojo, el cual tiñe las colonias del mismo color. La activación del gen *ADE2* por una interacción proteína-proteína conduce a la expresión del producto del gen *ADE2* y desbloquea la vía, dando colonias de color blanco. Por esta razón, las células PJ69-4a crecidas en el medio Sc-WHLA que expresan un par de proteínas que interactúan mostrarán un color desde rosa muy débil hasta blanco, en función de la fuerza de la interacción. Sin embargo, no hay ninguna razón para suponer que las interacciones débiles tienen menos importancia biológica que las fuertes.

Basados en esta característica de la cepa de levadura, las proteínas presas encontradas y consideradas potencialmente de interés fueron chequeadas para determinar si la interacción con su proteína carnada es fuerte o débil. A modo de ejemplo de los resultados obtenidos de este ensayo, en la Figura 7.3 se muestra una placa de Petri con dos clones analizados para el ensayo de interacción con HrpE, uno donde la interacción fue fuerte (pOAD-B06), y otro donde la misma fue más débil (pOAD-D08). También se muestran los controles negativos utilizando el vector pOBD-HrpE y el pOAD vacío, y el vector pOBD vacío y el pOAD-B06.

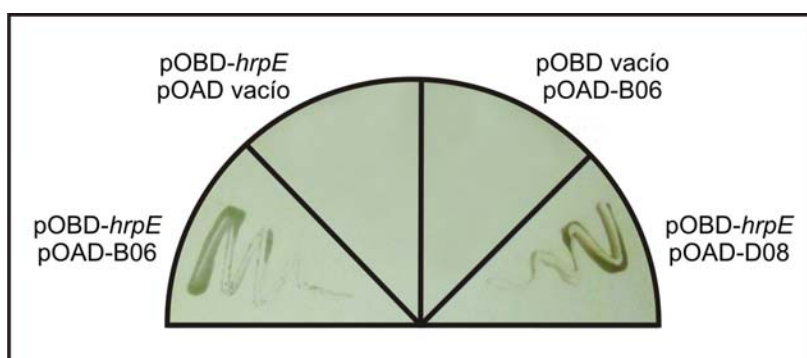


Figura 7.3. Foto de placa de una prueba de fuerza de interacción utilizando como carnada a la proteína HrpE. A modo de ejemplo, se muestran los controles negativos realizados y el chequeo de dos clones presa, con los que la interacción con HrpE fue fuerte (pOAD-B06, color de colonia blanco) y débil (pOAD-D08, color de colonia rosácea).

Luego de este análisis, se seleccionaron las interacciones más fuertes para cada proteína analizada, específicamente para el ensayo de interacción de HrpE se encontraron 16 proteínas presa de potencial interés; para Hpa1₁₋₃₂ fueron 14; para Hpa1₁₋₅₇ fueron 13; para Hpa1₅₈₋₁₃₇ fueron 11; para Hpa1₃₃₋₁₀₆ y Hpa1₁₀₆₋₁₃₇ fueron 3. El análisis de las proteínas encontradas se realizó tomando en cuenta diversos parámetros, tales como la ubicación celular de la proteína encontrada, su ubicación dentro de los distintos tejidos de la planta, la función que la misma desarrolla en la célula, entre otros. La ubicación en los tejidos de la planta y subcelular para cada proteína encontrada se determinó utilizando el programa computacional eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) basados en homólogos de *A. thaliana*.

7.2. Análisis de las interacciones entre HrpE y proteínas de *Citrus sinensis*

HrpE					
Proteína detectada	Especie	Nº de acceso	Frec.	Func. #	Ubic. &
Proteína del gen de soja regulado por frío 2	<i>Theobroma Cacao</i>	EOY06486.1	2	S B/A	Nu/Clo
Proteína hipotética CICLE_v10030683mg	<i>Citrus Clementina</i>	XP_006438440.1	2	RC	Ci/Mi/Clo
Proteína Relacionada con la Patogénesis 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179068.1	1	S B/A	Va/Ex
Subunidad 5 del complejo signalosoma COP9	<i>Cucumis sativus</i>	XP_004138765.1	1	DP	Ci/Nu/Ex
Proteína precursora relacionada a Lectina	<i>Citrus x paradisi</i>	AAG38522.1	1	S B/A	Ci/Ex
Proteína tipo YLS9	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006481585.1	1	S B/A	Ci/Ex/Mi/Nu
Proteína tipo BI1	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006443997.1	1	MC	Mi/Nu/MC
Transportador de cobre	<i>Theobroma cacao</i>	EOY33888.1	1	TRAN	Ex/Va/Clo
Ubiquitina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ACA58351.1	1	DP	Ci/Mi
Factor depolimerizante de Actina	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006489736.1	1	RC	Ci/Ex/Clo
Dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato/Fe(II)	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006472537.1	1	HORM	Ci/Nu/Per
Proteína asociada al estrés con dominios dedos de zinc	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006482901.1	1	S B/A	Ex/Mi/Nu
Translocador de azúcar-fosfato/fosfato tipo At3g11320	<i>Cucumis sativus</i>	XP_004150243.1	1	TRAN	Ex/Mi/MC
Proteína rica en glicina	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006469561.1	1	S B/A	Ex/Nu/Per
Proteína tipo Metalotioneína	<i>Citrus unshiu</i>	AF320905_1	1	REDOX	Ex/Mi/Clo
Proteína quinasa receptora del tipo At5g24010	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002278060.1	1	KIN	Ex/MC/Va

Tabla 7.3. Resumen de las interacciones entre la proteína HrpE y proteínas de plantas de naranja observadas en este estudio. # Basado en trabajos relacionados a cada proteína analizada. HORM: Metabolismo de hormonas. S B/A: Asociado a defensa por estrés biótico o abiótico. REDOX: Homeostasis Redox. DP: Degradación de proteínas. TRAN: Transportador de iones, azúcares y otros. KIN: Quinasas receptoras. MC: Muerte celular. RC: Reordenamiento celular. MET: Metabolismo. CC: Ciclo celular. ?: Desconocido. & Basado en gen homólogo de *A. thaliana* utilizando en programa computacional eFP Browser. Ci: Citosol. Clo: Cloroplasto. Nu: Núcleo. Va: Vacuola. Per: Peroxisoma. Ex: Extracelular. MC: Membrana celular. Mi: Mitocondria.

La lista de posibles proteínas blanco de naranja encontrada para HrpE de Xac se encuentran en la Tabla 7.3, y muestra una diversa variedad de proteínas con funciones conocidas y desconocidas, entre las que se encontraron proteínas cuyos genes se ven inducidos, o forman parte de la defensa frente a algún estrés tanto abiótico como biótico, proteínas pertenecientes a los mecanismos de degradación de otras proteínas como, enzimas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula, proteínas de membrana tanto quinasas sensoras como transportadores de iones o azúcares, enzimas involucradas en la producción de fitohormonas, y proteínas relacionadas con el reordenamiento y la muerte celular. Una breve descripción de las proteínas más relevantes con las que interactúa HrpE se detalla a continuación.

Dentro de las proteínas asociadas a distintos tipos de estreses, se puede destacar la proteína del gen de soja regulado por frío 2, SRC2 (por Soybean gen Regulated by Cold 2) de *Theobroma cacao*. El gen de pimiento *CaSRC2-1* (*Capsicum annum* SRC2-1) fue significativamente inducido en respuesta a la infiltración con la bacteria no patogénica *X. axonopodis* pv. *glycines* 8ra, la cual provoca una HR en esta especie de planta (Kim *et al.*, 2008). *CaSRC2-1* codifica una proteína que contiene un dominio C2 (dominios reguladores de Ca²⁺), el cual exhibe un alto grado de homología con los genes de proteínas de soja regulados por el frío 2 (SRC2) (Kim *et al.*, 2008), lo que es ampliamente conservado entre especies de plantas. Poco se sabe acerca de cómo la expresión de *SRC2* aumenta con el estrés biótico. La transcripción de *CaSRC2-1* aumenta tanto en condiciones de estrés biótico como abiótico, incluyendo la infección por patógenos bacterianos y virales, y tratamiento de frío (Kim *et al.*, 2008). Por ensayos de localización se determinó que *SCR2* se ubica en la membrana plasmática (Kim *et al.*, 2008).

Dentro de este mismo grupo, también se destaca la proteína Relacionada con la Patogénesis 1 (PR1, por Pathogenesis-Related protein 1) de *A. thaliana* (At2g14610). Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) se clasifican en 17 familias, y se caracterizan por acumularse luego de la infección por patógenos, o situaciones relacionadas, en muchas especies de plantas (van Loon *et al.*, 2006). Entre las familias de genes *PR*, los genes *PR1* se han utilizado con frecuencia como marcadores de resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés Systemic Acquired Resistance) en muchas especies de plantas. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de genes *PR1* han sido estudiados de entre los muchos miembros de

esta familia, y la información sobre los demás miembros es limitada (Mitsuhara *et al.*, 2008). Por ejemplo, los genes *NtPR1a*, *b*, y *c* codifican para proteínas ácidas y los genes *NtPRB1 (PR1g)* y *NtPRB1b* para proteínas básicas, todos ellos reportados en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (van Loon y van Strien, 1999), pero existe poca información sobre otros miembros *PR1*. En *A. thaliana* existen resultados que apoyan fuertemente la noción de que la cascada de MAP quinasas son parte de una vía de señalización que regula la expresión de *PR1* (Dóczi *et al.*, 2007). Entre los 22 genes que figuran como genes *PR1* predichos que codifican proteínas homólogas a la proteína PR1a de tabaco en Arabidopsis, sólo uno (At2g14610), es conocido por responder contra patógenos, y los otros genes *PR1* reportados no respondieron a agentes patogénicos bacterianos o fúngicos (van Loon *et al.*, 2006).

Por otra parte, también se encontró una proteína precursora de Lectina de *Citrus x paradisi*. Lectina es una designación que se da a las proteínas o glicoproteínas que generalmente se unen a carbohidratos sin modificarlos bioquímicamente. Un dominio de reconocimiento de carbohidratos puede vincularse a otros dominios funcionales en la proteína, por ejemplo un dominio con actividad enzimática (Gabiús *et al.*, 2002; Loris, 2002). El reconocimiento de carbohidratos se produce en un gran número de diferentes contextos biológicos. Por lo tanto, las lectinas son un grupo muy diverso de proteínas que consisten de muchas familias de proteínas no relacionadas (Loris, 2002). Las lectinas de plantas tienen una alta estabilidad a la temperatura y pH, y son resistentes a una variedad de enzimas proteolíticas, una característica común a la mayoría de las proteínas implicadas en los mecanismos de defensa de la planta (Gupta *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2013). Las preguntas sobre el papel biológico y mecanismo de acción de las lectinas de plantas ha sido objeto de investigación por mucho tiempo, lo que refleja la amplia diversidad y la actividad potencial de estas proteínas en la defensa de la planta; entre ellas, antifúngica, insecticida, antinutricional y tóxica (Yan *et al.*, 2005); y antibacteriana, a través de la inducción de genes relacionados con la defensa y la acumulación de ácido salicílico (SA) tras el reconocimiento de patógenos microbianos (Hwang y Hwang, 2011). También se ha observado que la expresión de algunas lectinas de plantas aumenta como consecuencia de estímulos bióticos o abióticos tales como estrés, infección por virus, sequía, o alta concentración de sal (Antonyuk y Evseeva, 2006). En el año 2007 se publicaron dos trabajos científicos donde se demostró que el mismo gen codificante para la lectina presentada en la Tabla 7.3 se encuentra

positivamente regulado en hojas de plantas de *C. sinensis* cuando las mismas son infectadas con *Xylella fastidiosa*, agente causal de la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), o con el Virus de Leprosis Cítrica tipo Citoplásmico (CiLV-C), causante de la Leprosis Cítrica (Freitas-Astúa *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2007); lo que estaría sugiriendo más aún que este producto génico de lectina puede estar teniendo una función en la defensa de la planta ante dichas infecciones.

Otra de las proteínas encontradas que está asociada a diversos estreses es la proteína tipo YLS9 de *C. sinensis*. Esta proteína tiene su homólogo con el mismo nombre en *A. thaliana*, AtYLS9, y se conoce también como Glicoproteína LEA (por Late Emryogenesis Abundant) rica en hidroxiprolinas. El gen *y/ls9* encontrado codifica una proteína cuya secuencia es similar al gen inducido por harpin HIN1 (por Harpin-Induced gene) de tabaco, y al gen de resistencia a enfermedad no específica de raza NDR1 (por Non-race specific Disease Resistance gene) de Arabidopsis (*AtNDR1*). La expresión de estos genes es inducida por el virus del mosaico del pepino, espermina y durante la senescencia (Zheng *et al.*, 2004). AtNDR1 está involucrada en algunos mecanismos de resistencia mediada por genes R, en respuesta al ataque tanto por patógenos bacterianos como fúngicos (Century *et al.*, 1995 y 1997).

Dentro del grupo de las proteínas transportadoras, se puede destacar el transportador putativo de cobre de *Theobroma cacao*. El cobre, un micronutriente esencial de las plantas, es un elemento importante ya que además suprime el crecimiento de diversas especies del género *Xanthomonas*. La familia de proteínas COPT (por COPper Transporter) de arroz se compone de siete miembros (COPT1 a COPT7). Sin embargo sólo dos, COPT1 y COPT5, se han caracterizadas por sus funciones en el transporte de este metal (Yuan *et al.*, 2011). Muchos efectores modifican directamente las defensas del hospedador mediante la alteración de la fosforilación, la degradación de proteínas o la interferencia de ARN, pero una clase de efectores del tipo activador de transcripción TAL (por Transcription Activator-Like) del patógeno *Xanthomonas* activa directamente la transcripción de genes del hospedador. Estos genes blanco facilitan la infección por parte del patógeno (Mach, 2010). De hecho, la alteración de estos para hacer insensibles al efector TAL puede producir alelos resistentes. Por ejemplo, el alelo *xa13* de arroz confiere resistencia a la activación transcripcional por un efector TAL de la cepa *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) PXO99, lo que resulta en una resistencia recesiva específica para esta cepa

(Mach, 2010). El gen *xa13* codifica para una proteína indispensable de membrana plasmática, frecuente en eucariotas y con función bioquímica desconocida. Se ha demostrado que la proteína XA13 interactúa con otras dos proteínas, COPT1 y COPT5, para promover la eliminación de cobre de los vasos del xilema, donde se multiplica y se propaga *Xoo* para causar la enfermedad. La participación de XA13 en la redistribución de cobre ha llevado a proponer un mecanismo de virulencia bacteriana para *Xoo* en plantas de arroz (Yuan *et al.*, 2010).

Una proteína blanco de HrpE encontrada y relacionada con la degradación proteica es la Ubiquitina de *A. thaliana*, la cual, aunque no es igual en su secuencia, comparte características y rol con la proteína Ubiquitina de *Ricinus communis* encontrada en el ensayo realizado con el fragmento Hpa1₁₋₅₇. Una breve descripción de sus características se encuentra desarrollada en la Sección 7.3., correspondiente a dicho fragmento.

