



Universidad
Nacional
de San Martín

Metabolismo de poliaminas en bacterias fitopatógenas: su relación con la virulencia y la resistencia al estrés oxidativo.

Tesista

Lic. Solmi, Leandro

Director

Dr. Gárriz, Andrés

Co-director

Dr. Rossi, Franco Rubén

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Biología Molecular y
Biotecnología.

Laboratorio de Estrés Abiótico y Biótico en Plantas

Leandro Solmi

Andrés Gárriz

Franco Rubén Rossi

AGRADECIMIENTOS.

Son muchos y espero que todas las personas que aparezcan en esta lista (y seguramente me olvide de algunas) comprenda la felicidad que me da incluirlos y decir que fueron parte de todo este proceso junto a mí.

El primer lugar quiero hacer referencia a la UB1, porque es el lugar donde pase gran parte de estos años. Por lo tanto, muy agradecido a vos, Andrés. No solo por dejarme ser tu *padawan* este tiempo, sino también, por haberme dado la libertad de crecer, formarme y, sobre todo, acompañarme este largo viaje. Sumo a Franco y Mati, que, junto a Andrés, siempre estuvieron ahí, con buena onda, con ganas de enseñar y de compartir buenos momentos. ¡¡¡Gracias por su amistad!!!

Obviamente a Oscar, y todo los integrantes de la UB1, que siendo tan dinámica como es, me ha dado la oportunidad de conocer a personas excelente. Mica, Mariam, Proli, Andy, Andrés, Caro, Betty y todos los que pasaron ¡¡Muchas gracias!!

Al INTECH, nos solo la infraestructura, sino la gente que hace posible que el instituto sea lo que es, que siga en pie y pueda darle lugar a tantas personas que aman la ciencia.

A Hernán, Marina, Santi, Marcel y Gail, por su compromiso en este trabajo y haberme ayudado a lo largo de la tesis.

A CONICET por haberme financiado estos años, permitiendo que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

A mi vieja, que es la representación de amor más grande que un mujer puede tener para con sus hijo!! A mi viejo, con quien siempre puedo contar para charlar y tomar mates. Mis hermanos Lila y Lalo y sus hermosas familias, Juan, Mer y mis sobrinos, Cande, Valen y Doni ¡¡¡Los amo tanto!!!

A toda mi familia, algunos a la distancia y otros más cerca, pero que siempre han estado a mi lado, apoyándome y desenhado lo mejor para mí. Abu Yeyi, tías Marisa y Chichita, tío Nestor, Martu y Sofi. ¡Los amo!

A mis abuelos que los llevo en el alma, Tito, Rosita y Palo.

A la tía Peka y la segunda mama que mío esta vida. Se que me esta mirado del cielo ¡¡ me encantaría poder compartir esto con vos!!

A mis amigos, que están siempre, con risas, comidas y charlas eternas. ¡¡Felicidad plena cuando puedo compartir momentos con ustedes!! Ber, Clari, Delfi, Iru, Oreja, Tinchi, Lucho, Fede, Lisan, Martu y Romi.

Y sobre todas las cosas, te quiero agradecer a vos Mai, que elegís compartir la vida conmigo, apoyándome en todo. Siempre voy a estar ahí para vos, de la misma forma que vos estuviste para mí. Son muchos años y espero que sean muchos más. Sos increíble y ojalá, el camino del doctorado sea una de las tantas cosas que tengamos que atravesar juntos ¡¡Te amo con mi alma!!

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas:

Revistas con referato:

1) Solmi, L; Rosli, HG; Pombo, MA; Stalder, S; Rossi, FR; Romero, FM; Ruiz, OA; Gárriz, A. (2022) Inferring the Significance of the Polyamine Metabolism in the Phytopathogenic Bacteria *Pseudomonas syringae*: A Meta-Analysis Approach. *Frontiers in Microbiology*, 13:893626.

2) Solmi, L; Rossi, FR; Romero, FM; Bach-Pages, M; Preston, GM; Ruiz, OA; Gárriz, A. (2023) Polyamine-mediated mechanisms contribute to oxidative stress tolerance in *Pseudomonas syringae*. *Scientific Reports* 13:4279.

