

Pseudomonas syringae pv *tomato* DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas

Emilia López Solanilla y Pablo Rodríguez Palenzuela
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas.
Universidad Politécnica de Madrid-INIA.
Campus de Montegancedo. Pozuelo de Alarcón 28223. Madrid
emilia.lopez@upm.es y pablo.rpalenzuela@upm.es

En condiciones ideales las plantas cultivadas pueden producir altos rendimientos, pero tales condiciones raramente ocurren. En general, los cultivos se ven afectados por estreses bióticos y abióticos que merman la producción. Se estima que las pérdidas mundiales debidas a enfermedades, plagas y malas hierbas oscilan entre el 31 y el 42 % (Agrios, 2005). No obstante, las pérdidas pueden ser dramáticas en algunos casos particulares. Además, las enfermedades producidas por bacterias, virus u hongos pueden afectar a la calidad del producto, producir efectos tóxicos en humanos y animales (como es el caso de las micotoxinas fúngicas) o incluso impedir completamente determinados cultivos en algunas áreas (Agrios, 2005).

Las enfermedades producidas por bacterias son particularmente difíciles de controlar debido fundamentalmente a dos razones:

- 1.- las bacterias se reproducen exponencialmente en condiciones favorables alcanzando grandes poblaciones en el interior o en la superficie de las plantas.
- 2.- al contrario que en el caso de los hongos, hay muy pocas sustancias agroquímicas efectivas contra estas enfermedades. Tradicionalmente el cobre se ha empleado como fitosanitario, aunque las poblaciones de bacterias desarrollan fácilmente resistencia a este elemento. Alternativamente se han empleado algunos antibióticos como la kasugamicina, con el riesgo que esto supone por el desarrollo de cepas resistentes.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 (PSPTO) Y *Dickeya dadantii* 3937 (DD 3937): DOS BACTERIAS MODELO EN FITOPATOLOGÍA.

PsPto y Dd 3937 han sido muy estudiadas a nivel molecular y genómico en los últimos años, y se han desarrollado numerosas herramientas para analizar diferentes aspectos

de su virulencia (ASAP: <https://asap.ahabs.wisc.edu/> y PPI: http://pseudomonas-syringae.org/pst_home.html).

PsPto es el agente causal de la mancha bacteriana del tomate y otras plantas hospedadoras. Este patógeno está incluido en la lista de “organismos dañinos y enfermedades que afectan a la calidad del tomate” (Commission Directive 92/33/EEC of 2 July 1993). La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de síntomas necróticos en hojas, tallos y frutos. La bacteria también puede crecer como epífita y endofita en la parte aérea de las plantas sin causar síntomas. Una vez en el interior de la planta, PsPto es capaz de multiplicarse en el espacio apoplástico explotando las células vivas circundantes e infectando tejidos adyacentes, por lo que esta bacteria suele considerarse un patógeno hemibiotrofo.

Aunque se han descrito diversos mecanismos implicados en la virulencia de PsPto tales como la producción de toxinas, hormonas o enzimas degradadoras de la pared celular, el componente esencial de la virulencia de esta bacteria es el sistema de secreción tipo III (T3SS). Dicho sistema, codificado por los genes *hrp* y *hrc* es necesario para la elicitación de la HR (respuesta hipersensible) en plantas no hospedadoras, así como para la patogénesis en plantas hospedadoras (Alfano y Collmer, 1996). El repertorio de los efectores proteicos inyectados en las células vegetales a través de este sistema ha recibido una considerable atención en los últimos años, poniendo de manifiesto el papel esencial de estas proteínas en la patogénesis. Los efectores contribuyen a la virulencia combatiendo las defensas de la planta y controlando la muerte celular asociada con los síntomas característicos de esta enfermedad. Investigaciones a nivel genómico han identificado más de 30 genes efectores. Alguno de estos efectores son capaces de suprimir la defensa innata de las plantas; no obstante el modo de acción de dichas proteínas sigue siendo poco conocido.

