

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

JAVIER RUIZ ALBERT Y CARMEN R. BEUZÓN LÓPEZ

Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC)

✉ javieruizal@uma.es | CBL@uma.es

🌐 <http://www.type3secretionlab.es>

🐦 @type3lab

Historial del grupo

El grupo se creó en 2003 en el Área de Genética de la Universidad de Málaga (UMA), está codirigido por Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz Albert, y forma parte del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea IHSM-UMA-CSIC, en cuyas instalaciones dispone de laboratorios, equipamiento y servicios.

La investigación se centra en interacción molecular planta-patógeno, utilizando estirpes modelo de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* (1448a, DC3000, B728a), y plantas modelo (*Arabidopsis*) o de relevancia agronómica (tomate y judía). Investigamos la contribución a la virulencia del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) y sus efectores asociados (T3Es), del flagelo, y de otros determinantes de virulencia. También analizamos la regulación de su expresión génica, incluyendo la formación de subpoblaciones por heterogeneidad fenotípica en poblaciones clonales, y sus consecuencias en el proceso de colonización. Recientemente hemos empezado a caracterizar estos fenómenos en relación a la capacidad de *Salmonella enterica* para colonizar plantas.

Hemos obtenido financiación del Plan Nacional (ininterrumpida desde 2003), Junta de Andalucía, y Fundación Genoma



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Laura Mancera Miranda, Jose Rufián Plaza, Javier Ruiz Albert, Ángel del Espino Pérez, Carmen R. Beuzón López, Javier Rueda Blanco, Nieves López Pagán

España, hemos participado en tres acciones COST, hemos desarrollado numerosas colaboraciones nacionales e internacionales, y mantenemos un ritmo dinámico de publicación.

El grupo constituye un excelente entorno para investigadores postdoctorales e investigadores en formación, contribuyendo a iniciar la carrera investigadora de estudiantes pregraduados (40 TFGs y TFMs experimentales defendidos y/o en progreso), y posgraduados (9 Tesis Doctorales defendidas y cuatro en progreso), con una considerable producción científica por doctorando.

Líneas de investigación

Nuestra aproximación experimental es abierta, interdisciplinar y evoluciona con los proyectos, abordando preguntas que amplíen el campo de investigación. No nos limitamos a caracterizar mecanismos de virulencia del patógeno, sino que también caracterizamos sistemas de regulación y defensa de la planta, que en ocasiones toma un papel central, dejando al patógeno y sus efectores el papel de herramientas moleculares.

En sus inicios el grupo caracterizó la regulación de la expresión del T3SS y la

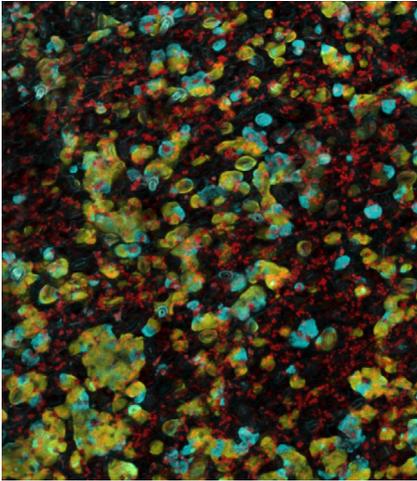


Foto 1. Microcolonias de *P. syringae* creciendo en el apoplasto de la planta, durante una infección mixta con alta dosis de inóculo: la estirpe silvestre está marcada en cian (eCFP) y el mutante KO para el T3SS (*delta-hrcV*) está marcado en amarillo (eYFP); en rojo, los cloroplastos (autofluorescencia).

contribución a la virulencia del repertorio de T3Es en la estirpe modelo 1448a, y ha colaborado en establecer un vínculo entre regulación de la expresión y secreción. También optimizamos técnicas de generación de mutantes y desarrollamos técnicas de análisis genético *in planta* (*competitive index*, CIs). Los resultados de esta investigación y las técnicas desarrolladas dieron lugar a numerosas publicaciones.