Presentaciones a congresos:

1) Solmi, L; Rossi, FR; Romero, FM; Ruiz, OA; Gárriz, A. (2018) La secreción de putrescina por *Pseudomonas syringae* funciona como un mecanismo antioxidante durante la invasión de plantas. XXXII Reunión Argentina – XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Córdoba.

2) Solmi L; Rossi FR; Romero MF; Ruiz OA; Bach-Pages M; Preston GM; Gárriz A. (2020) Differential roles for polyamines in the oxidative stress response of *Pseudomonas syringae*. Young Microbiologist Symposium, University of Southampton. Southampton, UK.

3) Solmi, L; Stalder, S; Rosli, H; Pombo, MA; Rossi, FR; Romero, FM; Ruiz, OA; Gárriz, A. (2020) An integrative analysis of the polyamine metabolism in *Pseudomonas syringae*: decoding its role in bacterial physiology. Oral Communication, SAIB-SAMIGE, Argentina.

4) Solmi, L; Rossi, FR; Romero, FM; Ruiz, A; Gárriz, A. (2021) The polyamine spermidine regulates iron utilization and pyoverdine secretion in *Pseudomonas syringae*. Reunión conjunta SAIB-SAMIGE, Argentina.

5) Solmi, L; Jianguo, L; Verma, CS; Rossi, FR; Romero, FM; Ruiz, OA; Gárriz, A. (2021) Polyamine homeostasis contributes to oxidative stress tolerance in *Pseudomonas syringae*. SAIB-SAMIGE, Argentina.

6) Solmi, L; Romero, FM, Corigliano, MG; Rossi, FR; Gárriz, A. (2023) Polyamine synthesis and bioavailability has a major role in the pathogenesis of *Pseudomonas syringae* DC3000. SAMIGE, Chapadmalal, Argentina.

RESUMEN.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos gram-negativos móviles, con metabolismo aeróbico, pertenecientes a la clase de las *gammaproteobacterias*. Este género, notable por su diversidad genética, con más de 330 especies identificadas, prospera en diversos ambientes tales como suelo, agua y plantas, desempeñando funciones ecológicas fundamentales. La especie *Pseudomonas syringae* es una bacteria de gran relevancia en la agricultura debido a su capacidad para infectar una amplia gama de cultivos, lo que la convierte en uno de los patógenos más comunes en plantas. Se han identificado múltiples patovares dentro de esta especie, cada uno con una especificidad de hospedador distintiva. *P. syringae* muestra una estrategia de vida hemibiotrófica, valiéndose de los nutrientes obtenidos de células vivas de la planta en una primera etapa de la infección, para dar paso a una segunda etapa más tardía donde se observa la muerte de las células vegetales. Una vez que las células bacterianas alcanzan la superficie del hospedador, utilizan heridas o aperturas naturales tales como los estomas para colonizar el apoplasto vegetal, siendo éste el nicho donde prospera. Las plantas pueden reconocer directa o indirectamente la presencia del patógeno, elicitando una variedad de mecanismos de defensa para frenar su proliferación y evitar el desarrollo de la enfermedad. Entre estos mecanismos, se encuentra la generación de especies reactivas del oxígeno, lo que impone una situación de estrés oxidativo al microorganismo invasor. Así, para que la infección tenga éxito, los patógenos deben modular distintos mecanismos de virulencia a los fines de adaptarse o contrarrestar las modificaciones del entorno generadas por la planta. En este sentido, *P. syringae* hace uso de efectores que suprimen la respuesta inmune de la planta, produce exopolisacáridos y enzimas detoxificantes, lo que contribuye a su capacidad de persistencia y virulencia.

Las poliaminas son compuestos biológicos esenciales que presentan grupos aminos cargados positivamente a pH fisiológico, fundamentales en la unión a polianiones como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos de membranas. Entre las poliaminas más abundantes en bacterias, se encuentran la diamina putrescina (PUT) y la triamina espermidina (ESPD). Es crucial que los niveles de estas moléculas estén regulados de forma precisa ya que, su exceso como su déficit, son perjudiciales para las células. Esto se logra controlando sus rutas metabólicas que incluyen la biosíntesis, degradación y transporte. Las poliaminas desempeñan funciones claves en múltiples aspectos de la biología bacteriana. En primer lugar, facilitan la condensación y estabilización del ADN, promueven la unión de proteínas al ARNm, regulan la permeabilidad de la membrana externa y, en el caso de bacterias patógenas, participan en la activación de mecanismos de virulencia y en

la supervivencia en el interior de los tejidos del hospedador. En particular, se ha demostrado que son importantes en la tolerancia al estrés oxidativo.