El otro modelo de bacteria fitopatógena en el que estamos interesados es *D. dadantii*, uno de los agentes causales de la podredumbre blanda de los vegetales. Esta enfermedad ocurre comúnmente en tejidos no lignificados de hortalizas y plantas ornamentales. La podredumbre blanda se produce en todo el mundo y ocasiona unas pérdidas totales superiores a cualquier otra enfermedad bacteriana (Agrios, 2005). Existe una directiva de la Comisión Europea (93/17/EEC of 30 March 1993) acerca de la calidad de la patata de siembra que establece que el tubérculo madre debe estar libre de diversos organismos perjudiciales, entre los que se encuentra *Dd 3937*.

Los síntomas de la podredumbre blanda comienzan como lesiones acuosas cuyo diámetro engrosa rápidamente. El tejido afectado se macera (color pardo, blando, viscoso y con mal olor). La maceración es fundamentalmente el resultado de enzimas hidrolíticas secretadas por la bacteria que destruyen la integridad de las paredes celulares de las plantas. *D. dadantii* es especialmente perniciosa debido a su capacidad de causar infecciones latentes, las cuales se activan en postcosecha. Además, *Dd 3937* puede sobrevivir como saprofito, epifito o endofito, siendo un habitante frecuente de las hojas, aguas continentales y suelos. Recientemente *Dickeya* sp. ha sido identificada como un problema emergente en Europa, incluida España.

La patogenicidad de *Dd 3937* ha sido intensamente estudiada a nivel molecular durante las últimas décadas. La aproximación tradicional hacía énfasis en el papel de las múltiples enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de las plantas liberando nutrientes que permiten el crecimiento bacteriano (Toth et al., 2003).

A pesar de que *PsPto* y *Dd 3037* suelen considerarse como especies modelo de “estilos de patogenicidad” muy diferentes, también comparten determinantes de virulencia, aunque el papel relativo en el proceso patogénico es diferente en cada caso. Por ejemplo T3SS es el factor de virulencia más importante en *PsPto* pero tiene un papel secundario en *Dd 3937*. Por tanto, el conocimiento adquirido en alguno de estos sistemas puede complementar al conocimiento del otro.

CONTEXTO TEMPORAL EN EL PROCESO PATOGENICO

Independientemente de cual sea su estilo de patogenicidad, un patógeno exitoso tiene que ser capaz de:

- 1.- Entrar en el tejido vegetal a través de aperturas naturales como los estomas o las heridas.
- 2.- Sobrevivir en las condiciones desfavorables prevalentes en el apoplasto.
- 3.- Utilizar y manipular los recursos de la planta para promover su propio crecimiento.

Por ello, para lograr una imagen completa de este proceso es esencial profundizar sobre la progresión de la infección en un contexto espacio-temporal. Este conocimiento puede facilitar el desarrollo de nuevas herramientas para el control de la enfermedad.

La entrada de la bacteria es una cuestión esencial en fitopatología dado que las bacterias, al contrario que los hongos, carecen de estructuras específicas para lograr el ingreso en la planta. Se acepta generalmente que las bacterias penetran a través de aperturas naturales (estomas, lenticelas) o heridas. No obstante quedan varias preguntas sin contestar: ¿Se mueven las bacterias en la superficie de las plantas? en caso afirmativo ¿se mueven mediante *swimming* o por otro tipo de movimiento? La quimiotaxis permite a las células bacterianas acercarse a determinados estímulos y alejarse de otros. Hasta el momento ha habido pocos estudios que aborden la cuestión del papel de la motilidad y quimiotaxis en bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, mutantes móviles pero no quimiotácticos de *Ralstonia solanacearum* están significativamente reducidos en virulencia en plantas de tomate, lo que indica que la motilidad dirigida y no el movimiento al azar es necesario para la virulencia completa.

La disponibilidad del genoma completo de *Dd 3937* nos ha permitido identificar algunos genes candidatos en esta bacteria posiblemente implicados en quimiotaxis (*cheB*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*, *motA*). La funcionalidad de estos genes ha sido analizada mediante mutagénesis dirigida, seguida por el análisis de la capacidad de las cepas mutantes de nadar en agar blando. Nuestros análisis de la virulencia en diferentes plantas hospedadoras han demostrado que la motilidad y quimiotaxis juega un papel importante en la patogenicidad de esta bacteria (Antunez-Lamas et al., 2009) (Figura 1).

