

TESIS DOCTORAL

“Papel de los efectores tipo III en la especificidad de huésped de los patovares de *Pseudomonas savastanoi*”

DOCTORANDA: Dña. Alba Moreno Pérez

DIRECTOR: Dr. Cayo Ramos Rodríguez.

INSTITUCIONES: Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 20 de noviembre de 2020, Universidad de Málaga (UMA)

TRIBUNAL: El tribunal estuvo constituido por los Doctores Carmen R. Beuzón López (UMA), Patricia Bernal Guzmán (Universidad de Sevilla) y Alberto P. Macho Escribano (*Chinese Academy of Sciences*).



Fotografía del acto de lectura y defensa. Alba Moreno Pérez (doctoranda) y su director de Tesis, el Dr. Cayo Ramos Rodríguez (Catedrático del Área de Genética de la Universidad de Málaga e Investigador del IHSM-UMA-CSIC). La Tesis, con Mención Internacional, recibió la calificación por unanimidad de Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN

El estudio de los determinantes del rango de huésped en el complejo *Pseudomonas syringae* ha adquirido una renovada atención debido a la amplia distribución de estas cepas en ambientes no agrícolas, a la existencia de variabilidad en el rango de huésped de cepas pertenecientes a un mismo patovar y a la emergencia de nuevas enfermedades. Uno de los determinantes principales de la especificidad de huésped en

el complejo *P. syringae*, tanto a nivel de especie-patovar como de raza-cultivar, son el sistema de secreción tipo III (T3SS) y su repertorio de efectores (T3E) (Fouts *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011; Moreno-Pérez *et al.*, 2020). El T3SS transloca los T3E a la célula vegetal, donde algunos de los cuales interactúan con las respuestas de defensa de las plantas inhibiendo que el patógeno sea reconocido y permitiendo que se desarrollen los síntomas (Jones and Dangl, 2006). Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del papel en el rango de huésped de los T3E codificados en cepas aisladas de huéspedes leñosos de los patovares de la especie de *Pseudomonas savastanoi*: pv. *savastanoi* (Psv, aislados de olivo), pv. *nerii* (Psn, aislados de adelfa), pv. *fraxini* (Psf, aislados de fresno) y pv. *retacarpa* (Psr, aislados de retama) (Caballo-Ponce *et al.*, 2017). Además, en este estudio se incluyó el agente causal de la necrosis bacteriana de las hojas y tallos de la dipladenia (*Mandevilla* spp.), reconocido recientemente como un nuevo patovar de *P. savastanoi* denominado pv. *mandevillae* (Psm) (Caballo-Ponce *et al.*, 2021).

Esta Tesis Doctoral se inició con un análisis genómico comparativo de las 21 cepas de *P. savastanoi* secuenciadas hasta la fecha y pertenecientes a sus 5 patovares de huéspedes leñosos, dirigiendo el estudio al T3SS y su repertorio de T3E. También se realizaron pruebas de patogenicidad cruzada en una selección de estas cepas, cuyos resultados fueron esenciales para correlacionar los datos obtenidos en los análisis genómicos con su especificidad de huésped. Se determinó que todas las cepas presentan un T3SS canónico muy conservado entre ellas, y que codifican un total de 43 T3E diferentes (homólogos a T3E previamente descritos), 21 de los cuales los comparten todas las cepas (T3E *core*). Entre estos T3E, se identificaron aquellos que por su presencia, ausencia o truncamiento específico en las cepas de un patovar concreto pudiesen explicar las diferencias encontradas en el rango de huésped, estableciéndose que existe una relación entre la variación alélica de genes de T3E y los patovares de *P. savastanoi*. Por otro lado, y aunque los análisis genómicos demostraron que las cepas de todos los patovares codifican los genes del T3SS, hasta la fecha solo se ha estudiado su papel en la patogenicidad de los patovares Psn y Psm (Caballo-Ponce *et al.*, 2017). Para abordar su función en el resto de patovares, en esta Tesis Doctoral se han construido mutantes del gen *hrpL* (principal regulador positivo del T3SS (Xiao and Hutcheson, 1994) en cepas modelo de Psf, Psr y Psm, los cuales no indujeron síntomas en sus respectivos huéspedes ni una respuesta de hipersensibilidad en plantas no huésped. Estos resultados revelaron el papel relevante de este regulador en la patogenicidad de todos los patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos. Los genes regulados por este regulador han sido ampliamente estudiados en bacterias patógenas de huéspedes herbáceos (Ferreira *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2014; Mucyn *et al.*, 2014), pero los datos relacionados con bacterias patógenas de huéspedes leñosos son escasos. En esta Tesis Doctoral, se estudió el regulón HrpL de la cepa modelo Psv NCPPB 3335, utilizando dos aproximaciones distintas: 1) análisis transcriptómico (*RNAseq*) comparativo entre su mutante Δ *hrpL* y la cepa silvestre y, 2) predicción bioinformática de genes dependientes de HrpL en el genoma de la cepa Psv NCPPB 3335. La predicción bioinformática se basó en la presencia de una caja *hrp* (sitio de unión de HrpL) en la región promotora de los