Debido a que existen pocos trabajos que estudien el metabolismo de poliaminas en bacterias patógenas de plantas, este trabajo de tesis tubo como finalidad corroborar la hipótesis de que “El metabolismo de poliaminas es modulado en bacterias fitopatógenas durante su crecimiento en los tejidos vegetales, un proceso que juega un papel crucial en el desarrollo de la patogénesis”. El objetivo general fue evaluar de manera integral el papel de las poliaminas en bacterias patógenas de plantas, utilizando como modelo de estudio la cepa DC3000 del patovar *tomato* de *Pseudomonas syringae* (*Pto*). En relación con el objetivo general, los objetivos específicos fueron: 1-Explorar, mediante un meta-análisis de datos transcriptómicos públicos, los perfiles de expresión de los genes del metabolismo de poliaminas en distintas bacterias durante la colonización de tejidos vegetales y en respuesta al estrés oxidativo, con énfasis en *P. syringae*, 2-Investigar el papel que cumple la biosíntesis de poliaminas en la tolerancia al estrés oxidativo de la bacteria e identificar los mecanismos subyacentes, y 3-Evaluar la importancia de las poliaminas en la activación de mecanismos de virulencia bacteriano y en la habilidad para infectar *Arabidopsis thaliana*.

En primer lugar, identificamos el conjunto de genes que participan del metabolismo de poliaminas en distintas bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, y utilizamos las bases de datos de estudios transcriptómicos para obtener una primera aproximación del patrón de expresión de estos genes durante la invasión de plantas hospedantes y en respuesta al estrés oxidativo. Nuestros análisis destacan una supresión relativa de los genes que participan en la síntesis de poliaminas en medios de cultivos inductores de la virulencia. De forma contraria, se encontró una leve inducción de los genes de esta ruta en los primeros estadíos de la infección de plantas. Este hallazgo sugiere mecanismos de regulación diferencial que podrían estar relacionados con la adaptación de la bacteria al entorno del hospedador y a la respuesta inmune vegetal. Además, se revelaron patrones más complejos en la expresión de genes del catabolismo y transporte de poliaminas durante este proceso, aunque los genes que participan en la incorporación de poliaminas parecen estar inducidos en etapas más tardías, donde los de síntesis se ven reprimidos. Por su parte, en estos análisis se encontró una regulación negativa de los genes biosintéticos en condiciones de estrés oxidativo, lo que desafía la idea convencional de que estas aminas funcionan como agentes protectores antioxidantes. En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de estudiar la

modulación de la síntesis de poliaminas en *Pseudomonas syringae*, para comprender mejor la participación en la tolerancia al estrés y en la virulencia.

Inicialmente, se observó que *Pto* muestra una significativa resistencia al H_2O_2 , donde se retrasa el inicio de la fase de crecimiento exponencial bacteriano sin afectar la tasa de crecimiento posterior. Esta resistencia está asociada con la capacidad de la bacteria para desplegar mecanismos de tolerancia frente a este agente estresor. Se encontró además que *Pto* produce, en respuesta al estrés oxidativo, un incremento en la PUT extracelular, lo que estaría explicado por una posible inducción de la síntesis o secreción bajo estas condiciones de estrés. Para evaluar en mayor profundidad la funcionalidad de las poliaminas en estas condiciones, se construyeron cepas mutantes con deleciones en genes que participan de la síntesis de PUT ($\Delta speA$, $\Delta speC$, $\Delta speA\Delta speC$) y ESPD ($\Delta speE$). Demostramos así que, la perturbación en la síntesis de ESPD (cepa $\Delta speE$) resulta en una mayor tolerancia al estrés oxidativo, lo que está relacionado a una mayor estabilidad de la membrana externa y a cambios en la regulación de las catalasas como KatB y KatG, siendo estas las principales enzimas encargadas de la descomposición del H_2O_2 . Estos hallazgos destacan un papel crucial de las poliaminas en la respuesta de *Pto* al estrés oxidativo, mostrando cómo la regulación fina de estas moléculas puede influir en la capacidad de la bacteria para sobrevivir y persistir en entornos hostiles, como podría ser el interior de las plantas durante la infecciones. Por lo tanto, a continuación, exploramos el rol de las poliaminas en la activación de mecanismos de virulencia y en la patogenicidad en su hospedante *A. thaliana*.