Estos resultados nos llevaron a formular la hipótesis de que esta bacteria es capaz de percibir señales y moverse hacia los posibles sitios de entrada. El jasmonato es un compuesto clave en la señalización de la defensa vegetal y es sintetizado en tejidos con heridas. Así mismo hemos encontrado que esta molécula constituye un quimiotrayente fuerte para la bacteria fitopatógena *Dd 3937*. Empleando la técnica de hibridación de micromatrices de ADN hemos observado que un tratamiento con jasmona-



Figura 1. Virulencia de cepas mutantes en *SaintPaulia ionantha*. Se inocularon dos hojas opuestas de cinco plantas con 5×10^6 células de cada cepa (Wt, *cheB*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*, *motA*). Se realizaron experimentos duplicados en cámara de cultivo a 28°C y los síntomas fueron registrados tres semanas después de la inoculación. La figura muestra síntomas típicos.

Emilia López Solanilla

(Puertollano, 1970) es Bióloga por la Universidad Complutense de Madrid; su tesis doctoral, bajo la dirección del Profesor Pablo Rodríguez Palenzuela, versó sobre la resistencia a péptidos antimicrobianos en bacterias fitopatógenas. En 2001-2002 Realizó una estancia post-doctoral en el *Plant Pathology Department* de la Universidad de Cornell (NY, USA) y posteriormente se incorporó al Departamento de Biotecnología de la E.T.S.I. Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid como Profesor Contratado Doctor. En la actualidad dirige junto al Profesor Pablo Rodríguez Palenzuela un grupo de investigación de fitobacteriología Molecular en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. UPM-INIA.



Pablo Rodríguez Palenzuela

(Madrid, 1959) es Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Madrid y Máster en Bioinformática y Biología Computacional por la Universidad Complutense de Madrid; su tesis doctoral, bajo la dirección del Profesor Francisco García-Olmedo, versó sobre péptidos antimicrobianos en plantas. Realizó una estancia post-doctoral en el *Plant Pathology Department* de la Universidad de Cornell (NY, USA) y desde entonces lleva trabajando en distintos aspectos de la patogenicidad de bacterias en plantas. Es Profesor Titular de Universidad desde 1992 en el Departamento de Biotecnología de la E.T.S. Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid.



to induce la expresión de un subconjunto de genes bacterianos posiblemente implicados en la virulencia/supervivencia en el apoplasto vegetal. En línea con este hecho, observamos que células bacterianas pretratadas con jasmonato incrementaban su virulencia en hojas de endibia y Saint Paulia. También hemos encontrado que las heridas en los tejidos incrementan el movimiento bacteriano en la superficie vegetal en dirección a dichas heridas. Más aun, el mutante de *Arabidopsis* deficiente en la síntesis de jasmonato (*aos-1*) resulta ser más resistente a la entrada de *Dd 3937* que la planta silvestre (**Figura 2**). Estos resultados son congruentes con la hipótesis de que la percepción del jasmonato por la bacteria ayuda al patógeno a ingresar en el tejido vegetal (Antúñez-Lamas, 2008 Tesis doctoral).

La supervivencia de la bacteria en el apoplasto es uno de los factores clave para el establecimiento de una población bacteriana capaz de colonizar el tejido vegetal. Este nicho, el apoplasto de la planta, constituye un medio inhóspito para la bacteria, ya que es rico en sustancias antimicrobianas (preformadas e inducibles) capaces de inhibir el crecimiento del patógeno. De hecho, las plantas producen diversos metabolitos secundarios, tales como fitoalexinas, péptidos y alcaloides, y está generalmente aceptado que juegan un papel relevante en la protección de las plantas contra los patógenos (Dixon, 2001). A su vez, los patógenos han desarrollado sistemas para contrarrestar el efecto de las sustancias antimicrobianas, como por ejemplo, las bombas de extrusión (MDRs: *multidrug resistance*), así como mecanismos específicos de resistencia.

