

Mecanismos de defensa y de evasión de defensa y virulencia en la interacción de *Pseudomonas syringae* con su planta huésped

Javier Ruiz Albert y Carmen R. Beuzón López



Dpto. de Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071-Málaga (Spain)



Miembros del grupo: (de izquierda a derecha) Javier Ruiz Albert, Diego López Márquez, Carmen R. Beuzón López, Javier Rueda Blanco, Nieves López Pagán, y Ángel del Espino Pérez.

HISTORIA DEL GRUPO

El grupo comenzó su andadura en el Área de Genética de la Universidad de Málaga (UMA) en 2003, dirigido por Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz Albert, formados en la Universidad de Sevilla (US), y procedentes del Imperial College London tras una estancia postdoctoral en un grupo líder en la interacción molecular entre *Salmonella enterica* y su huésped. Centrado en la contribución a la virulencia del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), su regulación, y sus efectores asociados, este trabajo generó numerosas publicaciones, algunas de ellas de referencia en el campo.

La transición a la UMA, determinó un cambio a una temática análoga centrada en

la interacción molecular de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* con sus huéspedes vegetales, adaptándonos al nuevo entorno, pero aprovechando la experiencia de etapas previas. El grupo desarrolla investigación a nivel molecular, combinando patosistemas modelo planta-bacteria (*Arabidopsis*) con patosistemas de relevancia agronómica (tomate; judía). El grupo forma parte del núcleo fundador del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC). Hemos obtenido financiación ininterrumpida desde 2003 (6 proyectos consecutivos del Plan Nacional, tres proyectos de excelencia y uno FEDER de la Junta de Andalucía, y un contrato con la Fundación Genoma España).

Disfrutamos de numerosas colaboraciones que han dado lugar a publicaciones con

investigadores de diversos centros nacionales como el propio IHSM-UMA-CSIC, IBM-CP-CSIC, EEZ-CSIC, o la US; y numerosos centros internacionales como INRA-CNRS y LRSV-Université de Toulouse, Francia; FORTH, Grecia; CNR, Italia; SIBS, China; Imperial College London, CRIB-UWE, y WISB-University of Warwick; UK; o CIBIO-InBIO-Universidade do Porto, Portugal. Estas colaboraciones se amplían mediante nuestra participación en redes nacionales (REDFLAG) e internacionales (HUPLANT-COST Action 16110 y SUSTAIN-COST Action FA1208).

El grupo constituye un excelente entorno para la formación de personal investigador, contribuyendo a iniciar la carrera investigadora de numerosos alumnos mediante TFGs y TFMs experimentales (>30 defendidos y

varios en progreso), y Tesis Doctorales (8 defendidas, 3 con premio extraordinario de doctorado, y cuatro en progreso), incluyendo numerosas estancias externas de investigación y con una considerable producción científica por doctorando. Todos los doctores egresados continúan en activo en investigación básica o aplicada, algunos con destacable éxito.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Nuestra investigación se centra en la interacción entre la bacteria patógena *P. syringae* y la planta, abordando los procesos moleculares relevantes tanto por parte del patógeno como del huésped. Mantenemos una aproximación experimental abierta e interdisciplinaria que evoluciona conforme a las necesidades de los proyectos desarrollados, que nos permite abordar preguntas novedosas que abren el campo de investigación. La co-evolución patógeno-huésped ha dado lugar a estrategias de invasión y colonización bacterianas, con sistemas dedicados a la introducción de proteínas de virulencia (T3SS) para evadir y suprimir los correspondientes mecanismos de defensa de la planta. Nuestro trabajo ha incluido la caracterización funcional de efectores y su relación con las defensas de la planta, así como la regulación de la expresión del sistema de virulencia. Entre otros hitos, hemos determinado la contribución a la virulencia del repertorio de T3Es de *P. syringae* 1448a, una de las principales estirpes modelo (1, 2), mejorando técnicas de generación de mutantes y desarrollando técnicas de análisis genético *in planta* (*competitive index*, CIs) (3) y referencias incluidas). Hemos sido los primeros en describir la capacidad de supresión de todos los niveles de defensa de la planta (PTI, ETI, y SAR) por parte de un efector, HopZ1, analizando las rutas de transducción de señal implicadas en su reconocimiento en plantas resistentes (4), y caracterizado en su patosistema natural la capacidad de supresión de defensas del efector de la misma familia HopZ3 (5).

Hemos descrito mecanismos de regulación positiva y negativa de la expresión de los genes del T3SS en Pph1448a (6, 7), y colaborado en establecer un enlace entre regulación de la expresión y secreción (8). Hemos descrito por vez primera en un fitopatógeno

heterogeneidad fenotípica en la expresión del T3SS (9) y del flagelo, que da lugar a linajes bacterianos que difieren en la expresión de estos aspectos clave de la virulencia de *P. syringae*. También hemos descrito la dinámica, clonalidad e interacciones de poblaciones mixtas *in planta* (10).