Dentro del grupo de proteínas relacionadas con el reordenamiento celular, se puede destacar la proteína del tipo factor depolimerizante de Actina de *C. sinensis*. El comportamiento dinámico de los filamentos de actina está regulado por una gran variedad de proteínas de unión a esta, entre las cuales está la familia de proteínas Factores Depolimerizantes de Actina (ADF, por Actin-Depolymerizing Factor). Se ha publicado un trabajo científico donde se demostró que la dinámica de actina desempeña un papel importante en la activación de la resistencia gen-por-gen en *A. thaliana* tras la inoculación con el fitopatógeno *P. syringae* pv. *tomato*, utilizando un enfoque de genética inversa. Así se determinó que AtADF4 (Actin-Depolymerizing Factor 4) es requerido específicamente para la resistencia inducida por el efector AvrPphB pero no por AvrRpt2 o AvrB, demostrando que AtADF4 media la señalización de la defensa a través de la modificación del citoesqueleto de actina (Tian *et al.*, 2009). El mismo grupo de investigación publicó posteriormente otro trabajo donde demostraron además que la expresión de RPS5, la proteína de resistencia a AvrPphB, se redujo drásticamente en la línea mutante *adf4*, lo que sugiere una mayor relación entre la dinámica del citoesqueleto de actina y la regulación transcripcional de genes codificantes para proteínas R (Porter *et al.*, 2012).

Una proteína encontrada relacionada con el estado redox de la célula hospedadora es la proteína tipo Metalotioneína de *C. unshiu*. Las metalotioneínas son proteínas ricas en residuos de cisteína con bajo peso molecular, el cual varía

desde 3,5 a 14 kDa. Existen un número de informes que explican el papel o la participación de la metalotioneína en los mecanismos de defensa de las plantas, al actuar al mismo tiempo como un inductor de la producción y como un supresor de la eliminación de ROS (Hassinen *et al.*, 2011; Grennan, 2011). Además existe un trabajo científico realizado en *C. jambhiri* que indica que las metalotioneínas pueden actuar como un factor de defensa de la planta, mediante el control de la producción de la toxina ACR del fitopatógeno fúngico *Alternaria alternata*, determinante para el desarrollo de enfermedad en limón rústico por el mismo (Nishimura *et al.*, 2013).

La única proteína receptora encontrada en este ensayo de doble híbrido con HrpE de Xac es la probable proteína quinasa receptora del tipo At5g24010 de *Vitis vinifera*. En las plantas, la formación de órganos y el alargamiento de las células requieren un ajuste constante de la pared celular en respuesta a señales ambientales, como así también a reguladores internos tales como, luz estrés mecánico, ataques de patógenos, fitohormonas, y otras moléculas de señalización. Los mecanismos moleculares que perciben estas señales y las traducen en respuestas celulares para mantener la integridad y la remodelación de la pared celular para la coordinación del crecimiento celular son aún poco conocidos (Boisson-Dernier *et al.*, 2011). Utilizando la técnica de AFLP (por cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism), se encontró que el gen para la Proteína Quinasa Receptora de *A. thaliana* At5g24010 no se ve afectado en plantas tratadas con la hormona vegetal etileno (de Paepe *et al.*, 2004). Posteriormente se publicó un trabajo donde se indicó que esta misma proteína se ve acumulada en membranas celulares de plantas de *A. thaliana* tratadas con la molécula PAMP flagelina (flg22), junto con otras proteínas de membrana, indicando que los cambios dinámicos de la membrana pueden ser inducidos por PAMPs, y sugiriendo la existencia de cambios en la compartimentalización de los componentes de membrana involucrados en las vías de señalización de moléculas PAMP (Keinath *et al.*, 2010).

7.3. Análisis de las interacciones entre Hpa1 y proteínas de *Citrus sinensis*

Hpa1										
Proteína detectada	Especie	Nº de acceso	Frec.	Func.#	Ubic.&	A	B	C	D	E
Proteína de choque térmico 26,5 kDa	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006465333.1	15	S B/A	Mi/Nu/Clo		X	X		
Subunidad 5 del complejo signalosoma COP9	<i>Cucumis sativus</i>	XP_004138765.1	6	DP	Ci/Nu/Ex	X				X
Lipoxigenasa	<i>Citrus jambhiri</i>	BAB84352.1	4	HORM	Ci/Mi/Clo		X		X	
Proteína similar a Miraculina tipo 2	<i>Citrus japonica</i>	AFR54471.1	3	S B/A	Ci/Ex	X				X
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Brassica napus</i>	ADP37980.1	3	MET	Ci/Mi/Va Per/MC	X				X
Proteína Relacionada con la Patogénesis 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179068.1	3	S B/A	Va/Ex		X	X		
Proteína de transferencia de lípidos no específica tipo 2	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002284213.1	2	S B/A	Ex/Mi	X			X	
Proteína relacionada al estrés	<i>Citrus sinensis</i>	ABK06393.1	2	S B/A	Va/Ex			X	X	
Catalasa	<i>Citrus maxima</i>	ACY30463.1	2	REDOX	Ex/Clo Mi/Per	X	X			
Proteína precursora relacionada a Lectina	<i>Citrus x paradisi</i>	AAG38522.1	1	S B/A	Ci/Ex/Clo	X				
Proteína hipotética CICLE_v10002351mg	<i>Citrus clementina</i>	ESR47894.1	1	TRAN	Mi/Nu/Clo	X				
Tetraspanina 3	<i>Theobroma cacao</i>	EOY33112.1	1	RC	Ex/Mi/MC	X				
α/β Hidrolasa	<i>Theobroma cacao</i>	EOX91611.1	1	MET	Ex/Mi/MC	X				
Proteína hipotética CICLE_v10032182mg	<i>Citrus clementina</i>	XP_006438869.1	1	S B/A	Ci/MC	X				
Proteína F17A17.37	<i>Theobroma cacao</i>	EOX96650.1	1	?	Ci/Ex/Mi	X				
Quitinasa ácida clase I	<i>Citrus jambhiri</i>	BAC20284.1	1	S B/A	Ex/Clo/Va	X				
Lipoxigenasa 6	<i>Glycine max</i>	XP_003531186.1	1	HORM	Ci/Mi/Clo	X				
Proteína del gen de soja regulado por frío 2	<i>Theobroma cacao</i>	EOY06486.1	1	S B/A	Nu/Clo	X				

(cont.)

Proteína hipotética CICLE_v10030683mg	<i>Citrus clementina</i>	XP_006438440.1	2	RC	Ci/Mi/Clo	X			
Carboxipeptidasa	<i>Cicer arietinum</i>	XP_004500881.1	1	MET	Ci/Mi	X			
Cisteína proteasa	<i>Citrus sinensis</i>	ABS12459.1	1	MC	Ci/Ex/Clo	X			
Cupredoxina	<i>Theobroma cacao</i>	EOY31108.1	1	REDOX	Ex/Mi	X			
Ubiquitina	<i>Ricinus communis</i>	XP_002521706.1	1	DP	Ci/Nu	X			
Subunidad β del Proteosoma 20S	<i>Ricinus communis</i>	XP_002526049.1	1	DP	Ci/Mi	X			
Quinasa dependiente de Ciclina tipo F-4	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006471340.1	1	CC	Mi/Nu	X			
Proteína no caracterizada LOC102625206	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006466180.1	1	?	Ci	X			
Proteína tipo Cistatina	<i>Citrus x paradisi</i>	ESR45011.1	1	S B/A MC	Clo/Ex	X			
NADH-Citocromo b5 reductasa	<i>Glycine max</i>	XP_003520929.1	1	MET	Ci/Ex Mi/MC				X
Citocromo b5 isoforma 1	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006493156.1	1	MET	Ci/Mi/Nu Clo/MC				X
Proteína multifuncional tipo AIM1 de β -oxidación de ácidos grasos	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006475648.1	1	MET	Ci/Per/Clo				X
Cisteína proteasa tipo RD21a	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006473275.1	1	DP	Va/Clo/Ex				X
Glutamato descarboxilasa tipo 5	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006478102.1	1	S B/A MET	Ci/Mi				X
Malato deshidrogenasa	<i>Citrus junos</i>	ABI75147.1	1	MET REDOX	Mi/Un Clo/Va				X
Proteína no caracterizada LOC102629686	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006482483.1	1	?	Ci/Mi				X
Superóxido dismutasa Cu/Zn	<i>Citrus sinensis</i>	CAA03881.1	1	REDOX	Ci				X

Tabla 7.4. Resumen de las interacciones entre la proteína Hpa1 y proteínas de plantas de naranja observadas en este estudio, tomando en cuenta las proteínas blanco que aparecieron en las interacciones con al menos dos fragmentos distintos de la proteína.

Basado en trabajos relacionados a cada proteína analizada.

HORM: Metabolismo de hormonas. S B/A: Asociado a defensa por estrés biótico o abiótico. REDOX: Homeostasis Redox. DP: Degradación de proteínas. TRAN: Transportador de iones, azúcares y otros. KIN: Quinasas receptoras. MC: Muerte celular. RC: Reordenamiento celular. MET: Metabolismo. CC: Ciclo celular. ?: Desconocido.

& Basado en gen homólogo de *A. thaliana* utilizando en programa computacional eFP Browser.

Ci: Citosol. Clo: Cloroplasto. Nu: Núcleo. Va: Vacuola. Per: Peroxisoma. Ex: Extracelular. MC: Membrana celular. Mi: Mitocondria.

A (Hpa1₁₋₃₂), **B** (Hpa1₁₋₅₇), **C** (Hpa1₃₃₋₁₀₅), **D** (Hpa1₅₈₋₁₃₇), **E** (Hpa1₁₀₆₋₁₃₇).

De la misma forma que ocurrió con HrpE, la lista de proteínas blanco de naranja encontrada para los distintos fragmentos de Hpa1 de Xac arrojó una diversa variedad de proteínas con funciones desconocidas y conocidas (Tabla 7.4). Realizando un análisis de los resultados encontrados para cada fragmento, se logró determinar un conjunto de proteínas que fueron observadas en los estudios de interacción con al menos dos de estos. Estas proteínas de plantas indican, entre otros aspectos, la posible existencia de regiones involucradas directamente en una interacción en particular.

Dentro de las proteínas asociadas a distintos tipos de estreses, se puede destacar la proteína de choque térmico de 26,5 kDa de *C. sinensis*. Casi todos los estreses inducen la síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de choque térmico (Hsp, por Heat shock protein). En plantas, estas proteínas se agrupan en cinco clases de acuerdo a su peso molecular aproximado: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y las Pequeñas Proteínas de Choque Térmico (sHsp, por small Hsp). Las plantas superiores pueden poseer entre 20 y 40 sHsps (Al-Whaibi, 2010). Se sabe que las Hsp están involucradas en la respuesta a diversas formas de estrés además del calor. Sin embargo, el papel de las Hsp en condiciones de estrés por frío y estrés no térmico no se comprende bien (Swindell *et al.*, 2007). Las Hsps se unen y estabilizan las proteínas que se han desnaturalizado durante las condiciones de estrés, y funcionan como chaperones moleculares que impiden la agregación de proteínas (Bartels y Sunkar, 2005). En *Arabidopsis*, la actividad chaperona de las Hsps durante el estrés biótico ha demostrado ser importante para la estabilidad y la acumulación de proteínas de resistencia R, y para la coordinación de la cascada de señalización de toda la defensa (Botër *et al.*, 2007). El conocimiento del rol que tienen las sHsps en los mecanismos de defensa a estrés biótico es muy variado entre las diferentes especies de plantas. Recientemente se publicó un trabajo donde se determinó que la familia de genes *GmHsp20* de *Glycine max* está involucrado en la respuesta al estrés biótico (Lopes-Caitar *et al.*, 2013).

Dentro de este mismo grupo, también se destaca una proteína similar a Miraculina de tipo 2 (MLP2, por Miracullin-Like Protein 2) de *C. japonica*. En el año 2006 se publicó un trabajo científico donde se encontraron, en plantas de *C. jambhiri*, dos genes que expresan para esta proteína, *rlemMLP1* y *rlemMLP2* (Tsukuda *et al.*, 2006). La transcripción de los mismos no fue detectada en hojas y tallos, pero sí en frutos. Sin embargo, las transcripciones se acumularon a niveles

más altos en las hojas luego de dañarlas mecánicamente, inocularlas con el fitopatógeno fúngico *Alternaria alternata*, o tratarlas con vapores de la hormona vegetal metil jasmonato. A su vez, los productos proteicos de ambos genes demostraron tener actividad de inhibidor de proteasas (Tsukuda *et al.*, 2006), hecho esperado ya que la miraculina pertenece a la familia de inhibidores de proteasas del tipo Kunitz. Sólo la proteína RlemMLP2 mostró actividad antifúngica contra *Alternaria citri*. Un análisis de la localización celular de RlemMLP1 y RlemMLP2 indicó que ambas se localizan en el citoplasma (Tsukuda *et al.*, 2006), aunque más recientemente se demostró que es también secretada en los espacios intercelulares en las células vegetales (Hirai *et al.*, 2010).

Por otra parte, también se encontró la proteína Relacionada con la Patogénesis 1 (At2g14610) de *A. thaliana*, encontrada también en el ensayo realizado con la proteína HrpE. Una breve descripción de sus características se encuentra desarrollada en la Sección 7.2.

Otra de las proteínas encontradas que está asociada a diversos estreses es la proteína de transferencia de lípidos no específica tipo 2 de *V. vinifera*. Las NsLTPs (por Non-specific Lipid Transfer Proteins) se clasifican en dos subfamilias de acuerdo con sus pesos moleculares: NsLTP1 (9 kDa) y NsLTP2 (7 kDa), y son conocidas por participar en la defensa de la planta (Cheng *et al.*, 2004). Las LTPs pueden ser componentes importantes de la defensa directa contra bacterias y hongos patógenos, hecho que se ha observado *in vitro* en extractos de proteínas de una gran variedad de plantas incluyendo rábano, cebada, *A. thaliana*, espinaca y cebolla (Yeats y Rose, 2007). Cada una de estas isoformas inhibe el crecimiento de bacterias y hongos patógenos en diversos grados, dependiendo de la isoforma y del patógeno. Si bien el mecanismo de toxicidad de las LTPs no es del todo claro aún, parece que depende de la capacidad de estas para promover la permeabilización de la membrana del patógeno, pero no la del hospedador (Cammue *et al.*, 1995; Regente *et al.*, 2005). Un hecho que apoya la idea sobre el papel defensivo de las LTPs proviene del análisis de sus patrones de expresión, ya que muchas son inducidas a partir de la inoculación con patógenos, lo que conduce a la definición de las LTPs como una familia de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), llamada PR-14 (van Loon y van Strien, 1999).