genes de Psv NCPPB 3335. Los resultados obtenidos de este análisis nos han permitido caracterizar por primera vez el regulón HrpL de una cepa de *P. savastanoi* aislada de un huésped leñoso, e identificar nuevos posibles genes que podrían estar implicados en la virulencia de *P. savastanoi*. Además, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado el papel en el rango de huésped de algunos de estos T3E mediante dos estrategias distintas: 1) expresión heteróloga de T3E en cepas de los patovares que no los codifican y, 2) mutación de genes codificadores de T3E en cepas de los patovares que los codifican de forma exclusiva. Los resultados obtenidos de estos estudios nos han permitido demostrar que el repertorio de T3E juega un papel esencial en la definición del rango de huésped en *P. savastanoi*. En resumen, en esta Tesis Doctoral se ha realizado una combinación de análisis genómicos, transcriptómicos y experimentales que ha sido fundamental para la identificación de T3E implicados en la especificidad de huésped de *P. savastanoi*, así como para la identificación de nuevos factores de virulencia. Los resultados obtenidos nos han permitido demostrar que el T3SS es esencial para la patogenicidad de todos los patovares de *P. savastanoi* aislados de huéspedes leñosos y que el repertorio de T3E de estas cepas se ha diversificado durante el proceso de adaptación al huésped, siendo elementos determinantes en la definición de su rango de huésped.



PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Castañeda-Ojeda, M.P., Moreno-Pérez, A., Ramos, C., and López-Solanilla, E. (2017). Suppression of plant immune responses by the *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335 type III effector tyrosine phosphatases HopAO1 and HopAO2. *Frontiers in Plant Science*, 8, 680. doi: 10.3389/fpls.2017.00680. Factor de impacto JCR (2017):

3,678. Revista número 24 de 222 de la categoría *Plant Sciences* (primer cuartil, Q1).

Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., and Ramos, C. (2017). Knots untie: molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1089. doi: 10.3389/fpls.2017.01089. Factor de impacto JCR (2017): 3,678. Revista número 24 de 222 de la categoría *Plant Sciences* (primer cuartil, Q1).

Moreno-Pérez, A., Pintado, A., Murillo, J., Caballo-Ponce, E., Tegli, S., Moretti, C., Rodríguez-Palenzuela, P., and Ramos, C. (2020). Host range determinants of *Pseudomonas savastanoi* pathovars of woody hosts revealed by comparative genomics and cross-pathogenicity tests. *Frontiers in Plant Science*, 11, 973. doi: 10.3389/fpls.2020.00973. Factor de impacto JCR (2019): 4,402. Revista número 19 de 234 de la categoría *Plant Sciences* (primer decil, D1).

Caballo-Ponce, E., Pintado, A., Moreno-Pérez, A., Murillo, J., Smalla, K., and Ramos, C. (2021). *Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae* pv. nov., a clonal pathogen causing an emerging, devastating disease of the ornamental plant *Mandevilla* spp. *Phytopathology*, 0(ja), null. doi: 10.1094/phyto-11-20-0526-r. Factor de impacto JCR (2019): 3,234. Revista número 44 de 234 de la categoría *Plant Sciences* (primer cuartil, Q1).

Bibliografía citada en el resumen:

- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., and Cherkis, K. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathogen*, 7(7), e1002132. doi: 10.1371/journal.ppat.1002132.
- Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., and Ramos, C. (2017). Knots untie: molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1089. doi: 10.3389/fpls.2017.01089.
- Caballo-Ponce, E., Pintado, A., Moreno-Pérez, A., Murillo, J., Smalla, K., and Ramos, C. (2021). *Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae* pv. nov., a clonal pathogen causing an emerging, devastating disease of the ornamental plant *Mandevilla* spp. *Phytopathology*, 0(ja), null. doi: 10.1094/phyto-11-20-0526-r.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., et al. (2006). Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, allows de novo reconstruction of the Hrp cis element, and identifies novel coregulated genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(11), 1167-1179. doi: 10.1094/mpmi-19-1167.
- Fouts, D.E., Badel, J.L., Ramos, A.R., Rapp, R.A., and Collmer, A. (2003). A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Hrp (type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(1), 43-52. doi: 10.1094/mpmi.2003.16.1.43.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. doi: 10.1038/nature05286.

- Lam, H.N., Chakravarthy, S., Wei, H.L., BuiNguyen, H., Stodghill, P.V., and Collmer, A. (2014). Global analysis of the HrpL regulon in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals new regulon members with diverse functions. *PLoS ONE*, 9(8), e106115. doi: 10.1371/journal.pone.0106115.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2009). The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 767-775. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00587.x.
- Moreno-Pérez, A., Pintado, A., Murillo, J., Caballo-Ponce, E., Tegli, S., Moretti, C., et al. (2020). Host range determinants of *Pseudomonas savastanoi* pathovars of woody hosts revealed by comparative genomics and cross-pathogenicity tests. *Frontiers in Plant Science*, 11, 973. doi: 10.3389/fpls.2020.00973.
- Mucyn, T.S., Yourstone, S., Lind, A.L., Biswas, S., Nishimura, M.T., Baltrus, D.A., et al. (2014). Variable suites of non-effector genes are co-regulated in the type III secretion virulence regulon across the *Pseudomonas syringae* phylogeny. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003807. doi: 10.1371/journal.ppat.1003807.
- Xiao, Y., and Hutcheson, S.W. (1994). A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 176(10), 3089-3091. doi: 10.1128/jb.176.10.3089-3091.1994.