Los sistemas MDRs pueden reconocer y expeler diversos compuestos orgánicos (a menudo estructuralmente dispares), confiriendo resistencia a los mismos. Los genes que codifican MDRs son abundantes y ubicuos entre las bacterias Gram negativas, suponiendo más del 10% de los transportadores totales en un organismo. Palumbo y colaboradores encontraron que una bomba de extrusión de isoflavonoides en *Agrobacterium tumefaciens* estaba implicada en el proceso de colonización de raíces de alfalfa (Palumbo et al., 1998). Otros descubrimientos recientes

están en línea con esta idea: por ejemplo, Barabote y colaboradores describieron que la inactivación de TolC en *Dd 3937* tiene un efecto dramático en la patogénesis. TolC es un componente de la membrana externa de varios sistemas MDRs de la familia RND, por tanto esta mutación está afectando a la función de un gran número de transportadores al mismo tiempo (Barabote et al., 2003). También, Burse y colaboradores encontraron que la mutación en el transportador AcrAB de *Erwinia amylovora* producía una reducción de la virulencia en manzanos (Burse et al., 2004).

Nuestro grupo ha llevado a cabo el análisis de la relación entre diferentes sistemas MDR y la virulencia de *Dd 3937* a través de la identificación y mutagénesis de dichos sistemas seguido del análisis experimental de la virulencia (Maggiarani Valecillos et al., 2006). La conclusión más destacable de este trabajo es que, a pesar de disponer de un número alto de sistemas MDR, la mutación en uno concreto puede tener un efecto dramático en la virulencia. En contraste, la mutación que afecta a la producción de una isoenzima de pectato liasa no tiene efectos aparentes en la mayoría de los casos y es necesario mutar más de un gen para observar un efecto significativo en virulencia.

En *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, se han identificado genes homólogos de la bomba MexAB-OprM. La determinación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) frente a un amplio rango de sustancias antimicrobianas pone de manifiesto que la mutación en esta bomba reduce notablemente la tolerancia a los mismos. Además, la capacidad de este mutante para multiplicarse en planta está severamente reducida.

Uno de los componentes de la denominada inmunidad de las plantas es la producción de péptidos antimicrobianos. Se han identificado diversas familias de péptidos de este tipo, como son las tioninas, defensinas y *snakins* (García-Olmedo et al., 1998). Para todas ellas se ha descrito actividad antimicrobiana *in vitro*. Una evidencia adicio-

nal sobre la implicación de estos péptidos en los mecanismos de defensa de la planta surge del aislamiento y caracterización de mutantes bacterianos hipersensibles a estos péptidos, y que además muestran una menor virulencia en planta (López-Solanilla et al., 1998; López-Solanilla et al., 2001; Titarenko et al., 1997).

Nuestro laboratorio ha contribuido al estudio de estos y otros aspectos de la patogénesis de *Dd* 3937, tales como la resistencia a estrés oxidativo (Miguel et al., 2000) y al pH ácido del apoplasto (Llama-Palacios et al., 2003; Llama-Palacios et al., 2005).

La manipulación de algunos procesos vegetales por parte de la bacteria es un paso necesario para la patogenicidad; en particular, la modulación de los mecanismos de defensa ha sido objeto de un gran interés en los últimos años.

Los mecanismos de defensa frente a *PsPto* pueden ser divididos en dos grandes vías. Una es activada por el reconocimiento de moléculas esenciales conservadas en la mayoría de los microbios, denominadas en inglés PAMPs o MAMPs (*Pathogen-associated or Microbe-associated molecular patterns*). Esta respuesta, conocida como respuesta basal, se denomina actualmente PTI (*PAMP-triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006). En plantas susceptibles, *P. syringae* puede suprimir las defensas basales a través de la acción de efectores que inactivan los mecanismos de vigilancia y de transducción de señal relacionados con la defensa. La otra vía de defensa que tiene lugar en plantas resistentes es activada por el reconocimiento de efectores específicos (conocidos como proteínas Avr) o por sus efectos en las células vegetales. Este reconocimiento llevado a cabo por proteínas de resistencia (R) de la planta es conocido como ETI (*Effector-triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006). Esta respuesta inmune incluye la inducción de una muerte celular localizada conocida como HR. ETI y PTI comparten vías de señalización aunque la primera de las respuestas es más rápida e intensa.