Por último, dentro de este grupo de proteínas también se encontró una proteína relacionada a estrés de *C. sinensis*. Por análisis de secuencia, esta

proteína pertenece a la familia de proteínas Relacionadas con la Patogenicidad 10 (PR10), ya que presenta una alta homología de secuencia con la proteína PR10 de *Nicotiana tabacum* y otras especies de plantas. Esta familia de proteínas se compone de diversos miembros subagrupados en clases, que contienen diferentes funciones. Se cree que las proteínas PR10 están implicadas en la defensa de la planta debido a que sus genes están normalmente inducidos en un gran número de especies de plantas en respuesta a ataques por agentes patogénicos, incluyendo bacterias (Esnault *et al.*, 1993), virus y hongos (Liu y Ekramoddoullah, 2006).

Una proteína blanco encontrada y relacionada con la degradación proteica es la subunidad 5 del complejo signalosoma COP9 de *C. sativus*. Esta subunidad, llamada por la abreviatura CSN5 (por Constitutively Photomorphogenic 9 (COP9) Signalosome subunit 5 tiene actividad de derubilación (Cope *et al.*, 2002; Maytal-Kivity *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2003; Ambroggio *et al.*, 2004), la cual es caracterizada por la eliminación de RUB1 (por Related to Ubiquitin), una proteína del tipo ubiquitina (Ub) (Wei y Deng, 2003; Chew y Hagen, 2007). El complejo COP9, descubierto originalmente como un complejo esencial que regula el desarrollo inducido por luz en *Arabidopsis* (Wei y Deng, 1992; Wei *et al.*, 1994 y 1998; Chamovitz *et al.*, 1996), tiene un papel central en la regulación de la vía de degradación proteica Ub/Proteosoma 26S, por lo que participa en diversos procesos celulares y de desarrollo, incluyendo la progresión del ciclo celular, la expresión génica, las respuestas de las plantas a la luz y hormonas, y la señalización en la defensa contra patógenos (Wei y Deng, 2003; Wolf *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002). La vía Ub/Proteosoma 26S media la degradación de proteínas y es el sistema de eliminación de proteínas dominante en plantas (Dreher y Callis, 2007). Los sustratos son primeramente poliubiquitinados y luego son degradados por el Proteosoma 26S (Smalle y Vierstra, 2004). En un trabajo en el que se desarrollaron plantas transgénicas de fenotipo no letal delecionando el gen que codifica para CSN5, se demostró que el signalosoma COP9 juega un papel importante en la degradación de un sustrato de SCF^{TIR} (un complejo Ligasa E3 de Ub) en la respuesta a auxina (Schwechheimer *et al.*, 2001), lo que sugiere que COP9 podría desempeñar un rol aún mayor en la mediación de respuestas a través de ligasas E3 de Ub. La ubicación de AtCSN5 de *A. thaliana* en diversos compartimentos celulares sugiere que su función puede estar distribuida ampliamente en la célula y su entorno, aunque su función final dentro del complejo COP9 se produzca en el núcleo.

Dentro del grupo de proteínas relacionadas con la síntesis de fitohormonas, se encontró la enzima Lipoxigenasa de *C. janthini*. Al realizar un análisis de la secuencia de esta enzima, la misma demostró tener una alta homología con la enzima lipoxigenasa 2 (LOX2) de diversas especies. La peroxidación lipídica, desencadenada por lipoxigenasas (LOXs) y especies reactivas de oxígeno, es una característica distintiva de la respuesta a patógenos por parte de las plantas, tanto en los procesos de transducción de señales como durante la ejecución de la muerte celular programada. Típicamente, las LOXs oxidan ácidos grasos libres en el citosol o cloroplastos, iniciando de este modo varias vías para la generación de oxilipinas, una familia de moléculas en las que están incluidas las fitohormonas jasmonatos (Mosblech *et al.*, 2009). Se sabe que el gen *lox2* de *A. thaliana* codifica para una 13-lipoxigenasa, un tipo de LOX involucrada en el primer paso de la biosíntesis de los jasmonatos (Grebner *et al.*, 2013). El gen *lox2* es altamente expresado en hojas por tratamientos de estrés, como heridas y estrés osmótico (Grebner *et al.*, 2013); y LOX2 demostró contribuir a la síntesis de la mayoría de los jasmonatos producidos por heridas y estrés osmótico, y durante la senescencia de las hojas (Bell *et al.*, 1995; Glauser *et al.*, 2009).

Una proteína encontrada relacionada con el metabolismo celular es la enzima glicolítica Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PdH) de *Brassica napus*. El establecimiento y mantenimiento de un sumidero metabólico es un aspecto crucial en la patogénesis de plantas que ha recibido muy poca atención en comparación con las señalizaciones implicadas en el reconocimiento inicial de un patógeno (Chanda *et al.*, 2008). La colonización por un patógeno se asocia con múltiples cambios metabólicos en la planta hospedadora y, especialmente, con aumentos en la expresión de muchos genes que codifican proteínas implicadas en los ciclos de nutrientes como azúcares, aminoácidos, y el transporte de minerales (AbuQamar *et al.*, 2006). Hay evidencia que sugiere que los componentes del metabolismo primario pueden actuar como señales regulando diversos aspectos de defensa de la planta (Schaaf *et al.*, 1995; Ehness *et al.*, 1997; Scheideler *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2003; Lipka *et al.*, 2005; Chandra-Shekara *et al.*, 2007). En plantas, la expresión de la enzima glicolítica G3PdH se induce bajo estrés ambiental, observado en hojas y tallos de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) inoculados con *Pseudomonas infestans*, tratados con ácido eicosapentaenoico (un elicitor encontrado en *P. infestans*) o ácido salicílico (una señal endógena para la inducción de resistencia

sistémica adquirida, SAR) (Laxalt *et al.*, 1996). Por otra parte, desde el año 2008 se sugiere que esté implicada en la respuesta al estrés a través del sistema de defensa antioxidante previniendo la muerte celular mediada por peróxido de hidrógeno (Baek *et al.*, 2008).

La única proteína encontrada relacionada con el estado redox de la célula hospedadora es la enzima Catalasa de *C. maxima*. Aunque el H₂O₂ es esencial para señalar la invasión del patógeno y así la defensa, la acumulación en exceso de este conduce a un estrés oxidativo que puede dañar los distintos tejidos de la planta. La enzima catalasa elimina el H₂O₂ promoviendo su conversión en H₂O y O₂, regulando de esta forma la cantidad de peróxido de hidrógeno en los tejidos (Davletova *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 1999; Mittler, 2002; Willekens *et al.*, 1997). De no ser eliminado, el H₂O₂ puede dañar las células reaccionando con otras biomoléculas derivando a un estrés oxidativo (Dat *et al.*, 2001). Las catalasas son importantes en el desarrollo de la planta, la defensa, el envejecimiento y la senescencia; consecuentemente están bajo una regulación temporal y espacial estricta (Magbanua *et al.*, 2007). En estudios de doble híbrido en levaduras llevados a cabo entre la proteína de avirulencia AvrPto de *P. syringae* y proteínas provenientes de plantas de tomate, se identificó una catalasa que interactúa con la proteína de resistencia de planta Pto de manera dependiente de AvrPto, por lo que fue denominada como Adi1 (por AvrPto-dependent Pto-interacting). Los autores postularon que una interacción entre Adi1 y Pto en la planta podría resultar en la inactivación parcial o cambio de conformación de la catalasa, pudiendo estar contribuyendo al estallido oxidativo que resulta de la infección por patógenos para eliminar este último. En este modelo, AvrPto estaría reactivando a Adi1 para que se produzca la eliminación de las ROS y así mejorar su patogenicidad (Bogdanove y Martin, 2000).

Además, se obtuvieron otras proteínas que mostraron tener una posible interacción exclusivamente con el fragmento amino terminal Hpa1₁₋₃₂.

Dentro de las proteínas asociadas a distintos tipos de estreses, se pueden destacar una proteína precursora de Lectina de *Citrus x paradisi* y la proteína del gen de soja regulado por frío 2 de *Theobroma cacao*, encontradas también en el ensayo realizado con la proteína HrpE. Una breve descripción de sus características se encuentra desarrollada en la Sección 7.2.

En este mismo grupo de clasificación, también se destaca la proteína hipotética CICLE-v10032182mg de *C. clementina*, la que tiene una alta homología con la proteína Anexina de *Ricinus communis*. Las anexinas son proteínas solubles multifuncionales capaces de unirse a membranas, están distribuidas por toda la planta durante todo el ciclo de vida, y su expresión y localización intracelular están bajo el control del desarrollo y el ambiente. Potencialmente, podrían operar en las rutas de señalización que involucran al Ca^{2+} libre y a las ROS (Mortimer *et al.*, 2007). Además, la expresión de las anexinas se induce por el ataque de bacterias y virus patogénicos, pero el papel específico de éstas en la defensa contra los mismos aún no se ha definido (Clark *et al.*, 2012). También fueron encontradas en el floema de *Ricinus communis* y *Brassica napus* (Barnes *et al.*, 2004; Giavalisco *et al.*, 2006), y se sugirió que una forma en que podrían funcionar en el mismo es a través de la regulación de la enzima Calosa Sintasa, necesaria para cerrar los tubos cribosos luego de una herida (Clark *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se encontró una enzima Quitinasa ácida clase I de *C. jambhiri*. Las quitinasas son enzimas que hidrolizan la N-acetilglucosamina del polímero de quitina, y se producen en diversos tejidos de la planta a lo largo de una amplia gama de especies. La familia de proteínas asociadas a patogénesis 3 (PR3) está conformada por estas enzimas (Datta y Muthukrishnan, 1999), las cuales se expresan constitutivamente en niveles bajos, pero su expresión aumenta considerablemente por numerosos agentes abióticos (etileno, ozono) y bióticos (hongos, bacterias, virus). Diferentes clases de quitinasas vegetales se pueden distinguir por criterios moleculares, bioquímicos y fisicoquímicos. Por lo tanto, las quitinasas vegetales pueden diferir en características por su unión a sustrato, la localización dentro de la célula, y las actividades específicas (Punja y Zhang, 1993). Las quitinasas vegetales a menudo se han agrupado en cuatro clases sobre la base de la estructura primaria (Gomi *et al.*, 2002). Algunas quitinasas tienen también actividad lisozimáticas y pueden hidrolizar los peptidoglicanos en las paredes celulares bacterianas (Conrads-Strauch *et al.*, 1990; Jekel *et al.*, 1991). Cabe destacar que la enzima encontrada en este análisis contiene una región que pertenece a la superfamilia de la lisozimas.

Dentro del grupo de las proteínas involucradas en el metabolismo celular de las células hospedadoras, se encontró una enzima perteneciente a la superfamilia de las α/β Hidrolasas de *Theobroma cacao*. La inoculación de plantas de arroz con

la bacteria no patogénica *P. syringae* pv. *syringae* conduce a la activación de genes relacionados con la defensa y a la resistencia inducida contra el patógeno fúngico *Pyricularia oryzae*. El gen *pir7b* de arroz, un gen relacionado con la defensa inducida por *P. syringae* pv. *syringae*, codifica para una α/β Hidrolasa (Wäspi *et al.*, 1998).

Dentro de las proteínas asociadas a la síntesis de fitohormonas, se encontró a la enzima Lipoxigenasa 6 de *Glycine max*. Como se comentó anteriormente, las oxilipinas son moléculas de señalización ubicuas que derivan de ácidos grasos poliinsaturados en procesos enzimáticos y no enzimáticos. En hojas, los jasmonatos se acumulan tanto en respuesta a factores abióticos como bióticos (Wasternack, 2007). El primer paso en la biosíntesis de jasmonatos es catalizada por las 13-lipoxigenasas, y en *Arabidopsis* LOX6 es uno de los cuatro genes que codifican para éstas (Grebner *et al.*, 2013). En tabaco se requiere la actividad de dos LOXs para la progresión de la HR: una 13-LOX para la síntesis de ácido jasmónico (JA), y una 9-LOX para la peroxidación de ácidos grasos, lo que conduce a los daños en la membrana y la eventual muerte celular (Rustérucchi *et al.*, 1999).

De la misma forma, se obtuvieron otras proteínas que mostraron tener una posible interacción exclusivamente con el fragmento amino terminal Hpa1₁₋₅₇.

Dentro de las proteínas asociadas a los mecanismos de muerte celular, se encontró la enzima Cisteína proteasa de *C. sinensis*. Estas enzimas juegan un papel esencial no sólo en el crecimiento y desarrollo de la planta, sino también en la senescencia y muerte celular programada (PCD, por Programmed Cell Death), y en la acumulación y movilización de proteínas de almacenamiento, participando tanto en procesos anabólicos como catabólicos. Por otra parte, están involucradas en las vías de señalización y en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Grudkowska y Zagdańska, 2004). La regulación de la PCD es de importancia central en las interacciones planta-microorganismo y se observa en muchas de las respuestas de resistencia por parte del hospedador (Dickman y Fluhr, 2013).

Dentro del grupo de las proteínas asociadas al estado redox de la célula hospedadora, se puede destacar la proteína Cupredoxina de *Theobroma cacao*, las cuales contienen un sólo átomo de Cu coordinado, y muestran estructuras tridimensionales similares, potenciales de reducción relativamente altos, y una fuerte absorción cerca de los 600 nm (Dennison, 2005). Las cupredoxinas son proteínas que desempeñan un papel crucial en muchos procesos importantes, como la

fotosíntesis, la respiración, la señalización celular, y muchas otras reacciones redox (Marshall *et al.*, 2009), aunque también pueden regular la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} u otros iones en plantas, y participar en la regulación de ROS producidas en una HR (Nersissian *et al.*, 1998), y se ha informado que su expresión puede ser inducida tanto por estrés abiótico como biótico (Jansen *et al.*, 2005).

Una proteína blanco encontrada y relacionada con la degradación proteica es la Ubiquitina de *Ricinus Communis*. La Ubiquitina (Ub) es una proteína altamente conservada que se une covalentemente a residuos de lisina de proteínas blanco., siendo luego sustrato para la fijación de otras Ub, lo que conduce a la formación de una cadena de poliubiquitinas (Mukhopadhyay y Riezman, 2007). La ubiquitinación puede afectar a las proteínas de muchas maneras, entre ellas: ser señal para la posterior degradación a través del Proteosoma 26S, alterar su localización, afectar su actividad y promover o prevenir interacciones con otras proteínas (Mukhopadhyay y Riezman, 2007; Schnell y Hicke, 2003; Glickman y Ciechanover, 2002).

Otra proteína encontrada perteneciente a este grupo de clasificación es la subunidad β del Proteosoma 20S de *Ricinus cummunis*. Las células vegetales contienen una mezcla de Proteosomas 26S y 20S, que median la proteólisis de forma dependiente e independiente de Ub, respectivamente. El Proteosoma 26S contiene al Proteosoma 20S y una o dos partículas reguladoras que son necesarias para la degradación dependiente de Ub (Kurepa *et al.*, 2009). La oxidación de proteínas en las células se produce continuamente por las ROS generadas durante los períodos de estrés oxidativo, lo que puede convertirse en una amenaza para la supervivencia celular. Se ha demostrado que el Proteosoma 20S reconoce y degrada selectivamente las proteínas ligeramente oxidadas en el citosol, núcleo y retículo endoplasmático, minimizando de este modo su citotoxicidad (Davies, 2001).