Nuestras investigaciones demostraron que la deficiencia en la síntesis de PUT afecta negativamente la formación de *biofilms*, mientras que la ausencia de ESPD promueve su desarrollo, sugiriendo que estas moléculas presentan efectos contrastantes en la regulación de estas estructuras. Además, demostramos que las poliaminas participan en la adquisición de hierro mediante la síntesis de sideróforos como la pioverdina, la movilidad bacteriana y la capacidad de inhibir el cierre estomático. En el contexto vegetal, las poliaminas demostraron ser necesarias para activar correctamente el sistema de secreción tipo III (T3SS), esencial para la translocación de efectores bacterianos que suprimen las defensas de la planta. Finalmente, demostramos que la síntesis de PUT resulta esencial para la persistencia del patógeno en la superficie vegetal y en su multiplicación en el apoplasto. Mientras tanto, la ESPD sería necesaria para el ingreso a la planta, aunque dispensable en los tejidos internos de la planta, ya que la bacteria puede nutrirse a partir de la ESPD de origen vegetal.

En conclusión, nuestro estudio revela un papel multifacético de las poliaminas en la virulencia bacteriana, destacando su capacidad para modular diversos mecanismos adaptativos y patogénicos que facilitan la colonización y supervivencia en el ambiente vegetal. Estos hallazgos no solo amplían nuestro entendimiento de la biología de la interacción planta-patógeno, sino que también sugieren nuevas estrategias para el control de enfermedades vegetales mediante la manipulación de las vías de síntesis de poliaminas en bacterias fitopatógenas.

Palabras claves: *Pseudomonas syringae*, Poliaminas, Estrés oxidativo, Virulencia

ABSTRACT.

Bacteria of the genus *Pseudomonas* are motile gram-negative bacilli with aerobic metabolism, belonging to the class *gammaproteobacteria*. This genus, notable for its genetic diversity with more than 330 identified species, thrives in various environments such as soil, water, and plants, performing fundamental ecological functions. The species *Pseudomonas syringae* is highly significant in agriculture due to its ability to infect a wide range of crops, making it one of the most common plant pathogens. Multiple pathovars have been identified within this species, each with a distinctive host specificity. *P. syringae* exhibits a hemibiotrophic lifestyle strategy, utilizing nutrients from living plant cells in the initial stage of infection, leading to a later stage where plant cell death is observed. Once bacterial cells reach the host surface, they use wounds or natural openings such as stomata to colonize the plant apoplast, which is the niche where they thrive. Plants can directly or indirectly recognize the presence of the pathogen, eliciting a variety of defense mechanisms to inhibit its proliferation and prevent disease development. Among these mechanisms is the generation of reactive oxygen species, imposing oxidative stress on the invading microorganism. Thus, for the infection to succeed, pathogens must modulate various virulence mechanisms to adapt to or counteract the environmental changes induced by the plant. In this context, *P. syringae* employs effectors that suppress the plant's immune response, produces exopolysaccharides, and detoxifying enzymes, contributing to its persistence and virulence.

Polyamines are essential biological compounds with positively charged amino groups at physiological pH, crucial for binding to polyanions such as nucleic acids, proteins, and membrane phospholipids. Among the most abundant polyamines in bacteria are the diamine putrescine (PUT) and the triamine spermidine (SPD). It is crucial that the levels of these molecules are precisely regulated since both their excess and deficiency are detrimental to cells. This is achieved by controlling their metabolic pathways, including biosynthesis, degradation, and transport. Polyamines play key roles in multiple aspects of bacterial biology. Firstly, they facilitate DNA condensation and stabilization, promote protein binding to mRNA, regulate outer membrane permeability, and in pathogenic bacteria, participate in activating virulence mechanisms and survival within host tissues. Specifically, they have been shown to be important in tolerance to oxidative stress.