Existen evidencias acerca de la supresión de PTI en plantas llevada a cabo por diversos efectores de *PsPto* como AvrPto1, AvrE, HopM1 (HopPtoM). Algunos otros han sido implicados en la supresión de la HR: HopAB2 (AvrPtoB), HopD1 (HopPtoD1), HopE1 (HopPtoE), HopF2 (HopPtoF), HopK (HopPtoK), HopN1 (HopPtoN) y HopU1

(Block et al., 2008). El descubrimiento de un número tan alto de efectores implicados en este proceso revela que esta supresión juega un papel fundamental en la patogénesis de esta bacteria. Se ha propuesto que la muerte celular programada asociada con la respuesta HR es el resultado de un nivel determinado de señales inductoras de la planta. Los efectores T3SS podrían actuar como una herramienta para suprimir el nivel de señalización necesaria para inducir una muerte celular derivada de una respuesta tipo PTI o ETI. Datos preliminares sugieren que los procesos que conducen a una muerte celular programada o a una muerte asociada con la enfermedad comparten etapas comunes y que las principales diferencias entre ambos procesos podrían radicar simplemente en el número de células que inducen la respuesta, junto al periodo de tiempo en el

cual esta respuesta es producida. La actividad bioquímica de los efectores con capacidad supresora de la muerte celular no es conocida en la mayoría de los casos, pero sus dianas en la planta deben estar implicadas en la regulación del proceso de la muerte celular. Por tanto, un conocimiento detallado de este proceso puede permitir el diseño de herramientas útiles para el control de la enfermedad.

HopN1 ha sido descrito como una cisteín-proteasa capaz de suprimir la muerte celular asociada tanto con la HR como con la enfermedad (López-Solanilla et al., 2004). Uno de los proyectos en desarrollo en nuestro grupo está enfocado hacia la caracterización funcional de este efector.

El papel específico del T3SS en la patogenicidad de *Dd* 3937 no es bien conocido, pero podría estar también implicado en la modulación de la respuesta de defensa de la planta en los primeros estadios de la infección.

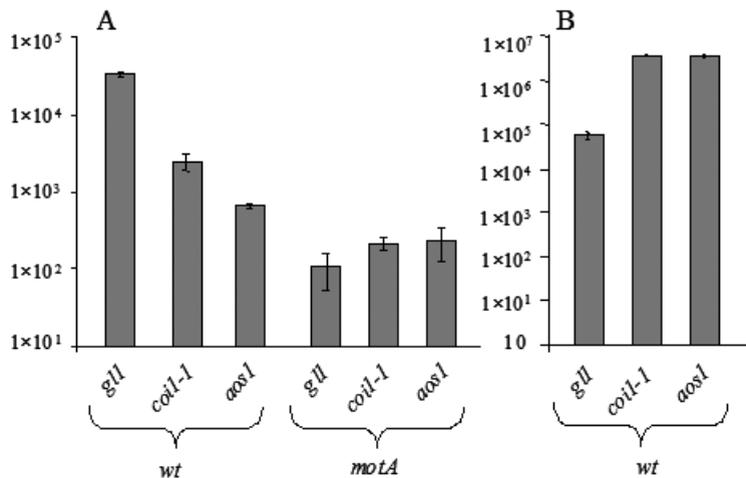


Figura 2. Población bacteriana de *D. dadantii* en hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*gll*) y mutantes defectivos en *jasmonico* (*coi1-1* y *aos1*). 10⁵ células de *Dd* 3937 se inocularon en 5 plantas de cada tipo. A. Las poblaciones bacterianas se estimaron después de 1 hora. Las diferencias entre la planta silvestre y los mutantes fueron significativas de acuerdo con un test F de Snedecor ($P \leq 0.05$). B. Las poblaciones bacterianas se estimaron después de 24 horas. Las diferencias entre la planta silvestre y los mutantes fueron significativas de acuerdo con un test F de Snedecor ($P \leq 0.05$). El mutante de *Dd* 3937 *motA* se empleó como control negativo de la entrada en el tejido vegetal.

cual esta respuesta es producida.