Por último, para el caso del fragmento carboxilo terminal Hpa1₅₈₋₁₃₇, una breve descripción de las proteínas encontradas exclusivamente para el mismo se encuentra a continuación.

Una proteína blanco encontrada y relacionada con la degradación proteica es la enzima Cisteína proteasa tipo RD21a de *C. sinensis*, la cual pertenece a la familia de las cisteína proteasas del tipo Papaína (PLCP, por Papain-Like Cysteine Protease), que juegan un papel crucial en las interacciones planta-patógeno (Richau *et al.*, 2012) ya que están involucradas en la degradación de proteínas ajenas, tanto

por la planta como por el patógeno (Shindo y van der Hoorn, 2008). Las PLCPs se producen con un dominio autoinhibidor que se pliega en la hendidura de unión al sustrato, y que necesita ser eliminado proteolíticamente para activar la proteasa (Taylor *et al.*, 1995). Algunos ejemplos de PLCPs de plantas son Rcr3 (por Required for Cladosporium resistance-3) y PIP1 (Phytophthora Inhibited Protease-1) de tomate (Shindo y van der Hoorn, 2008).

Una proteína encontrada relacionada con el estado redox de la célula hospedadora es la enzima Superóxido dismutasa de Cu/Zn de *C. sinensis*, la cual se encuentra principalmente en los sitios donde se genera el anión superóxido. Esta enzima está relacionada indirectamente con la respuesta de defensa a patógenos, ya que el anión superóxido es un componente de la HR (Able *et al.*, 2000). Recientemente se publicó un trabajo científico donde se analizó el proteoma de la matriz extracelular de cítricos comparándolo entre los tratamientos con el patógeno hospedador Xac y el patógeno no hospedador Xoo, observándose que esta enzima tiene una expresión diferencial, lo que sugiere una importancia de la misma en el estado redox de la matriz extracelular durante estas interacciones (Swaroop Rani y Podile, 2013).

7.4. Discusión

Mediante el ensayo de doble híbrido en levaduras llevado a cabo en este trabajo se han encontrado proteínas vegetales que posiblemente interaccionen con las proteínas bacterianas estudiadas. Los resultados obtenidos en estos ensayos han permitido evaluar la posible participación de las proteínas vegetales en el reconocimiento de Xac. A modo de análisis global de estos estudios, es interesante notar la existencia de un subconjunto de proteínas de naranja que fueron observadas tanto en el ensayo de interacción con HrpE como con Hpa1 (sus fragmentos). Éstas son proteínas asociadas mayoritariamente a las respuestas de defensa frente a algún estrés ya sea biótico como abiótico, o pertenecientes a los mecanismos de degradación de otras proteínas, o relacionadas con el reordenamiento celular, lo que indica que probablemente sean proteínas blanco del hospedador y sirvan para el reconocimiento de diversas proteínas del patógeno y por lo tanto para la subsiguiente inducción de los mecanismos de defensa de la planta.

El modelo para explicar el mecanismo de ensamblaje de los SST3s de fitopatógenos no está actualmente consolidado, y no se conoce si las proteínas pilinas que los componen son además translocadas a la célula hospedadora. Por lo tanto todas las proteínas encontradas en el ensayo de doble híbrido, al margen de su localización subcelular, resultan interesantes y se propone analizar en futuros estudios la función biológica de su interacción con HrpE.

Del total de proteínas encontradas en todos los ensayos utilizando los fragmentos de Hpa1, la región amino terminal (considerada desde el residuo 1 al 57) mostró interacción con aproximadamente el 65% del total de las proteínas encontradas. Esto podría sugerir una correlación entre la capacidad de formación de fibras amiloides con un mayor número de interacciones con proteínas de la planta, ya que lo opuesto se observa con la región carboxilo terminal (considerada desde el residuo 58 al 137). Otra observación que deriva del análisis de las tablas anteriores es la baja cantidad de proteínas que interactúan con la región central Hpa1₃₃₋₁₀₅ que contiene ambas regiones de hélice α de la harpin, lo que podría sugerir que las interacciones con otras proteínas por parte de Hpa1 se deba, en gran parte, a sus regiones extremas tanto amino como carboxilo, indicando la importancia de las

mismas en la interacción de Hpa1 con otras proteínas.

También es interesante destacar que no se detectaron ortólogos de naranja de las proteínas HIPM comentadas anteriormente (Oh y Beer, 2007), lo que puede ser indicativo de la falta de su existencia en esta especie de planta, o de que la interacción con las mismas se produce a través de uno o varios dominios existentes en las harpin de la familia de HrpN que no poseen las de la familia de Hpa1, ya que estas familias de proteínas presentan grandes diferencias a nivel de secuencia.

Teniendo en cuenta el alto número de posibles proteínas de interés interactuantes encontradas tanto con HrpE como Hpa1, en nuestro laboratorio se prevé a futuro desarrollar experimentos que permitirán confirmar las interacciones entre estas proteínas de la planta y las bacterianas, con énfasis en la importancia de la interacción respecto al rol que las mismas tienen, o podrían tener, en la interacción Xac-plantas de cítricos. En el año 2008 se publicó un trabajo científico en el cual se detectaron los genes que se ven inducidos al enfrentar plantas de naranja con Xac por medio de estudios de transcriptómica (Cernadas *et al.*, 2008). Llamativamente, varios de los genes que se vieron inducidos en este trabajo codifican para las mismas proteínas encontradas en los ensayos de interacción por doble híbrido presentes en este trabajo de tesis, lo que aumenta las expectativas sobre los futuros análisis a desarrollar referidos al tema. Entre estas proteínas se encuentran, por ejemplo, varias quinasas receptoras, diversas cisteína proteasas, una proteína de transferencia de lípidos no específica, una ubiquitina, una proteína rica en glicinas, y una quinasa dependiente de ciclinas.

Conclusiones

8. Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se realizaron estudios sobre dos proteínas relacionadas al Sistema de Secreción Tipo III de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, y sus importancias en el desarrollo de la Cancrosis de los Cítricos. No sólo se estudiaron los aspectos en la interacción Xac-naranja, sino que también se abordaron ensayos enfrentando estas proteínas a plantas no hospedadoras de Xac.

Se caracterizó la proteína harpin asociada al SST3, Hpa1 de Xac, en la interacción planta-patógeno. Los resultados mostraron que Hpa1 fue capaz de inducir HR en plantas no hospedadoras. Concordantemente se observó la aparición de muerte celular, aumento en la producción de ROS, en la deposición del polisacárido calosa, y en la liberación de iones. Además, el análisis de la expresión de genes relacionados con la defensa mostró una inducción de éstos cuando las plantas fueron tratadas con esta proteína. La aplicación de Hpa1 en plantas hospedadoras no causó ninguna respuesta visible, acorde con la baja expresión de genes de defensa observada, aunque estudios de la morfología de los tejidos foliales por medio de análisis de microscopía revelaron un desorden de los mismos junto con un leve aumento de los depósitos de calosa. Particularmente, y en oposición con lo observado para otras proteínas harpin de la familia Hpa1, la infiltración Hpa1 de Xac en plantas hospedadoras no protegió contra futuras infecciones indicando que no funcionó como un elicitor de la respuesta de *priming* de la defensa.

La expresión de *hpa1* aumentó tanto en un medio mimetizador del apoplasto vegetal como en condiciones tempranas del ciclo infeccioso de Xac. Se determinó además, a través del análisis por mutación del gen *hpa1* y del agregado ectópico de la proteína, la participación de Hpa1 de Xac en la agregación bacteriana, no sólo cuando se estudiaron los efectos sobre bacterias crecidas en medio de cultivo, sino también cuando ello se realizó *in planta*. Al igual que otras proteínas harpin estudiadas, Hpa1 de Xac mostró ser secretada en forma dependiente del SST3 de la bacteria.

En base a los resultados obtenidos, se propone entonces un modelo de doble función para Hpa1 de Xac en las interacciones planta-patógeno; como proteína

inductora de la respuesta de defensa basal, como se observó en plantas no hospedadoras; y en el aumento de la virulencia del patógeno, probablemente causando cambios en la estructura del mesófilo de las hojas de cítricos y promoviendo la agregación de las células bacterianas, lo que conlleva a una mayor colonización de los tejidos. Esta actividad de agregación es concebible en un modelo en el que Xac requiere de la proteína harpin para reclutar un mayor número de células patógenas para interactuar con la membrana celular vegetal y predisponer el tejido a la posterior acción infectiva.

A través de estudios biofísicos realizados sobre Hpa1 se demostró que luego de ser expresada, la misma se ensambla en forma tetramérica, y con una conformación mayoritariamente α -helicoidal, en concordancia con las predicciones realizadas con programas bioinformáticos. Al mismo tiempo, se demostró que Hpa1 de Xac forma fibras de tipo amiloides, ricas en láminas β , en las condiciones encontradas en el apoplasto vegetal, sugiriendo que esta estructura podría tener un rol en los efectos causados por esta proteína. Se estudió el comportamiento térmico tanto de la proteína en forma tetramérica como de las fibras maduras, y se determinó que la estabilidad característica de estas proteínas no está asociada a las conformaciones de estructura secundaria de la misma, sino a factores intrínsecos de la secuencia primaria. La capacidad de desarrollo de HR en plantas no hospedadoras se vio asociada tanto a las estructuras formadas en el extremo amino como carboxilo terminal de Hpa1, aunque el desarrollo de fibras amiloides sólo fue encontrado para el primero, sugiriendo que los mecanismos de desarrollo de HR pueden no estar estrictamente asociados al proceso fibrilogénico. Al analizar la importancia de estas regiones en el proceso de agregación bacteriana se observó que el único dominio involucrado en el mismo es el amino terminal, sugiriendo una correlación entre la agregación y la formación de fibras.

Por otra parte, también se realizaron estudios para caracterizar la proteína mayoritaria del Pilus Hrp de Xac, HrpE, en su interacción con plantas hospedadoras y no hospedadoras. A través de los años esta proteína, y sus homólogos, han sido estudiados desde el punto de vista de su función como proteínas estructurales del SST3 de fitopatógenos, analizando ya sea su estructura particular como su función y mecanismo en la secreción y translocación de efectores de este sistema de secreción proteico. Los resultados demostraron que HrpE posee características

estructurales similares a las de otras proteínas pilinas de fitopatógenos, observándose en su secuencia regiones mayoritariamente predichas como α -helicoidales y patrones de hidrofobicidad típicos. La secuencia carboxilo terminal de HrpE de Xac se encuentra altamente conservada en el género *Xanthomonas*, sugiriendo que esta región conformaría el core del Pilus Hrp y que la región variable amino terminal se encuentra expuesta y sería la que otorga el rango de hospedador. Los resultados indicaron que HrpE de Xac genera HR en plantas no hospedadoras, lo que también se caracterizó por el aumento en la producción de ROS, la deposición de calosa, y el aumento de la expresión de genes asociados a la defensa. En plantas de naranja, se observó una clorosis en tejidos tratados con HrpE, indicando que la misma es capaz de despertar una respuesta en la planta. Esta observación se vio asociada al aumento de la producción de ROS, la deposición de calosa (aunque considerablemente menor que en plantas no hospedadoras), y la expresión de genes de naranja asociados a la defensa innata y el estrés oxidativo. La infiltración de HrpE en distintas plantas generó un aumento en la defensa capaz de disminuir la capacidad infectiva de patógenos. En función de estos resultados, la expresión transgénica de esta proteína podría ser evaluada como una estrategia novedosa para la obtención de plantas resistentes. El análisis del posible rol de HrpE en la adherencia bacteria-bacteria, indicó que esta proteína promueve la agregación bacteriana.

Por otro lado, se desarrollaron anticuerpos policlonales contra HrpE de Xac y se analizaron como posibles inhibidores de los efectos observados por esta proteína. Interesantemente, los anticuerpos no sólo inhibieron los efectos que produce esta pilina en plantas de naranja, sino que también disminuyeron el número de canchros desarrollados por Xac como así también la capacidad de Xcv de causar HR en estas plantas. Estos resultados sugieren que los anticuerpos podrían estar actuando sobre estructuras conservadas, al menos espacialmente, entre las pilinas de estos fitopatógenos. Mediante la utilización de anticuerpos específicos que inhiban la secreción y translocación de proteínas efectoras, probablemente evitando la elongación del pilus o su subsiguiente interacción con las células del hospedador, se podrían plantear nuevas estrategias para el desarrollo de plantas de naranja resistentes a la canchrosis.

Para identificar posibles proteínas de plantas de naranja que interactúan con estas proteínas pertenecientes al SST3 de *Xac*, se realizó un ensayo de dos híbridos en levaduras. Se identificaron para ambas proteínas una diversa variedad de proteínas con funciones desconocidas y conocidas, entre las que se encontraron proteínas que forman parte de la defensa a estreses bióticos y abióticos; proteínas pertenecientes a los mecanismos de degradación de otras proteínas; enzimas involucradas en el metabolismo, ya sea primario o secundario; proteínas relacionadas al ciclo celular; enzimas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula; proteínas de membrana tanto quinasas sensoras como transportadores de iones o azúcares; enzimas involucradas en la producción de fitohormonas; y proteínas relacionadas con el reordenamiento y la muerte celular.

Este trabajo permitió caracterizar a las proteínas Hpa1 y HrpE relacionadas con el SST3 de *Xac* evidenciando por primera vez roles de las mismas en la agregación bacteriana. Por otro lado, se caracterizaron las respuestas vegetales a estas proteínas bacterianas, determinándose que ambas inducen una respuesta de defensa en el tejido vegetal.

Resumen

9. Resumen

La Cancrosis de los Cítricos es considerada en la actualidad una de las enfermedades más peligrosas y perjudiciales para la citricultura en Argentina y en el mundo, debido a los daños causados en la producción y calidad de los frutos, siendo *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) la bacteria fitopatógena responsable de esta enfermedad. Las bacterias fitopatógenas colonizan a sus hospedadores a través de la secreción de proteínas mediante el Sistema de Secreción de Tipo III (SST3). Este sistema está codificado por el *cluster hrp*, el cual es esencial para la patogenicidad en plantas hospedadoras y la inducción de HR en plantas no hospedadoras.

El *cluster hrp* de Xac contiene un gen que codifica para una proteína harpin llamada Hpa1. Las harpin son proteínas estables al calor, ricas en glicina, que pueden formar poros en membranas, inducir HR en algunas plantas y formar estructuras fibrilares. Con el objetivo de estudiar la función de la proteína Hpa1 de Xac en la patogenicidad, se expresó y se purificó esta proteína en forma recombinante, y se generó la cepa mutante de Xac en el gen *hpa1*. A través de diversos estudios analizando los fenotipos generados tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras, la expresión de sus genes en respuesta a la Hpa1, y los efectos que produce esta proteína sobre las células bacterianas, se logró determinar que la misma posee un rol dual en la patogenicidad de Xac, por un lado promoviendo la inducción de la respuesta de defensa basal de las plantas, y por otro aumentando la virulencia del patógeno, probablemente causando cambios en la estructura del mesófilo de las hojas de cítricos y promoviendo la agregación de las células bacterianas.