Due to the scarcity of studies on polyamine metabolism in plant pathogenic bacteria, this thesis aimed to corroborate the hypothesis that "Polyamine metabolism is modulated in phytopathogenic bacteria during their growth in plant tissues, a process playing a crucial role in pathogenesis

development." The general objective was to comprehensively evaluate the role of polyamines in plant pathogenic bacteria, using the *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000 (*Pto*) as a study model. Regarding the general objective, the specific objectives were: 1- To explore, through a meta-analysis of public transcriptomic data, the expression profiles of polyamine metabolism genes in different bacteria during plant tissue colonization and in response to oxidative stress, with an emphasis on *P. syringae*, 2- To investigate the role of polyamine biosynthesis in bacterial oxidative stress tolerance and identify underlying mechanisms, and 3- To assess the importance of polyamines in activating bacterial virulence mechanisms and the ability to infect *Arabidopsis thaliana*.

Firstly, we identified the set of genes involved in polyamine metabolism in different *Pseudomonas* species and used transcriptomic study databases to obtain an initial approximation of the expression patterns of these genes during plant host invasion and in response to oxidative stress. Our analyses highlight a relative suppression of genes involved in polyamine synthesis in virulence-inducing culture media. Conversely, a slight induction of genes in this pathway was found in the early stages of plant infection. This finding suggests differential regulatory mechanisms that might be related to bacterial adaptation to the host environment and plant immune response. Additionally, more complex patterns in the expression of catabolism and polyamine transport genes were revealed during this process, although the genes involved in polyamine uptake seem to be induced in later stages, where synthesis genes are repressed. Furthermore, these analyses found negative regulation of biosynthetic genes under oxidative stress conditions, challenging the conventional idea that these amines function as protective antioxidants. Together, these findings underscore the importance of studying polyamine synthesis modulation in *Pseudomonas syringae* to better understand their role in stress tolerance and virulence.

Initially, it was observed that *Pto* shows significant resistance to H₂O₂, where the onset of bacterial exponential growth phase is delayed without affecting the subsequent growth rate. This resistance is associated with the bacteria's ability to deploy tolerance mechanisms against this stressor. Additionally, *Pto* produces an increase in extracellular PUT in response to oxidative stress, possibly explained by an induced synthesis or secretion under these stress conditions. To further evaluate polyamine functionality under these conditions, mutant strains with deletions in genes involved in PUT ($\Delta speA$, $\Delta speC$, $\Delta speA\Delta speC$) and SPD ($\Delta speE$) synthesis were constructed. We demonstrated that disruption of SPD synthesis results in greater oxidative stress tolerance, related to increased outer membrane stability and regulation changes in catalases like KatB and KatG, the

main enzymes responsible for H₂O₂ decomposition. These findings highlight a crucial role for polyamines in *Pto*'s oxidative stress response, showing how fine regulation of these molecules can influence bacterial survival and persistence in hostile environments, such as within plants during infections. Therefore, we subsequently explored the role of polyamines in activating virulence mechanisms and pathogenicity in its host *A. thaliana*.

Our investigations demonstrated that PUT synthesis deficiency negatively affects biofilm formation, whereas SPD absence promotes its development, suggesting these molecules have contrasting effects in regulating these structures. Additionally, we showed that polyamines participate in iron acquisition through siderophore synthesis like pyoverdine, bacterial motility, and the ability to inhibit stomatal closure. In the plant context, polyamines proved necessary for properly activating the type III secretion system (T3SS), essential for translocating bacterial effectors that suppress plant defenses. Finally, we demonstrated that PUT synthesis is essential for pathogen persistence on the plant surface and multiplication in the apoplast. Meanwhile, SPD is necessary for plant entry, though dispensable in the plant's internal tissues, as the bacteria can utilize plant-derived SPD.

Keywords: *Pseudomonas syringae*, Polyamines, Oxidative stress, Virulence.

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

I. Abreviaturas (por orden alfabético)

ABC: *ATP binding cassette*.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

cADN: ácido desoxirribonucleico copia

AJ: ácido jasmónico.