La caracterización de T3Es ha evolucionado al análisis de mecanismos moleculares de virulencia de T3Es específicos. Fuimos los primeros en describir la supresión de todos los niveles de defensa de la planta (PTI, ETI, y SAR) por parte de un único efector, HopZ1, y recientemente hemos identificado la MAP quinasa quinasa MKK7 como su diana en *Arabidopsis*, caracterizando su acetilación por HopZ1, y sus consecuencias moleculares (Rufián *et al.*, 2021). También hemos caracterizado en su patosistema natural la supresión de defensas por el efector HopZ3 (Rufián *et al.*, 2018a). Las técnicas optimizadas se han hecho accesibles a la comunidad científica (Rufián *et al.*, 2019)

La caracterización de la regulación de la virulencia ha evolucionado para analizar la heterogeneidad fenotípica en poblaciones bacterianas clonales durante la colonización de la planta. Hemos descrito por vez

primera en un fitopatógeno heterogeneidad fenotípica en la expresión del T3SS (Rufián *et al.*, 2016) y estamos caracterizando su impacto en otros procesos relevantes para la colonización. También hemos analizado la dinámica, clonalidad e interacciones de poblaciones mixtas *in planta* (Rufián *et al.*, 2018b).

En una línea reciente centrada en la planta, hemos caracterizado en *Arabidopsis* cómo, en ausencia del patógeno, el pequeño RNA miR825-5p regula negativamente los niveles de mensajero del gen de defensa MIST1, que codifica un TIR-NBS-LRR, y actúa como nodo para la regulación indirecta de numerosos genes similares (López-Márquez *et al.* 2020; López-Márquez *et al.*, 2021).

Finalmente, estamos analizando la heterogeneidad fenotípica durante la colonización de la planta por *Salmonella*, asociada a más del 25% de los brotes epidémicos por contaminación interna de fruta y verdura (CDC-USA). Resultados preliminares ya han proporcionado una primera publicación (Zarkani *et al.*, 2020).

Perspectivas futuras

Seguimos caracterizando T3Es que interaccionan con módulos de MAP kinasas para suprimir defensa en planta, y analizando la formación de complejos múltiples efector-diana ensamblados en la membrana plasmática de la célula vegetal.

También analizamos el papel potencial de la metilación de DNA en la regulación epigenética de la heterogeneidad fenotípica. Para ello, estamos determinando el metiloma de *P. syringae* en distintas condiciones de laboratorio y en planta, definiendo motivos de metilación, generando mutantes de las metilasas de DNA de 1448a y DC3000, asociando motivos a metilasas, y buscando *loci* candidatos a regulación por metilación. También estamos caracterizando heterogeneidad fenotípica del flagelo y otros determinantes de virulencia en *P. syringae* y *Salmonella*, y su potencial valor adaptativo.

En cuanto al sistema de regulación de defensa determinado por miR825-5p y MIST1, estamos caracterizando su evolución durante el desarrollo de la planta, y la interacción con mecanismos reguladores post-transcripcionales como el *nonsense-mediated-decay* (NMD).

Referencias

- 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, Lucía A, Rueda-Blanco J, Zumaquero A, Guevara CM, Ortiz-Martín I, Ruiz-Aldea G, Macho AP, Beuzón CR, Ruiz-Albert J. (2018a) Suppression of HopZ Effector-triggered Plant Immunity in a natural pathosystem. *Front Plan Sci* 14:977.
- Rufián JS, Macho AP, Corry DS, Mansfield JW, Ruiz-Albert J, Arnold DL, Beuzón CR. (2018b) Confocal microscopy reveals in planta dynamic interactions between pathogenic, avirulent and non-pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant Pathol* 19(3):537-551.
- Rufián JS, Rueda-Blanco J, Beuzón CR, Ruiz-Albert J. (2019) Protocol: an improved method to quantify activation of systemic acquired resistance (SAR). *Plant Methods* 15:16.
- López-Márquez D, Del-Espino Á, Bejarano ER, Beuzón CR, Ruiz-Albert J. (2020) Protocol: low cost fast and efficient generation of molecular tools for small RNA analysis. *Plant Methods* 16:41.
- Zarkani AA, López-Pagán N, Grimm M, Sánchez-Romero MA, Ruiz-Albert J, Beuzón CR, Schikora A. (2020) *Salmonella* Heterogeneously Expresses Flagellin during Colonization of Plants. *Microorganisms* 8(6):815.
- Rufián JS, Rueda-Blanco J, López-Márquez D, Macho AP, Beuzón CR, Ruiz-Albert J. (2021) The bacterial effector HopZ1a acetylates MKK7 to suppress plant immunity. *New Phytol* 231(3):1138-1156.
- López-Márquez D, Del-Espino Á, López-Pagán N, Rodríguez-Negrete EA, Rubio-Somoza I, Ruiz-Albert J, Bejarano ER, Beuzón CR. (2021) miR825-5p targets the TIR-NBS-LRR gene MIST1 and down-regulates basal immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 72(20):7316-7334.