A su vez, se realizaron estudios utilizando técnicas biofísicas con la intención de comprender el funcionamiento de esta proteína, al mismo tiempo que se estudiaron dos dominios de la misma con el objetivo de caracterizar sus roles dentro de la proteína. Esto permitió estudiar la relación estructura-función de Hpa1 con mayor detalle. Se determinó que ambos dominios inducen HR en tejidos de plantas no hospedadoras, mientras que la capacidad de formación de fibras y de agregar células bacterianas es particular y propia de la región amino terminal de la proteína.

Por otro lado, el gen *hrpE* perteneciente también al *cluster hrp* de *Xac* codifica para la proteína pilina que constituye el Pilus Hrp del SST3. Se estudiaron nuevos roles para esta proteína, determinando los efectos que produce la misma en las plantas. Así se logró determinar que HrpE es reconocida tanto por plantas hospedadoras como no hospedadoras. En el caso de las plantas no hospedadoras, las mismas respondieron desarrollando HR, deposición de calosa y producción de ROS, y un aumento en la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa, mientras que en naranja todas estas respuestas fueron significativamente más leves en intensidad. Además, fue encontrada una nueva función para esta pilina promoviendo el *priming* tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras, disminuyendo el grado de infección de *Xac* y del fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), causante de la enfermedad Mancha o Sarna Bacteriana en plantas de tomate y pimiento. Al mismo tiempo se analizó la factibilidad del uso de anticuerpos contra esta pilina, como estrategia para la obtención de plantas resistentes a la Cancrosis de los Cítricos. De esta forma, se encontró una significativa disminución de los efectos producidos tanto por HrpE recombinante como por *Xac* y *Xcv* en plantas de naranja, validando esta estrategia para el futuro desarrollo de plantas resistentes que expresen transgénicamente estos anticuerpos.

Las proteínas blanco de naranja encontradas a través del ensayo de doble híbrido en levaduras para HrpE y Hpa1, mostraron una diversa variedad de funciones, entre ellas, se encontraron proteínas cuyos genes se ven inducidos, o forman parte de la defensa, frente a algún estrés tanto biótico como abiótico; proteínas pertenecientes a los mecanismos de degradación de otras proteínas; enzimas involucradas en el metabolismo, ya sea primario o secundario; proteínas relacionadas al ciclo celular; enzimas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula; proteínas de membrana tanto quinasas sensoras como transportadores de iones o azúcares; enzimas involucradas en la producción de fitohormonas; y proteínas relacionadas con el reordenamiento y la muerte celular.

Referencias bibliográficas

10. Referencias bibliográficas

- Able A.J., Guest D.I. y Sutherland M.W. (2000). Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*. 124, 899-910.
- AbuQamar S., Chen X., Dhawan R., Bluhm B., Salmeron J., Lam S., Dietrich R.A. y Mengiste T. (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. *The Plant Journal*. 48, 28-44.
- Agrios G. (2004). Plant Pathology. New York. *Academic Press*.
- Aizawa S.I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiology Letters*. 202, 157-164.
- Al-Whaibi M.H. (2010). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University*. 23, 139-150.
- Alconada Magliano M.T., Botto J.F., Godoy A.V., Symonds V.V., Lloyd A.M. y Casal J.J. (2005). New *Arabidopsis* recombinant inbred lines (Landsberg *erecta* x Nossen) reveal natural variation in phytochrome-mediated responses. *Plant Physiology*. 138, 1126-1135.
- Alegria M.C., Docena C., Khater L., Ramos C.H., da Silva A.C. y Farah C.S. (2004). New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Bacteriology*. 186, 6186-6197.
- Alfano J.R. y Collmer A. (1996). Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell*. 8, 1683-1698.
- Alfano J.R. y Collmer A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking hairpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*. 179, 5655-5662.
- Alvarez-Martinez C.E. y Christie P.J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73, 775-808.
- Alvarez A.M., Benedict A.A., Mizumoto C.Y., Hunter J.E. y Gabriel D.W. (1994). Serological pathological and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology*. 84, 1449-1457.
- Ambroggio X.I., Rees D.C. y Deshaies R.J. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biology*. 2, E2.
- Antoniuk L.P. y Evseeva N.V. (2006) Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. *Mikrobiologija*. 75, 544-549.
- Arciola C.R., Campoccia D., Speziale P., Montanaro L. y Costerton J.W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 33, 5967-5982.
- Arisz S.A., Testerink C., Munnik T. (2009). Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791, 869-875.
- Arlat M., van Gijsegem F., Huet J.C., Pernollet J.C. y Boucher C.A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *The EMBO Journal*. 13, 543-553.

- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M. y Sheen J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. 415, 977-983.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y Struhl K. (1987). Current protocols in molecular cloning. *John Wiley y Sons, Inc.*
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y Struhl K. (1996). Current protocols in molecular biology. *John Wiley y Sons, Inc.*
- Baek D., Jin Y., Jeong J.C., Lee H.J., Moon H., Lee J., Shin D., Kang C.H., Kim D.H., Nam J., Lee S.Y. y Yun D.J. (2008). Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Phytochemistry*. 69, 333-338.
- Baker C.J., O'Neill N.R., Keppler L.D. y Orlandi, E.W. (1991). Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Phytopathology*. 81, 1504-1507.
- Baker J.C., O'Neill N.R., Keppler L.D. y Orlandi E.W. (1991). Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Physiology and Biochemistry*. 81, 1504-1507.
- Barnes A., Bale J., Constantinidou C., Ashton P., Jones A. y Pritchard J. (2004). Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany*. 55, 1473-1481.
- Barny M.A. (1995) *Erwinia amylovora* *hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *European Journal of Plant Pathology*. 101, 333-340.
- Bartels D., Sunkar R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24, 23-58.
- Bauer D.W., Wei Z.M., Beer S.V. y Collmer A. (1995). *Erwinia chrysanthemi* harpin_{Ech}: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8, 484-91.
- Beachy R.N. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 8, 215-220.
- Beattie G.A., Lindow S.E. (1994). Survival, growth, and localization of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* on leaves. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 3790-3798.
- Bell E., Creelman R.A. y Mullet J.E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92, 8675-8679.
- Bent A.F. y Mackey D. (2007). Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*. 45, 399-436.
- Berger B.R. y Christie P.J. (1994). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *Journal of Bacteriology*. 176, 3646-3660.
- Blocker A., Komoriya K. y Aizawa S.I. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 3027-3030.
- Bocsanczy A.M., Nissinen R.M., OH C.S. y Beer S.V. (2008). HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Molecular Plant Pathology*. 9, 425-434.

- Bogdanove A.J., Beer S.V., Bonas U., Boucher C.A., Collmer A., Coplin D.L., Cornelis G.R., Huang H.C., Hutcheson S.W., Panopoulos N.J. y van Gijsegem F. (1996a). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*. 20, 681-3.
- Bogdanove A.J., Wei Z.M., Zhao L. y Beer S.V. (1996b). *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of *yopN* of *Yersinia* spp. *Journal of Bacteriology*. 178, 1720-1730.
- Bogdanove A.J. y Martin G.B. (2000). AvrPto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97, 8836-8840.
- Boisson-Dernier A., Kessler S.A. y Grossniklaus U. (2011). The walls have ears: the role of plant CrRLK1s in sensing and transducing extracellular signals. *Journal of Experimental Botany*. 62, 1581-1591.
- Boller T. y Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*. 60, 379-406.
- Botër M., Amigues B., Peart J., Breuer C., Kadota Y., Casais C., Moore G., Kleanthous C., Ochsenbein F., Shirasu K. y Guerois R. (2007). Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell*. 19, 3791-3804.
- Bradbury J.F. (1984). Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187AL. En: Krieg N.R, Holt J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1, 199-210.
- Bretz J.R., Mock N.M., Charity J.C., Zeyad S., Baker C.J. y Hutcheson S.W. (2003). A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Molecular Microbiology*. 49, 389-400.
- Brito B., Aldon D., Barberis P., Boucher C. y Genin S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15, 109-119.
- Brunings A.M. y Gabriel D.W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*. 4, 141-157.
- Brusin F.J. y Rossbach S. (1994). Transposon mutagenesis. En Methods for general and molecular bacteriology. Gherehardt P., Murray R.G.E., Wood W. y Krieg N.R. *Society for Microbiology Press*. pp. 387-405.
- Büttner D. y Bonas U. (2002). Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal*. 21, 5313-5322.
- Büttner D. y Bonas U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology*. 9, 193-200.
- Büttner D. y Bonas U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*. 34, 107-133.
- Büttner D. y He S.Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*. 150, 1656-1664.
- Cammue B.P.A., Thevissen K., Hendriks M., Eggermont K., Goderis I.J., Proost P., van Damme J., Osborn R.W., Guerbet F., Kader J.C. y Broekaert W.F. (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology*. 109, 445-455.

- Canteros B.I. (1998). Ecology of endemic citrus canker: seasonal fluctuations of disease intensity. Abstract 3.7.41 7^o *International Congress of Plant Pathology*. Edimburgo. Abstract-vol. 3.
- Carter D.B. y Chou K.C. (1998). A model for structure-dependent binding of Congo red to Alzheimer beta-amyloid fibrils. *Neurobiology of aging*. 19, 37-40.
- Cascales E. y Christie P.J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*. 1, 137-149.
- Causier B. y Davies B. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*. 50, 855-870.
- Cavillon F., Elhaddaoui A., Alix A.J.P., Turrell S. y Dauchez M. (1995). Identification of the importance of the secondary structure of Alzheimer's disease amyloid. *Journal of Molecular Structure*. 408-409, 185-189.
- Century K.S., Holub E.B. y Staskawicz B.J. (1995) NDRJ, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92, 6597-6601.
- Century K.S., Shapiro A.D., Repetti P.P., Dahlbeck D., Holub E., Staskawicz B.J. (1997). NDRI, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science*. 275, 1963-1965.
- Cernadas R.A., Camillo L.R. y Benedetti C.E. (2008). Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*. 9, 609-631.
- Chakravarthy S., Velásquez A.C. y Martin G.B. (2009). Assay for pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) in plants. *Journal of Visualized Experiments*. 31, pii: 1442.
- Chamovitz D.A., Wei N., Osterlund M.T., von Arnim A.G., Staub J.M., Matsui M. y Deng X.W. (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*. 86, 115-121.
- Chanda B., Venugopal S.C., Kulshrestha S., Navarre D.A., Downie B., Vaillancourt L., Kachroo A. y Kachroo P. (2008). Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 147, 2017-2029.
- Chandra-Shekara A.C., Venugopal S.C., Barman S.R., Kachroo A. y Kachroo P. (2007). Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 7277-7282.
- Charkowski A.O, Alfano J.R., Preston G., Yuan J. He S.Y. y Collmer A. (1998). The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *Journal of Bacteriology*. 180, 5211-5217.
- Chen C.H., Lin H.J. y Feng, T.Y. (1998). An amphipathic protein from sweet pepper can dissociate harpin_{PSS} multimeric forms and intensify the harpin_{PSS}-mediated hypersensitive response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52, 139-149.
- Chen L., Qian J., Qu S., Long J., Yin Q., Zhang C., Wu X., Sun F., Wu T., Hayes M., Beer S.V. y Dong H. (2008). Identification of specific fragments of HpaG_{Xooc}, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology*. 98, 781-91.

- Chen X.Y. y Kim J.Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior*. 4, 489-492.
- Chen D., Hu B., Qian G., Zhang Q., Gu C., Fan J. y Liu F. (2009). A novel probe for harpin receptor in nonhost plants: Monoclonal anti-idiotypic antibodies as internal images of Harpin_{Xoo} active sites. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 73, 138-146.
- Cheng C.S., Samuel D., Liu Y.J., Shyu J.C., Lai S.M., Lin K.F. y Lyu P.C. (2004). Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochemistry*. 43, 13628-13636.
- Chew E.H. y Hagen T. (2007). Substrate-mediated regulation of cullin neddylation. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 17032-17040.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 124, 803-814.
- Choi M.S, Kim W, Lee C. y Oh S.C. (2013). Harpins, multifunctional proteins secreted by Gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 26, 1115-1122.
- Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.M., Simon A. y Viaud M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letter*. 277, 1-10.
- Christie P.J. y Vogel J.P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiology*. 8, 354-360.
- Clark G.B., Morgan R.O., Fernandez M.P. y Roux S.J. (2012). Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New Phytologist*. 196, 695-712.
- Coburn B., Sekirov I. y Finlay B.B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 20, 535-549.
- Conrads-Strauch J., Dow J.M., Milligan D.E., Parra R. y Daniels M.J. (1990). Induction of hydrolytic enzymes in *Brassica campestris* in response to pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Plant Physiology*. 93, 238-243.
- Conrath U., Pietersen C.M.J. y Mauch-Mani B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 7, 210-216.
- Cope G.A., Suh G.S., Aravind L., Schwarz S.E., Zipursky S.L., Koonin E.V. y Deshaies R.J. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*. 298, 608-611.
- Coplin D.L. y Cook D. (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 3, 271-279.
- Cornelis G.R. y van Gijsegem F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology*. 54, 735-74.
- Cornels H., Ichinose Y. y Barz W. (2000). Characterization of cDNAs encoding two glycine-rich proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.): accumulation in response to fungal infection and other stress factors. *Plant Science*. 154, 83-88.
- Coulthurst S.J. (2013). The Type VI secretion system is a widespread and versatile cell targeting system. *Research in Microbiology*. 164, 640-654.