ARN: ácido ribonucleico.

AS: ácido salicílico

ASB: albúmina de suero bovino.

Avr: efector determinante de avirulencia.

CAD: cadaverina.

DAB: 3,3-diaminobenzidina.

DAP: diaminopropano.

DTT: dicloro difenil tricloroetano.

dNTPs: desoxirribonucleótidos.

dpi: días post inoculación.

EPS: exopolisacáridos.

EROS: especies reactivas de oxígeno.

ESPD: espermidina.

ESPM: espermina.

ETI: *effector-triggered immunity*.

FA: fluido apoplástico.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

GO: *gene ontology*.

hpi: horas post inoculación.

HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*, en español Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

HR: *hypersensitive response*, en español Respuesta Hipersensible.

MMLV: transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney

NESPD: noespermidina.

NESPM: noespermina.

NTB: nitroazul de tetrazolio

p/v: peso en volumen.

PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

Pau: *polyamine utilization*

Pp: *Pseudomonas putida*.

Psa: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Pss: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

PTI: *PAMP-triggered immunity*.

Pto: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

PUT: putrescina.

pv: patovar.

PVD: pioverdina.

SAMdc: S-adenosil metionina descarboxilada.

SD: Shine–Dalgarno.

SDS: dodecilsulfato de sodio.

spu: *spermidine and putrescine utilization*.

T3SS: sistema de secreción tipo III.

Tat: sistema de translocación de argininas gemelas.

UFC: unidades formadoras de colonias.

v/v: volumen en volumen.

II. Nomenclatura

A lo largo de este manuscrito se ha adoptado la siguiente convención al referirnos a proteínas, genes y cepas mutantes:

-Proteínas: se escriben utilizando la letra inicial en mayúscula, sin utilizar cursivas. Ej.: SpeA.

-Genes: se escriben utilizando la letra inicial en minúscula y la totalidad en cursiva. Ej.: *speA*.

-Líneas mutantes y sus versiones complementadas: se escriben mencionando el nombre del gen mutado precedido por la letra griega delta (Δ). Ej.: Δ *speA*. Por otro lado, las líneas mutantes complementadas se denominan utilizando el nombre de la mutante y, entre paréntesis, el nombre del gen complementario. Ej: Δ *speA* (*speA*).

INDICE.

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.	17
1.1 <i>Pseudomonas syringae</i>.	17
1.1.1 Generalidades sobre el género de bacterias <i>Pseudomonas</i> .	17
1.1.2 Importancia de la especie <i>P. syringae</i> .	17
1.1.3 <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000, cepa modelo para estudios de fitopatología bacteriana.	19
1.1.4 Aspectos moleculares de la virulencia de <i>P. syringae</i> .	19
1.1.5 Respuestas de defensa de las plantas ante patógenos bacterianos.	23
1.2 Estrés oxidativo.	25
1.2.1 Características de las EROS	25
1.2.2 Efectos nocivos de las EROS sobre las células bacterianas.	25
1.2.3 Mecanismo de respuesta al estrés oxidativo.	26
1.3 Generalidades de las poliaminas.	28
1.3.1 Metabolismo de poliaminas en bacterias.	29
1.3.1.1 Síntesis de poliaminas.	30
1.3.1.2 Catabolismo de poliaminas.	30
1.3.1.3 Transporte de poliaminas.	31
1.3.2 Rol de las poliaminas en la fisiología general de las bacterias.	32
1.3.3 Rol de las poliaminas en la virulencia bacteriana.	32
1.3.4 Rol de las poliaminas en la respuesta al estrés oxidativo en bacterias.	34
1.4 Hipótesis de trabajo y Objetivos	36
2. CAPITULO II: Un meta-análisis de datos transcriptómicos como primera aproximación para inferir la importancia del metabolismo de poliaminas en la patogénesis y la resistencia al estrés oxidativo en <i>Pseudomonas syringae</i>.	37
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.	39
2.1.1 Identificación de los genes que participan en el metabolismo de poliaminas en distintos genomas bacterianos.	39
2.2.2 Selección de sets de datos transcriptómicos en bases de datos públicas.	39
2.2.3 Análisis de co-expresión.	41