Líneas adicionales en colaboración con otros grupos, en torno a la caracterización de la interferencia entre geminivirus y sumoilación en planta, en colaboración con Eduardo R. Bejarano (IHSM-UMA-CSIC) y Herlander Azevedo (Universidade do Porto) ha dado lugar a cinco artículos, mientras que el desarrollo de herramientas genómicas en olivo y su aplicación a calidad del fruto y aceite, y caracteres de interés agronómico, dentro del consorcio OLEAGEN (Genoma España), ha dado lugar a otros cinco artículos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En nuestro actual proyecto del Plan Nacional (RTI2018-095069-B-I00) estamos analizando el metiloma de *P. syringae* en condiciones de laboratorio y en planta y buscando loci candidatos a presentar heterogeneidad fenotípica. Hemos identificado y estamos caracterizando las metilasas de DNA potencialmente asociadas a dicha regulación. Estamos ampliando nuestra caracterización del papel de la heterogeneidad fenotípica en la adaptación de *P. syringae* a la planta, explorando potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Dentro del mismo proyecto, y en colaboración con el grupo de Josep Casadesús (US), analizamos el papel de la heterogeneidad fenotípica durante la colonización de la planta por *Salmonella*, asociado a más del 25% de los brotes epidémicos de salmonelosis (CDC-USA), por contaminación interna de fruta y verdura fresca destinada al consumo. Esta línea aprovecha la experiencia en *Salmonella* de los investigadores principales previa a la formación del grupo, combinada con su experiencia en patogénesis en plantas acumulada desde entonces.

Finalmente, en el contexto de un proyecto FEDER y nuestra colaboración con el grupo de Eduardo R. Bejarano (IHSM-UMA-CSIC), estamos caracterizando un mecanismo de

regulación en la planta que controla la expresión de genes TIR-NBS-LRR en ausencia de patógenos, limitando su impacto en *fitness* de la planta, permitiendo su activación en dos oleadas en presencia de patógenos. Este mecanismo de defensa inducible, no ligado a un único gen de avirulencia, tiene gran potencial para el desarrollo de estrategias de resistencia eficaces y robustas.

REFERENCIAS

- Zumaquero A, Macho AP, Rufián JS, Beuzón CR** (2010) Analysis of the role of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a in interaction with the plant. *J Bacteriol.* 192(17):4474-88.
- Macho AP, Zumaquero A, Gonzalez-Plaza JJ, Ortiz-Martín I, Rufián JS, Beuzón CR** (2012) Genetic Analysis of the Individual Contribution to Virulence of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *PLoS ONE* 7: e35871.
- Macho AP, Rufián JS, Ruiz-Albert J, Beuzón CR** (2016) Competitive Index: Mixed Infection-Based Virulence Assays for Genetic Analysis in *Pseudomonas syringae*-Plant Interactions. In: Botella J., Botella M. (eds) *Plant Signal Transduction. Methods in Molecular Biology*, 1363: 209-17, Humana Press, New York, NY
- Macho AP, Guevara CM, Tornero P, Ruiz-Albert J, Beuzón CR** (2010) The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytologist.* 187:1018-1033.
- Rufián JS, Lucía A, Rueda-Blanco J, Zumaquero A, Guevara CM, Ortiz-Martín I, Ruiz-Aldea G, Macho AP, Beuzón CR, Ruiz-Albert J** (2018) Suppression of HopZ Effector-triggered Plant Immunity in a natural pathosystem. *Front Plant Sci* 14:977.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Mansfield JW, Beuzón CR** (2010) Negative Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant-Microbe Interact.* 23:682-701.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Macho AP, Mansfield JW, Beuzón CR** (2010) Positive Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant -Microbe Interactions.* 23:665-681.
- Charova SN, Gazi AD, Mylonas E, Pozidis C, Sabarít B, Anagnostou D, Psatha K, Aivaliotis M, Beuzón CR, Panopoulos NJ, Kokkinidis M** (2018) Migration of Type III Secretion System Transcriptional Regulators Links Gene Expression to Secretion. *mBio* 31:9 pii: e01096-18.
- Rufián JS, Sánchez-Romero M-A, López-Márquez D, Macho AP, Mansfield JW, Arnold DL, Ruiz-Albert J, Casadesús J, Beuzón CR** (2016) *Pseudomonas syringae* differentiates into phenotypically distinct subpopulations during colonization of a plant host. *Environ microbiol.*
- Rufián JS, Macho AP, Corry DS, Mansfield JW, Ruiz-Albert J, Arnold DL, Beuzón CR** (2018) Confocal microscopy reveals in planta dynamic interactions between pathogenic, avirulent and non-pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant Pathol.*