- da Silva A.C.R., Ferro J.A., Reinach F.C., Farah C.S., Furlan L.R., Quaggio R.B., Monteiro-Vitorello C.B., Van Sluys M.A., Almeida N.F., Alves L.M.C., do Amaral A.M., Bertolini M.C., Camargo L.E.A., Camarotte G., Cannavan F., Cardozo J., Chambergo F., Ciapina L.P., Cicarelli R.M.B., Coutinho L.L., Cursino-Santos J.R., El-Dorry H., Faria J.B., Ferreira A.J.S., Ferreira R.C.C., Ferro M.I.T., Formighieri E.F., Franco M.C., Greggio C.C., Gruber A., Katsuyama A.M., Kishi L.T., Leite R.P., Lemos E.G.M., Lemos M.V.F., Locali E.C., Machado M.A., Madeira A.M.B.N., Martinez-Rossi N.M., Martins E.C., Meidanis J., Menck C.F.M., Miyaki C.Y., Moon D.H., Moreira L.M., Novo M.T.M., Okura V.K., Oliveira M.C., Oliveira V.R., Pereira H.A., Rossi A., Sena J.A.D., Silva C., de Souza R.F., Spinola L.A.F., Takita M.A., Tamura R.E., Teixeira E.C., Tezza R.I.D., dos Santos M.T., Truffi D., Tsai S.M., White F.F., Setubal J.C. y Kitajima J.P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. 417, 459-463.
- Dahlbeck D. y Stall R.E. (1979). Mutations for race change in cultures of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology*. 69, 634-636.
- Dangl J.L. y Jones J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411, 826-833.
- Davies K.J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. 83, 301-310.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Olive, D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K. y Mittler R. (2004). Cytosolic ascorbate peroxidase1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell*. 17, 268-281.
- Dat J.F., Inze D. y van Breusegem F. (2001). Catalase-deficient plants: Tools for in planta studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Reports*. 6, 37-42.
- Datta A.K y Muthukrishnan S. (1999). En Pathogenesis-related proteins in plants. Capítulo 9: Signal transduction and pathogen-induced PR gene expression. *CRC Press*.
- de la Cruz F. y Davies J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*. 8, 128-133.
- de Jaeger G., de Wilde C., Eeckhout D., Fiers E. y Depicker A. (2000). The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Molecular Biology*. 43, 419-428.
- de Lorenzo V. y Timmis K.N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods in Enzymology*. 235, 386-405.
- de Paepe A., Vuylsteke M., Van Hummelen P., Zabeau M. y van der Straeten D. (2008). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 39, 537-559.
- de Souza A.A., Takita M.A., Coletta-Filho H.D., Targon M.L.P.N., Carlos E.F., Locali-Fabris E.C., Amaral A.M., Freitas-Astúa J., Silva-Pinhati A.C.O., Boscariol-Camargo R.L., Berger I.J., Rodrigues C.M., Reis M.S.; Machado M.A. (2007). Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology*. 30, 957-964.
- de Souza Cândido E., Pinto M.F., Pelegrini P.B., Lima T.B., Silva O.N., Pogue R., Grossi-de-Sá M.F. y Franco O.L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB Journal*. 25, 3290-3305.

- Dekkers B.J., Willems L., Bassel G.W., van Bolderen-Veldkamp R.P., Ligterink W., Hilhorst H.W. y Bentsink L. (2012). Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. *Plant Cell Physiology*. 53, 28-37.
- Deng W.L., Preston G., Collmer A., Chang C.J. y Huang H.C. (1998). Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tKomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *Journal of Bacteriology*. 180, 4523-4531.
- Dennison C. (2005). Investigating the structure and function of cupredoxins. *Coordination Chemistry Reviews*. 249, 3025-3054.
- Dickman M.B. y Fluhr R. (2013). Centrality of host cell death in plant-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 51, 543-570.
- Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U. y Hacker J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2, 414-24.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M. y Hirt H. (2007). The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell*. 19, 3266-3279.
- Dodds P.N., Lawrence G.J., Catanzariti A.M., Teh T., Wang C.I., Ayliffe M.A., Kobe B. y Ellis J.G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 8888-8893.
- Dong H., Delaney T.P., Bauer D.W. y Beer S.V. (1999). Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *The Plant Journal*. 20, 207-215.
- Dong H.P., Peng J., Bao Z., Meng X., Bonasera J.M., Chen G., Beer S.V. y Dong H. (2004). Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiology*. 136, 3628-38.
- Dreher K. y Callis J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*. 99, 787-822.
- Durrant W.E. y Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42, 185-209.
- Dunger G., Arabolaza A.L., Gottig N., Orellano E.G. y Ottado, J. (2005). Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *hrp* cluster in citrus canker and in nonhost plant responses. *Plant Pathology*. 54, 781-788.
- Dunger G., Reilling V.M., Tondo M.L., Barreras M., Ielpi L., Orellano E.G. y Ottado J. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives in Microbiology*. 188, 127-35.
- Dye E.W. y Lelliott R.A. (1974). Genus II *Xanthomonas*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 1, 243-249.
- Ehness R., Ecker M., Godt D.E. y Roitsch T. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell*. 9, 1825-1841.

- Engelhardt S., Lee J., Gabler Y., Kemmerling B., Haapalainen M.L., Li C.M., Wei Z., Keller H., Joosten, M., Taira S. y Nürnberger T. (2009). Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *The Plant Journal*. 57, 706-717.
- Epstein E.A. y Chapman M.R. (2008). Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiology*. 10, 1413-1420.
- Esnault R., Buffard D., Breda C., Sallaud C., el Turk J. y Kondorosi A. (1993). Pathological and molecular characterizations of alfalfa interactions with compatible and incompatible bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* and *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 6, 655-664.
- Espinosa A., Guo M., Tam V.C., Fu Z.Q. y Alfano J.R. (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Molecular Microbiology*. 49, 377-387.
- Fasman G.D. (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. *Springer Science + Business Media New York*. p. 71-75.
- Fauvart M., Verstraeten N., Dombrecht B., Venmans R., Beullens S., Heusdens C. y Michiels J. (2009). *Rhizobium etli* HrpW is a pectin-degrading enzyme and differs from phytopathogenic homologues in enzymically crucial tryptophan and glycine residues. *Microbiology*. 155, 3045-3054.
- Fecker L.F., Koenig R. y Obermeier C. (1997). *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Archives of Virology*. 142, 1857-1863.
- Fernández C.O., Hoyer W., Zweckstetter M., Jares-Erijman E.A., Subramaniam V., Griesinger C. y Jovin T.M. (2004). NMR of alpha-synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation. *The EMBO Journal*. 23, 2039-2046.
- Filloux A. (2010). Secretion signal and protein targeting in bacteria: a biological puzzle. *Journal of Bacteriology*. 192, 3847-3849.
- Flor H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*. 32, 653-669.
- Flor H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*. 45, 680-685.
- Fontanilla J.M., Montes M. y De Prado R. (2005a). Induction of resistance to the pathogenic agent *Botrytis cinerea* in the cultivation of the tomato by means of the application of the protein "Harpin" (Messenger). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 12, 35-40.
- Fontanilla J.M., Montes M. y De Prado R. (2005b). Effects of the foliar-applied protein "Harpin(Ea)" (messenger) on tomatoes infected with *Phytophthora infestans*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 12, 41-45.
- Fouts D.E., Abramovitch R.B., Alfano J.R., Baldo A.M., Buell C.R., Cartinhour S., Chatterjee A.K., D'Ascenzo A., Gwinn M.L., Lazarowitz S.G., Lin N.C., Martin G.B., Rehm A.H., Schneider D.J., van Dijk K., Tang X., y Collmer A. (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99, 2275-2280.

- Freitas-Astúa J., Bastianel M., Locali-Fabris E.C., Novelli V.M., Silva-Pinhati A.C., Basílio-Palmieri A.C., Targon M.L.P.N. y Machado M.A. (2007). Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. *Genetics and Molecular Biology*. 30, 980-990.
- Fronzes R., Christie P.J. y Waksman G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*. 7, 703-714.
- Gabius H.J., André S., Kaltner H. y Siebert H.C. (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1572, 165-177.
- Galán J.E. y Collmer A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 284, 1322-1328.
- Galán J.E. y Wolf-Watz H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 444, 567-573.
- Garavaglia B.S., Thomas L., Gottig N., Dunger G., Garofalo C.G., Daurelio L.D., Ndimba B., Orellano E.G., Gehring C. y Ottado J. (2010). A eukaryotic-acquired gene by a biotrophic phytopathogen allows prolonged survival on the host by counteracting the shut-down of plant photosynthesis. *PLoS One*. 5, e8950.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. y Bairoch A. (2005). Protein Identification and analysis tools on the ExPASy Server. En libro: *The Proteomics Protocols Handbook*. John M. Walker. 571-607.
- Gaudriault S., Brisset M.N. y Barny M.A. (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Letters*. 428, 224-228.
- Gechev T.S. y Hille J. (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Journal of Cell Biology*. 168, 17-20.
- Giavalisco P., Kapitzka K., Kolasa A., Buhtz A. y Kehr J. (2006). Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics*. 6, 896-909.
- Gietz R.D., Woods R.A., Manivasakam P. y Schiestl R.H. (1998). Growth and transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. En D. Spector, R. Goldman y L. Leinwand, Cells: a laboratory manual, vol. I. Culture and biochemical analysis of cells. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Gietz R.D. y Woods R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*. 350, 87-96.
- Glauser G., Dubugnon L., Mousavi S.A., Rudaz S., Wolfender J.L. y Farmer E.E. (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 34506-34513.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43, 205-27.
- Glickman M.H. y Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*. 82, 373-428.
- Gomi K., Itoh N., Hiroyuki Yamamoto H. y Akimitsu K. (2002) Characterization and functional analysis of class I and II acidic chitinase cDNA from rough lemon. *Journal of General Plant Pathology*. 68, 191-199.
- Gophna U., Ron E.Z. y Graur D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*. 312, 151-163.
- Goto M., (1992). Citrus Canker. En: Plant diseases of international importance. Vol. III, 170-208.

- Gottig N., Garavaglia B.S., Daurelio L.D., Valentine A., Gehring C., Orellano E.G. y Ottado J. (2008). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 18631-18636.
- Gottig N., Garavaglia B.S., Garofalo C.G., Orellano E.G. y Ottado J. (2009). A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS ONE*. 4, e4358.
- Gottig N., Garavaglia B.S., Garofalo C.G., Zimaro T., Sgro G.G., Ficarra F.A., Dunger G., Daurelio L.D., Thomas L., Gehring C., Orellano E.G. y Ottado J. (2010). Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. En *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Méndez-Vila, 196-204.
- Gottwald T.R., Graham J.H., Civerolo E.L., Barrett H.C. y Hearn C.J. (1993). Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Disease*. 77, 1004-1009.
- Gottwald T.R., Graham J.H. y Schubert T.S. (2002). Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01.
- Graham J.H., Gottwald T.R., Civerolo E.L. y McGuire R.G. (1989). Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*. 73, 423-427.
- Graham J.H., Gottwald T.R., Riley T.D., Cubero J. y Drouillard D.L. (2000). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). *Proceedings of the International Citrus canker Research Workshop*. June 20-22. Ft. Pierce, Florida, p. 7.
- Graham J.H., Gottwald T.R., Cubero J. y Achor D.S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*. 5, 1-15.
- Grebner W., Stingl N.E., Oenel A., Mueller M.J. y Berger S. (2013) Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 161, 2159-2170.
- Greenberg J.T. y Yao N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*. 6, 201-211.
- Greenfield N.J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature protocols*. 1, 2527-35.
- Grennan A.K. (2011). Metallothioneins, a diverse protein family. *Plant Physiology*. 155, 1750-1751.
- Grignon C. y Sentenac H. (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 103-128.
- Grudkowska M. y Zagdańska B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*. 51, 609-624.
- Guo Y., Figueiredo F., Jones J. y Wang N. (2011). HrpG and HrpX play Gglobal roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24, 649-661.

- Gupta G., Sinha S. y Surolia A. (2008). Unfolding energetics and stability of banana lectin. *Proteins*. 72, 754-760.
- Gürlebeck D., Thieme F. y Bonas U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*. 163, 233-255.
- Guruprasad K., Reddy B.V. y Pandit M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*. 4, 155-161.
- Haapalainen M.; Engelhardt S.; Küfner I.; Li C.M., Nürnberger T., Lee J., Romantschuk M. y Taira S. (2011). Functional mapping of harpin HrpZ of *Pseudomonas syringae* reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction. *Molecular Plant Pathology*. 12, 151-166.
- Hammond-Kosack K. y Jones J.D.G. (2000). Responses to plant pathogens. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds, 2000). Cap. 21, 1102-1156. *American Society of Plant Physiologists*.
- Hammond-Kosack K., Silverman P., Raskin I. y Jones J.D.G. (1996). RACE-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* induce changes in cell morphology and the synthesis of ethylene and salicylic acid in tomato plants carrying the corresponding *Cf* disease resistance gene. *Plant Physiology*. 110, 1381-1394.
- Hann D.R. y Rathjen J.P. (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 49, 607-618.
- Hassinen V.H., Tervahauta A.I., Schat H. y Kärenlampi S.O. (2011). Plant metallothioneins - metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*. 13, 225-232.
- Hayward A.C. (1993). The hosts of *Xanthomonas*. En *Xanthomonas*. Swings J.G. y Civerolo E.L. Chapman & Hall.
- He S.Y., Huang H.C. y Collmer A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*. 73, 1255-1266.
- He Z.H., He D. y Kohorn B.D. (1998). Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *The Plant Journal*. 14, 55-63.
- He S.Y. y Jin Q. (2003). The Hrp pilus: learning from flagella. *Current Opinion in Microbiology*. 6, 15-19.
- Henderson I.R. y Nataro J.P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity*. 69, 1231-1243.
- Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 68, 692-744.
- Hirai T., Sato M., Toyooka K., Sun H.J., Yano M. y Ezura H. (2010). Miraculin, a taste-modifying protein is secreted into intercellular spaces in plant cells. *Journal of plant physiology*. 167, 209-215.
- Hirano S.S. y Upper C.D. (1983). Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 21, 243-270.

- Hu W., Yuan J., Jin Q.I., Hart P., He S.Y. (2001). Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 234-241.
- Hueck C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, 379-433.
- Hwang I.S. y Hwang B.K. (2011). The pepper mannose-binding lectin gene CaMBL1 is required to regulate cell death and defense responses to microbial pathogens. *Plant Physiology*. 155, 447-463.
- Ielpi L., Couso R.O. y Dankert M.A. (1993). Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology*. 175, 2490-2500.
- Ikai A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*. 88,1895-1898.
- Ingle R.A., Carstens M.y Denby K.J. (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays*. 28, 880-889.
- Innes R.W. (2004). Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiology*. 135, 695-701.
- Iriti M. y Faoro F. (2007). Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*. 164, 57-64.
- Iriti M. y Faoro F. (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling and Behavior*. 4, 66-68.
- Jalan N., Aritua V., Kumar D., Yu F., Jones J.B, Graham J.H., Setúbal J.C. y Wang N. (2011). Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, which causes Citrus Bacterial Spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. *Journal of Bacteriology*. 193, 6342-6357.
- James P., Halladay J. y Craig E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. 144, 1425-1436.
- Jansen C., Korell M., Eckey C., Biedenkopf D., Kogel K.H. (2005). Identification and transcriptional analysis of powdery mildew-induced barley genes. *Plant Science*. 168, 373-380.
- Jekel P.A., Hartmann J.B.H. y Beintema J.J. (1991). The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *European Journal of Biochemistry*. 200, 123-130.
- Jenkins C.L. y Starr M.P. (1982). The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Current Microbiology*. 7, 323-326.
- Ji Z., Song C., Lu X. y Wang J. (2011). Two coiled-coil regions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* harpin differ in oligomerization and hypersensitive response induction. *Amino Acids*. 40, 381-392.
- Jiang D., Rauda I., Han S., Chen S. y Zhou F. (2012). Aggregation pathways of the amyloid β (1-42) peptide depend on its colloidal stability and ordered β -sheet stacking. *Langmuir*. 28, 12711-12721.
- Jin Q. y He S.Y. (2001). Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*. 294, 2556-2558.