2.3 RESULTADOS.	42
2.3.1 Identificación de los genes que participan de las rutas metabólicas de poliaminas en <i>Pto.</i> _____	42
2.3.1.1 Síntesis de poliaminas.	44
2.3.1.2 Catabolismo de poliaminas.	44
2.3.1.3 Transporte de poliaminas: incorporación.	45
2.3.1.4 Transporte de poliaminas: secreción.	45
2.3.2 <i>Pseudomonas syringae</i> reprime la síntesis de poliaminas durante su crecimiento en condiciones similares al apoplasto vegetal. _____	46
2.3.2 El metabolismo de poliaminas se induce en <i>P. syringae</i> durante la colonización de los tejidos vegetales. _____	48
2.3.3 Los genes del metabolismo de poliaminas muestran relaciones de co-expresión con una gran variedad de genes relevantes para la fisiología de <i>P. syringae</i> . _____	51
2.3.4 Modulación de los genes del metabolismo de poliaminas durante la respuesta al estrés oxidativo. _____	58
2.4 DISCUSIÓN.	61
3. CAPITULO III: Participación del metabolismo de poliaminas de <i>P. syringae</i> en la tolerancia al estrés oxidativo. _____	67
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.	68
3.1.1 Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados en este capítulo. _____	68
3.1.2 Medios de cultivos. _____	70
3.1.3 Condiciones de cultivo y cuantificación de la tasa de crecimiento. _____	70
3.1.3 Construcción de cepas mutantes de <i>Pto.</i> _____	71
3.1.4 Extracción y cuantificación de poliaminas. _____	72
3.1.5 Ensayo de tolerancia al H ₂ O ₂ . _____	73
3.1.6 Atenuación de la capacidad oxidante del H ₂ O ₂ mediada por poliaminas. _____	73
3.1.7 Determinación de actividad catalasa. _____	74
3.1.8 Evaluación de la estabilidad de la membrana externa. _____	74
3.1.9 Construcción de fusiones transcripcionales y cuantificación de la actividad promotora <i>katG</i> y <i>katB</i> . _____	75
3.2.10 Expresión de roGFP en <i>P. syringae</i> y monitoreo del estado redox intracelular. _____	76
3.2 RESULTADOS.	78

3.2.1 La concentración de PUT extracelular se ve incrementada en respuesta al estrés oxidativo. _____	78
3.2.2 La perturbación de la síntesis de poliaminas genera fenotipos contrastantes respecto a la tolerancia al estrés oxidativo. _____	81
3.2.3 La mutante $\Delta speE$ presenta un aumento en la estabilidad de la membrana externa. _____	87
3.2.4 La perturbación de la síntesis de ESPD promueve un aumento en la actividad catalasa en <i>Pto</i> . _____	89
3.3 DISCUSIÓN.	95
4. CAPITULO IV: Síntesis de poliaminas en <i>Pto</i>, su rol en la activación de mecanismos de virulencia y patogenicidad en <i>A. thaliana</i>. _____	102
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.	103
4.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. _____	103
4.1.2 Material vegetal y condiciones de cultivo. _____	103
4.1.3 Cuantificación de la secreción de pioverdina (PVD). _____	104
4.1.4 Cuantificación de la producción de <i>biofilms</i> . _____	104
4.1.5 Determinación de la formación de exopolisacáridos (EPS) mediante el ensayo de rojo Congo. _____	105
4.1.6 Ensayo de movilidad celular. _____	105
4.1.7 Preparación del inóculo para los ensayos de apertura estomática e infección. _____	106
4.1.8 Ensayo de apertura estomática. _____	106
4.1.9 Infección de <i>N. benthamiana</i> . _____	106
4.1.10 Determinación de la acumulación de H ₂ O ₂ . _____	107
4.1.11 Inoculación de plántulas de <i>A. thaliana</i> . _____	107
4.1.12 Inoculación de plantas adultas <i>A. thaliana</i> por el método de infiltración. _____	108
4.1.13 Extracción de fluido apoplástico de <i>A. thaliana</i> . _____	108
4.1.14 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y cuantificación de niveles de expresión génica mediante qPCR. _____	109
4.1.14.1 Cultivos celulares y extracción de ARN.	109
4.1.14.2 Síntesis de ADNc.	109
4.1.14.3 Cuantificación de los niveles de expresión génica por qPCR.	110
4.2 RESULTADOS.	111