La actividad bioquímica de los efectores con capacidad supresora de la muerte celular no es conocida en la mayoría de los casos, pero sus dianas en la planta deben estar implicadas en la regulación del proceso de la muerte celular. Por tanto, un conocimiento detallado de este proceso puede permitir el diseño de herramientas útiles para el control de la enfermedad.

HopN1 ha sido descrito como una cisteín-proteasa capaz de suprimir la muerte celular asociada tanto con la HR como con la enfermedad (López-Solanilla et al., 2004). Uno de los proyectos en desarrollo en nuestro grupo está enfocado hacia la caracterización funcional de este efector.

El papel específico del T3SS en la patogenicidad de *Dd* 3937 no es bien conocido, pero podría estar también implicado en la modulación de la respuesta de defensa de la planta en los primeros estadios de la infección.

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado anteriormente, los mecanismos de patogenicidad asociados a determinadas etapas de la infección son bien conocidos en algunas especies de bacterias fitopatógenas. La posibilidad de analizar la patogenicidad como un proceso secuencial hace más probable la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de estrategias eficientes en el control de enfermedades.

Nuestro objetivo general es el estudio de aspectos particulares del proceso patogénico en *PsPto* y *Dd 3937* aprovechando el conocimiento y experiencia previa del grupo en uno u otro sistema. Esta aproximación complementaria puede conducir a nuevos descubrimientos en ambos sistemas.

Las preguntas más importantes que nos planteamos son:

- ¿Cuáles son los receptores moleculares (MCPs) implicados en el movimiento/entrada de estos patógenos en las plantas?
- ¿Cuál es la función de los determinantes moleculares de la resistencia bacteriana a compuestos tóxicos y cuál es la regulación de la misma?
- ¿Cuál es el papel de la modulación bacteriana de la muerte celular de la planta durante los estadios iniciales de la infección?

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G. (2005) *Plant Pathology*. New York: Elsevier Academic press.
- Alfano JR y Collmer A. (1996) Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**: 1683-1698.
- Antunez-Lamas M, Cabrera-Ordóñez E, López-Solanilla E, Raposo R, Trelles-Salazar O, Rodríguez-Moreno A y Rodríguez-Palenzuela P. (2009) Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology* **155**: 434-442.
- Barabote RD, Johnson OL, Zetina E, San Francisco SK, Fralick JA, y San Francisco MJD. (2003) *Erwinia chrysanthemi* tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J. Bacteriol.* **185**: 5772-5778.
- Block A, Li G, Fu ZQ y Alfano JR. (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396-403.
- Burse A, Weingart H y Ullrich MS. (2004) NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 693-703.
- Dixon RA. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM y Rodríguez-Palenzuela P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**: 479-491.
- Jones JD y Dangl JL. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- López-Solanilla E, Bronstein PA, Schneider AR y Collmer A. (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol* **54**: 353-365.
- López-Solanilla E, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (1998) Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**: 917-924.
- López-Solanilla E, Llama-Palacios A, Collmer A, García-Olmedo F, y Rodríguez-Palenzuela P. (2001) Relative effects on virulence of mutations in the *sap*, *pel*, and *hrp* loci of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 386-393.
- Llama-Palacios A, López-Solanilla E, Poza-Carrión C, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (2003) The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Mol. Microbiol.* **49**: 347-357.
- Llama-Palacios A, López-Solanilla E y Rodríguez-Palenzuela P. (2005) Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. *J Bacteriol* **187**: 2157-2162.
- Maggiorani Valecillos A, Rodríguez Palenzuela P y López-Solanilla E. (2006) The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 607-613.
- Miguel E, Poza-Carrión C, López-Solanilla E, Aguilar I, Llama-Palacios A, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (2000) Evidence against a direct antimicrobial role of H₂O₂ in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 421-429.
- Palumbo JD, Kado CI y Phillips DA. (1998) An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* **180**: 3107-3113.
- Titarenko E, López-Solanilla E, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (1997) Mutants of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *J. Bacteriol.* **179**: 6699-6704.
- Toth I, Bell KS, Holeva MC y Birch P. (2003) Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathology* **4**: 17-30.