- Jin Q., Hu W., Brown I., McGhee G., Hart P., Jones A.L. y He S.Y. (2001). Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*. 40, 1129-39.
- Jones J.D.G. y Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444, 323-329.
- Katzen F., Becker A., Zorreguieta A., Puhler A. y Ielpi L. (1996). Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *Journal of Bacteriology*. 178, 4313-4318.
- Katzen F., Becker A., Ielmini M.V., Oddo C.G. y Ielpi L. (1999). New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *Applied and environmental microbiology*. 65, 278-282.
- Keen N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*. 24, 447-463.
- Keinath N.F., Kierszniowska S., Lorek J., Bourdais G., Kessler S.A., Shimosato-Asano H., Grossniklaus U., Schulze W.X., Robatzek S. y Panstruga R. (2010). PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *Journal of Biological Chemistry*. 285, 39140-39149.
- Keith B., Dong X.N., Ausubel F.M. y Fink G.R. (1991). Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88, 8821-8825.
- Khan J.M., Qadeer A., Ahmad E., Ashraf R., Bhushan B., Chaturvedi S.K., Rabbani G. y Khan R.H. (2013) Monomeric banana lectin at acidic pH overrules conformational stability of its native dimeric form. *PLoS One*. 8, e62428.
- Khurana R., Uversky V.N., Nielsen L. y Fink A.L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye? *Journal of Biological Chemistry*. 276, 22715-22721.
- Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R. y Singh S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*. 151, 229-238.
- Kidd K.K. y Ruano G. (1995). Optimizing PCR. En PCR 2. A practical approach (McPherson M.J., Hames B.D. y Taylor G.R.). *Oxford University Press*.
- Kim J.F. y Beer S.V. (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *Journal of Bacteriology*. 180, 5203-5210.
- Kim J.G., Park B.K., Yoo C.H., Jeon E., Oh J. y Hwang I. (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*. 185, 3155-3166.
- Kim J.G., Jeon E., Oh J., Moon J.S. y Hwang I. (2004). Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *Journal of Bacteriology*. 186, 6239-6247.
- Kim Y.C., Kim S.Y., Choi D., Ryu C.M. y Park J.M. (2008). Molecular characterization of a pepper C2 domain-containing SRC2 protein implicated in resistance against host and non-host pathogens and abiotic stresses. *Planta*. 227, 1169-1179.

- Kim J.G., Li X., Roden J.A., Taylor K.W., Aakre C.D., Su B., Lalonde S., Kirik A., Chen Y., Baranage G., McLane H., Martin G.B., Mudgett M.B. (2009). *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1. *Plant Cell*. 21, 1305-1323.
- Kim J.G., Stork W. y Mudgett M.B. (2013). *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SIERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host and Microbe*. 13, 143-154.
- Klunk W.E., Pettegrew J.W. y Abraham D.J. (1989). Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 37, 1273-1281.
- Klunk W.E., Jacob R.F. y Mason R.P. (1999). Quantifying amyloid beta-peptide (Abeta) aggregation using the Congo red-Abeta (CR-abeta) spectrophotometric assay. *Analytical Biochemistry*. 266, 66-76.
- Koch E. y Slusarenko A. (1990). *Arabidopsis* is susceptible to infection by a Downy Mildew Fungus. *Plant Cell*. 2, 437-445.
- Koebnik R. (2001). The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends in Microbiology*. 9, 586-590.
- Koebnik R., Krüger A., Thieme F., Urban A. y Bonas U. (2006). Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *Journal of Bacteriology*. 188, 7652-7660.
- Koizumi M. (1977). Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. *Proceedings International Society of Citriculture*. 3, 924-928.
- Kooijman E.E., Tieleman D.P., Testerink C., Munnik T., Rijkers D.T.S., Burger K.N.J. y de Kruijff B. (2007). An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 11356-11364.
- Koster M., Bitter W., de Cock H., Allaoui A., Cornelis G.R. y Tommassen J. (1997). The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Molecular Microbiology*. 26, 789-797.
- Kourie J.I. y Henry C.L. (2002). Ion channel formation and membrane-linked pathologies of misfolded hydrophobic proteins: the role of dangerous unchaperoned molecules. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29, 741-53.
- Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T., Farris M.A., Roop R.M. 2nd y Peterson K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 166, 175-176.
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. y Felix G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*. 16, 3496-3507.
- Kurepa J., Wang S., Li Y. y Smalle J. (2009). Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling and Behavior*. 4, 924-927.
- Kvitko B.H., Ramos A.R., Morello J.E., Oh H.S. y Collmer A. (2007). Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *Journal of Bacteriology*. 189, 8059-8072.
- Kyte J. y Doolittle R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 157, 105-32.

- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lam A.R., Rodriguez J.J., Rojas A., Scheraga H.A. y Mukamel S. (2013). Tracking the mechanism of fibril assembly by simulated two-dimensional ultraviolet spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*. 117, 342-350.
- Lamb C. y Dixon R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48, 251-275.
- Lawson R.H., Dienelt M.M. y Civerolo E.L. (1989). Histopatología de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: light and scanning electron microscopy. *Phytopathology*. 79, 329-335.
- Laxalt A.M., Cassia R.O., Sanllorenti P.M., Andreu A.B., Daleo G.R., Conde R.D., Lamattina L. (1996). Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Molecular Biology*. 30, 961-972.
- Le Gall F., Bove J.M. y Garnier M. (1998). Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 4566-4572.
- Leach J.E. y White F.F. (1996). Bacterial avirulence genes. *Annual Review of Phytopathology*. 34, 153-179.
- Leben C. (1963). Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* on tomato seedlings. *Phytopathology*. 53, 778-781.
- Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki A.P., Panopoulos N.J., Noller J., Weiler E.W., Cornelis G.R., Mansfield J.W. y Nürnberger, T. (2001). HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 289-294.
- Lee J., Teitzel G.M., Munkvold K., del Pozo O., Martin G.B., Michelmore R.W. y Greenberg J.T. (2012). Type III secretion and effectors shape the survival and growth pattern of *Pseudomonas syringae* on leaf surfaces. *Plant Physiology*. 158, 1803-18.
- Leite R.P. Jr., Egel D.S. y Stall R.E. (1994). Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 1078-1086.
- LeVine H. 3rd. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*. 2, 404-410.
- Leyns F., de Cleene M., Swings J. y de Ley J. (1984). The host range of *Xanthomonas*. *The Botanical Review*. 50, 308-356.
- Li C.M., Brown I., Mansfield J., Stevens C., Boureau T., Romantschuk M. y Taira S. (2002). The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *The EMBO Journal*. 21, 1909-1915.
- Li C.M., Haapalainen M., Lee J., Nürnberger T., Romantschuk M. y Taira S. (2005). Harpin of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* harbors a protein binding site. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18, 60-66.

- Li J.G., Liu H.X., Cao J., Chen L.F., Gu C., Allen C. y Guo J.H. (2010). PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Molecular Plant Pathology*. 11, 371-81.
- Li Y.R., Ma W.X., Che Y.Z., Zou L.F., Zakria M., Zou H.S. y Chen G.Y. (2013). A highly-conserved single-stranded DNA-binding protein in *Xanthomonas* functions as a harpin-like protein to trigger plant immunity. *PLoS One*. 8, e56240.
- Ligterink W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H., Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*. 276, 2054-2057.
- Lindgren P.B. (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 35, 129-52.
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S. y Schulze-Lefert P. (2005). Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*. 310, 1180-1183.
- Lipka U., Fuchs R. y Lipka V. (2008). *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 404-411.
- Liu Y., Schiff M., Serino G., Deng X.W. y Dinesh-Kumar S.P. (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell*. 14, 1483-1496.
- Liu J.J. y Ekramoddoullah A.K.M. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 68, 3-13.
- Livak K.J. y Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25, 402-408.
- Lloyd S.A., Sjöström M., Andersson S. y Wolf-Watz H. (2002). Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Molecular Microbiology*. 43, 51-59.
- Lomonossoff G.P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 33, 323-343.
- Lopes-Caitar V.S., de Carvalho M.C., Darben L.M., Kuwahara M.K., Nepomuceno A.L., Dias W.P., Abdelnoor R.V. y Marcelino-Guimarães F.C. (2013). Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*. 14, 577.
- Loris R. (2002) Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biochimica et Biophysica Acta*. 1572, 198-208.
- Løvdal T. y Lillo C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*. 387, 238-42.
- Luna E., Pastor V., Robert J, Flors V., Mauch-Mani B., y Ton J. (2011). Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24, 183-193.
- Mach J. (2010) Copper transport and bacterial pathogenesis in rice. *Plant Cell*. 22, 2923.

- Magbanua Z.V., De Moraes C.M., Brooks T.D., Williams W.P. y Luthe D.S. (2007). Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 697-706.
- Marie C., Broughton W.J. y Deakin W.J. (2001). Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology*. 4, 336-342.
- Marlovits T.C., Kubori T., Sukhan A., Thomas D.R., Galán J.E. y Unger V.M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*. 306, 1040-1042.
- Marshall N.M., Garner D.K., Wilson T.D., Gao Y.G., Robinson H., Nilges M.J. y Lu Y. (2009). Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range. *Nature*. 462, 113-116.
- Mayrose M., Ekengren S.K., Melech-Bonfil S., Martin G.B. y Sessa G. (2006). A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology*. 7, 593-604.
- Maytal-Kivity V., Reis N., Hofmann K. y Glickman M.H. (2002). MPN⁺, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochemistry*. 3, 28.
- Mazar J. y Cotter P.A. (2007). New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends in Microbiology*. 15, 508-515.
- Mehta A. y Rosato Y.B. (2003). A simple method for *in vivo* expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Current Microbiology*. 47, 400-403.
- Mendgen K. y Hahn M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*. 7, 352-356.
- Miao W., Wang X., Li M., Song C., Wang Y., Hu D. y Wang J. (2010a). Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpa_{Xoo}* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism. *BMC Plant Biology*. 10, 1-14.
- Miao W.G., Song C.F., Wang Y. y Wang J.S. (2010b). HpaXm from *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* is a novel harpin with two heptads for hypersensitive response. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20, 54-62.
- Mishina T.E. y Zeier J (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 50, 500-513.
- Mitsuhashi I., Iwai T., Seo S., Yanagawa Y., Kawahigasi H., Hirose S., Ohkawa Y. y Ohashi Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*. 279, 415-427.
- Mittler R., Herr E.H., Ovar B.L., van Camp W., Willekens H., Inze D. y Ellis B.E. (1999). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96, 14165-14170.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 7, 405-410.
- Moelbert S., Emberly E. y Tang C. (2004). Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. *Protein Science*. 13, 752-762.

- Mongkolsuk S., Loprasert S., Vattanaviboon P., Chanvani-chayachai C., Chamnongpol S. y Supsamran N. (1996). Heterologous growth phase- and temperature-dependent expression and toxicity protection of a superoxide-inducible monofunctional catalase gene from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*. 178, 3578-3584.
- Montagner C., Arquint C. y Cornelis G.R. (2011). Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes. *Journal of Bacteriology*. 193, 6923-6928.
- Moreira L.M., de Souza R.F., Digiampietri L.A., da Silva A.C. y Setubal J.C. (2005). Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *OMICS*. 9, 43-76.
- Morel J.B. y Dangl J.L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*. 4, 671-683.
- Mortimer J.C., Laohavisit A., Macpherson N., Webb A., Brownlee C., Battey N.H. y Davies J.M. (2008). Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. *Journal of Experimental Botany*. 59, 533-544.
- Mosblech A., Feussner I. y Heilmann I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47, 511-517.
- Mousavi A. y Hotta Y. (2005). Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 120, 169-174.
- Mukhopadhyay D. y Riezman H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 315, 201-205.
- Mysore K.S. y Ryu C.M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*. 9, 97-104.
- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Sller I., Robatzek S., Boller T. y Jones J.D.G. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*. 135, 1113-1128.
- Nawrot R., Tomaszewski L., Czerwoniec A. y Godzicka-Jzefiak A. (2013). Identification of a Coding Sequence and Structure Modeling of a Glycine-Rich RNA-Binding Protein (CmGRP1) from *Chelidonium majus* L. *Plant Molecular Biology Reporter*. 31, 470-476.
- Nersissian A.M., Immoos C., Hill M.G., Hart P.J., Williams G., Herrmann R.G. y Valentine J.S. (1998). Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Science*. 7, 1915-1929.
- Newman M.A., von Roepenack-Lahaye E., Parr A., Daniels M.J. y Dow J.M. (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal*. 29, 487-495.
- Nguyen H.P., Chakravarthy S., Velasquez A.C., McLane H.L., Zeng L., Nakayashiki H., Park D.H., Collmer A. y Martin G. (2010). Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23, 991-999.
- Nimchuk Z.L., Eulgem T., Holt III B.F. y Dangl J.L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*. 37, 579-609.

- Nishimura S., Tatano S., Miyamoto Y., Ohtani K., Fukumoto T., Gomi K., Tada Y., Ichimura K. y Akimitsu K. (2013). A zinc-binding citrus protein metallothionein can act as a plant defense factor by controlling host-selective ACR-toxin production. *Plant Molecular Biology*. 81, 1-11.
- Noël L., Thieme F., Nennstiel D. y Bonas U. (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*. 184, 1340-1348.
- Oh S.K., Lee S., Chung E., Park J.M., Yu S.H., Ryu C.M. y Choi D. (2006). Insight into types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. *Planta*. 223, 1101-1107.
- Oh J., Kim J.G., Jeon E., Yoo C.H., Moon J.S., Rhee S., Hwang I. (2007). Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 13601-13609.
- Oh C.S. y Beer S.V. (2007). AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 145, 426-36.
- Omori K. e Idei A. (2003). Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95, 1-12.
- Overmyer K., Brosché M. y Kangasjärvi J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science*. 8, 335-342.
- Park C.J., Park C.B., Hong S.S., Lee H.S., Lee S.Y. y Kim S.C. (2000). Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Molecular Biology*. 44, 187-197.
- Park A.R., Cho S.K., Yun U.J., Jin M.Y., Lee S.H., Sachetto-Martins G. y Park O.K. (2001). Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 26688-26693.
- Peng J.L., Bao Z.L., Ren H.Y., Wang J.S., y Dong H.S. (2004). Expression of Harpin_{Xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. *Bacteriology*. 94, 1048-55.
- Pike C.J., Walencewicz-Wasserman A.J., Kosmoski J., Cribbs D.H., Glabe C.G. y Cotman C.W. (1995). Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: contributions of the β 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*. 64, 253-265.
- Porter K., Shimono M., Tian M. y Day B. (2012). Arabidopsis Actin-Depolymerizing Factor-4 links pathogen perception, defense activation and transcription to cytoskeletal dynamics. *PLoS Pathogens*. 8, e1003006.
- Preston G.M., Studholme D.J. y Caldelari I. (2005). Profiling the secretomes of plant pathogenic proteobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 331-360.
- Price J., Li T.C., Kang S.G., Na J.K. y Jang J.C. (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 132, 1424-1438.
- Punja Z.K. y Zhang Y.Y. (1993). Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology*. 25, 526-540.

- Racapé J., Belbahri L., Engelhardt S., Lacombe B., Lee J., Lochman J., Marais A., Nicole M., Nürnberger T., Parlange F., Puvarel S. y Séller H. (2005). Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Molecular Microbiology*. 58, 1406-1420.
- Rademaker J.L., Louws F.J., Schultz M.H., Rossbach U., Vauterin L., Swings J. y de Bruijn F.J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for Xanthomonas. *Phytopathology*. 95, 1098-1111.
- Rahme L.G., Mindrinos M.N. y Panopoulos. N.J. (1992). Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* Genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*. 174, 3499-3507.
- Rebutier D., Frankart C., Briand J., Biligui B., Rona J.P., Haapalainen M., Barny M.A. y Bouteau F. (2007). Antagonistic action of harpin proteins: HrpW_{ea} from *Erwinia amylovora* suppresses HrpN_{ea}-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science*. 20, 3271-3278.
- Regente M.C., Giudici A.M., Villalaín J. y de la Canal L. (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology*. 40, 183-189.
- Rial D.V., Lombardo V.A., Ceccarelli E.A. y Ottado J. (2002). The import of ferredoxin-NADP⁺ reductase precursor into chloroplasts is modulated by the region between the transit peptide and the mature core of the protein. *European Journal of Biochemistry*. 269, 5431-5439.
- Ribet D. y Cossart P. (2010). Pathogen-mediated posttranslational modifications: A re-emerging field. *Cell*. 143, 694-702.
- Richau K.H., Kaschani F., Verdoes M., Pansuriya T.C., Niessen S., Stüber K., Colby T., Overkleeft H.S., Bogyo M. y van der Hoorn R.A. (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology*. 158, 1583-1599.
- Ringli C., Keller B. y Ryser U. (2001). Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58, 1430-1441.
- Roine E., Wei W., Yuan J., Nurmiaho-Lassila E.L., Kalkkinen N., Romantchuk M. y He S.Y. (1997). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94, 3459-3464.
- Russell A.B., Brook Peterson S. y Mougous J.D. (2014). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*. 12, 137-148.
- Rustérucci C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.J., Etienne P., Suty L., Blein J.P. y Triantaphylidès C. (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin of tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 36446-36455.
- Salinas-Mondragón R.E., Garcidueñas-Piña C. y Guzmán P. (1999). Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 40, 579-590.
- Sambrook J., Fritsh E.F. y Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual (2^o edición). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sambrook J. y Russell D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual (3^o edición). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Scarpeci T.E., Zanor M.I., Carrillo N., Mueller-Roeber B., Valle E.M. (2008). Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Molecular Biology*. 66, 361-78.
- Schaad N.W., Vidaver A.K., Lacy G.H., Rudolph K. y Jones, J.B. (2000). Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. *Phytopathology*. 90, 208-213.
- Schaaf J., Walter M.H. y Hess D. (1995). Primary metabolism in plant defense. *Plant Physiology*. 108, 949-960.
- Schägger H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*. 1, 16-22.
- Schechter L.M., Roberts K.A., Jamir Y., Alfano J.R. y Collmer A. (2004). *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a *Cya* translocation reporter. *Journal of Bacteriology*. 186, 543-555.
- Scheideler M., Schlaich N.L., Fellenberg K., Beissbarth T., Hauser N.C., Vingron M., Slusarenko A.J. y Hoheisel J.D. (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolisms in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 10555-10561.
- Schillberg S., Zimmermann S., Zhang M.Y. y Fischer R. (2001). Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Research*. 10, 1-12.
- Schmeisser C., Liesegang H., Krysiak D., Bakkou N., Le Querré A., Wollherr A., Heinemeyer I., Morgenstern B., Pommerening-Röser A., Flores M., Palacios R., Brenner S., Gottschalk G., Schmitz R.A., Broughton W.J., Pret X., Strittmatter A.W. y Streit W.R. (2009). *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 4035-4045.
- Schnell J.D. y Hicke L. (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 35857-35860.
- Schulte R. y Bonas U. (1992a). A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. *Plant Cell*. 4, 79-86.
- Schulte R. y Bonas U. (1992b). Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of Bacteriology*. 174, 815-823.
- Schulze-Lefert P. (2004). Plant Immunity: the origami of receptor activation. *Current Biology*. 14, 22-24.
- Schwechheimer C., Serino G., Callis J., Crosby W.L., Lyapina S., Deshaies R.J., Gray W.M., Estelle M. y Deng X.W. (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response. *Science*. 292, 1379-1382.
- Schwessinger B. y Zipfel C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 389-395.
- Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamanoi K., Sasakawai C. y Abe A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 11638-11643.
- Shao M., Wang J., Dean R.A., Lin Y., Gao X. y Hu S. (2008). Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnology Journal*. 6, 73-81.

- Shindo T. y van der Hoorn R.A. (2008). Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Molecular Plant Pathology*. 9, 119-125.
- Shrestha R., Park D.H., Cho J.M., Cho S., Wilson C., Hwang I, Hur J.H. y Lim C.K. (2008). Genetic Organization of the *hrp* genes cluster in *Erwinia pyrifoliae* and characterization of HR active domains in HrpN_{Ep} protein by mutational analysis. *Molecules and Cells*. 25, 30-42.
- Shirasu K. y Schulze-Lefert P. (2003). Complex formation, promiscuity and multifunctionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in Plant Science*. 8, 252-258.
- Sinn J.P., Oh C.S., Jensen P.J., Carpenter S.C.D., Beer S.V. y McNellis T.W. (2008). The C-terminal half of the HrpN virulence protein of the Fire Blight pathogen *Erwinia amylovora* is essential for lipo secretion and for its virulence and avirulence activities. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21, 1387-1397.
- Smalle J. y Vierstra R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 555-590.
- Souza D.P., Andrade M.O., Alvarez-Martinez C.E., Arantes G.M., Farah C.S. y Salinas R.K. (2011). A component of the Xanthomonadaceae type IV secretion system combines a VirB7 motif with a NO domain found in outer membrane transport proteins. *PLoS Pathogens*. 7, 1-18.
- Stall R.E., Marcó C.M. y Canteros de Echenique B.I. (1982). Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of Citrus. *Phytopathology*. 72, 1097-1100.
- Stall R.E., Miller J.W., Marcó G.M. y Canteros de Echenique B.I. (1980). Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 93, 10-14.
- Starr M.P. (1981). The genus *Xanthomonas*. En: *The Prokaryotes*. Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A. y Schlegel H.G. p. 742-763.
- Swaroopa Rani T. y Podile A.R. (2014). Extracellular matrix-associated proteome changes during non-host resistance in citrus-*Xanthomonas* interactions. *Physiologia Plantarum*. 150, 565-579.
- Swarup S., De Feyter R., Bransky R.H. y Gabiel D.W. (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. *Phytopathology*. 81, 802-809.
- Swindell W.R., Huebner M. y Weber A.P. (2007). Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. 8, 125.
- Swings J.G. y Civerolo E.L. (1993). En *Xanthomonas*. Chapman y Hall.
- Tampakaki A.P. y Panopoulos N.J. (2000). Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{PspH} produced in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13, 1366-1374.
- Tampakaki A.P., Fadouloglou V.E., Gazi A.D., Panopoulos N.J. y Kokkinidis M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology*. 6, 805-816.
- Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H.S., Han B., Zhu T., Zou G. y Katagiri F. (2003). Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*. 15, 317-330.

- Tarafdar P.K., Vedantam L.V., Kondreddy A., Podile A.R. y Swamy M.J. (2009). Biophysical investigations on the aggregation and thermal unfolding of harpin(Pss) and identification of leucine-zipper-like motifs in harpins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1794, 1684-92.
- Tausz M., Sircelj H. y Grill D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*. 55, 1955-1962.
- Taylor M.A., Baker K.C., Briggs G.S., Connerton I.F., Cummings N.J., Pratt K.A., Revell D.F., Freedman R.B. y Goodenough P.W. (1995). Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV-are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Engineering*. 8, 59-62.
- Testerink C. y Munnik T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science*. 10, 368-375.
- Thieme F., Szczesny R., Urban A., Kirchner O., Hause G. y Bonas U. (2007). New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 1250-1261.
- Thomma B.P.H.J, Nürnberger T. y Joosten M.H.A.J. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*. 23, 4-15.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y. y Collinge D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*. 11, 1187-1194.
- Tian M., Chaudhry F., Ruzicka D.R., Meagher R.B., Staiger C.J. y Day B. (2009). Arabidopsis actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction triggered by the *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB. *Plant Physiology*. 150, 815-824.
- Tran H.J., Allen M.D., Löwe J. y Bycroft M. (2003). Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function. *Biochemistry*. 42, 11460-11465.
- Tsuda K. y Katagiri F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 13, 459-465.
- Tsukuda S., Gomi K., Yamamoto H. Akimitsu K. (2006). Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* lush. *Plant molecular biology*. 60, 125-136.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76, 4350-4354.
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T.A., Judson R.S., Knight J.R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamar G., Yang M., Johnston M., Fields S. y Rothberg J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 403, 623-627.
- van Criekinge W. y Beyaert R. (1999). Yeast two-hybrid: state of the art. *Biological Procedures Online*. 2, 1-38.
- van der Biezen E.A. y Jones J.D.G. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*. 23, 454-456.

- van der Hoorn R.A.L. y Kamoun S. (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*. 20, 2009-2017.
- van Gijsegem F., Vasse J., Camus J.C., Marena M. y Boucher C. (2000). *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Molecular Microbiology*. 36, 249-260.
- van Gijsegem F., Vasse J., De Rycke R., Castello P. y Boucher C. (2002). Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Molecular Microbiology*. 44, 935-946.
- van Loon L.C. y van Strien E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55, 85-97.
- van Loon L.C., Rep M. y Pieterse C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44, 135-162.
- van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E.A., Menck C.F.M., da Silva A.C.R., Ferro J.A., Oliveira M.C., Setúbal J.C., Kitajima J.P. y Simpson A.J. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 40, 169-89.
- Vauterin L., Rademaker J. y Swings J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 90, 677-682.
- Venisse J.S., Gullner G. y Brisset M.N. (2001). Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*. 125, 2164-2172.
- Viprey V., Del Greco A., Golinowski W., Broughton W.J. y Perre X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular Microbiology*. 28, 1381-1389.
- Voegelé R.T. y Mendgen K. (2003). Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*. 159, 93-100.
- Voulhoux R., Ball G., Ize B., Vasiil M.L., Lazdunski A., Wu L.F. y Filloux A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *The EMBO Journal*. 20, 6735-6741.
- Wang X., Li M., Zhang J., Zhang Y., Zhang G. y Wang J. (2007). Identification of a key functional region in harpins from *Xanthomonas* that suppresses protein aggregation and mediates harpin expression in *E. coli*. *Molecular Biology Reports*. 34, 189-98.
- Wang X.Y., Song C.F., Miao W.G., Ji Z.L., Wang X., Zhang Y., Zhang J.H., Hu J.S., Borth W. y Wang J.S. (2008). Mutations in the N-terminal coding region of the harpin protein Hpa1 from *Xanthomonas oryzae* cause loss of hypersensitive reaction induction in tobacco. *Applied microbiology and biotechnology*. 81, 359-369.
- Wäspi U., Misteli B., Hasslacher M., Jandrositz A., Kohlwein S.D., Schwab H. y Dudler R. (1998). The defense-related rice gene Pir7b encodes an alpha/beta hydrolase fold protein exhibiting esterase activity towards naphthol AS-esters. *European Journal of Biochemistry*. 254, 32-37.
- Wasternack C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 100, 681-697.

- Weber E., Ojanen-Reuhs T., Huguet E., Hause G., Romantschuk M., Korhonen T.K., Bonas U. y Koebnik R. (2005). The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *Journal of Bacteriology*. 187, 2458-2468.
- Weber E. y Koebnik R. (2005). Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*. 187, 6175-6186.
- Wei N. y Deng X.W. (1992) COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 4, 1507-1518.
- Wei Z.M., Laby R.J., Zumoff C.H., Bauer D.W., He S.Y., Collmer A. y Beer S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*. 257, 85-88.
- Wei N., Chamovitz D.A. y Deng X.W. (1994) Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*. 78, 117-124.
- Wei Z.M. y Beer S.V. (1995). *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *Journal of Bacteriology*. 177, 6201-10.
- Wei N., Deng X.W. (2003). The COP9 signalosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 19, 261-286.
- Wengelnik K. y Bonas U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*. 178, 3462-3469.
- Wengelnik K., van den Ackerveken G. y Bonas U. (1996). HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 9, 704-712.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montau M., Inze D. y Van Camp W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *The EMBO Journal*. 16, 4806-4816.
- Wolf D.A., Zhou C. y Wee S. (2003). The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nature Cell Biology*. 5, 1029-1033.
- Yan Q., Jiang Z., Yang S., Deng W. y Han L. (2005). A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 442, 72-81.
- Yang Z., Park H., Lacy G.H. y Cramer C.L. (1991). Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell*. 3, 397-405.
- Yanish-Perron C.J., Vieira J. y Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33, 103-119.
- Yap M.N., Rojas C.M., Yang C-H. y Charkowski A.O. (2006). Harpin mediates cell aggregation in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*. 188, 2280-2284.
- Yeats T.H. y Rose J.K. (2007). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science*. 17, 191-198.
- Yuan M., Chu Z., Li X., Xu C. y Wang S. (2010). The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell*. 22, 3164-3176.

- Yuan M., Li X., Xiao J. y Wang S. (2011). Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biology*. 11, 69.
- Zhang C., Gutsche A.T, y Shapiro A.D. (2004). Feedback control of the *Arabidopsis* hypersensitive Rresponse. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17, 357-365.
- Zhang Y., Callaway E.M., Jones J.B., y Wilson M. (2009). Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *European Journal of Plant Pathology*. 124, 379-390.
- Zheng M.S., Takahashi H., Miyazaki A., Hamamoto H., Shah J., Yamaguchi I. y Kusano T. (2004). Up-regulation of *Arabidopsis thaliana NHL10* in the hypersensitive response to *Cucumber mosaic virus* infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Planta*. 218, 740-750.
- Zhou J., Tang X. y Martin G.B. (1997). The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *The EMBO Journal*. 16, 3207-3218.
- Zhou J.M. y Chai J. (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current Opinion in Microbiology*. 11, 179-185.
- Zhu w., Magbanua M.M. y White F.F. (2000). Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*. 182, 1844-1853.
- Zimaro T., Thomas L., Maronedze C., Sgro G.G., Garofalo C.G., Ficarra F.A., Gehring C., Ottado J. y Gottig N. (2014). The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. *BMC Microbiology*. 14, 96.
- Zimmermann S., Schillberg S., Liao Y.C. y Fisher R. (1998). Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in shape *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding*. 4, 369-379.
- Zipfel C. y Rathjen J.P. (2008). Plant immunity: AvrPto targets the frontline. *Current Biology*. 18, 218-220.
- Zoued A., Brunet Y.R., Durand E., Aschtgen M.S., Logger L., Douzi B., Journet L., Cambillau C. y Cascales E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.018.