4.2.1 Varios procesos asociados a la patogénesis de <i>Pto</i> se vieron afectadas por la interrupción en la síntesis de poliaminas. _____	111
4.2.2 Activación de la respuesta hipersensible en <i>N. benthamiana</i> durante las infecciones con las cepas mutantes $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$. _____	116
4.2.3 La síntesis de PUT por parte de <i>Pto</i> es indispensable durante la infección de <i>A. thaliana</i> . _____	118
4.2.4 La biodisponibilidad de ESPD en el apoplasto de <i>A. thaliana</i> compensa la perturbación en su síntesis en la cepa $\Delta speE$. _____	119
4.3 DISCUSIÓN.	122
5. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO. _____	127
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. _____	129

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

1.1 *Pseudomonas syringae*.

1.1.1 Generalidades sobre el género de bacterias *Pseudomonas*.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos gram-negativos móviles, de metabolismo aeróbico, pertenecientes a la clase de las *gammaproteobacterias*. Este género, caracterizado por una amplia diversidad genética, es uno de los más grandes en términos de número de especies con más de 330 reportadas. Las *Pseudomonas* pueden colonizar y prosperar en una amplia variedad de nichos ecológicos, incluyendo suelo, agua y plantas (Hesse *et al.*, 2018). Debido a esta habilidad, se consideran componentes fundamentales de las comunidades bacterianas y, por lo tanto, desempeñan funciones ecológicas esenciales en el medio ambiente. Además, las especies del género *Pseudomonas* son conocidas por su capacidad para sintetizar un gran repertorio de metabolitos secundarios bioactivos, como sideróforos y toxinas, que en gran parte explican su estilo de vida y su capacidad de adaptación a diversos ambientes (Peix *et al.*, 2009; Silby *et al.*, 2011).

Debido a la plasticidad ecológica y genética característica de estas especies, algunas de ellas se utilizan como agentes de biorremediación, bioestimulación y biocontrol (Wasi *et al.*, 2013; Weller, 2007). Por otro lado, ciertas especies del mismo género son patógenas, afectando a una variedad de organismos incluyendo humanos, peces, insectos, animales y plantas (Girard *et al.*, 2021; Özen & Ussery, 2012). Ejemplos notables de estas especies son *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista conocido por causar infecciones en humanos, especialmente en aquellos con sistemas inmunológicos comprometidos, y *P. syringae*, bacteria fitopatógena que será descrita con mayor detalle en la sección siguiente. Además de su importancia ecológica y desde el punto de vista de la sanidad, las *Pseudomonas* también son objeto de interés en la investigación biotecnológica. Su capacidad para degradar compuestos orgánicos complejos las hace valiosas en la biotecnología ambiental, mientras que su producción de metabolitos bioactivos es de interés para la industria farmacéutica y agrícola.

1.1.2 Importancia de la especie *P. syringae*.

P. syringae es una bacteria de gran importancia debido a su impacto en la agricultura como patógeno de plantas, su relevancia en estudios ecológicos y su utilidad como modelo en investigaciones

científicas (Morris *et al.*, 2008). Un análisis de secuencias multiloci ha identificado 5 grupos filogenéticos distintos. El grupo 1 está principalmente compuesto por patógenos de tomate y brasicáceas, mientras que el grupo 2 es el más diverso en término de hospedadores, incluyendo patógenos de arveja, poroto, maíz y trigo, junto con un grupo de cepas no patogénicas. El grupo 3 contiene la mayoría de los patógenos de poroto, tabaco y pepino; el grupo 4 está formado principalmente por patógenos de monocotiledóneas; y el grupo 5 incluye patógenos de brasicáceas (O'Brien *et al.*, 2011). Como puede observarse, *P. syringae* tiene la capacidad de infectar a casi todas las especies de cultivos con importancia económica, lo que la convierte en uno de los patógenos más comunes de plantas (Xin *et al.*, 2018). Cada cepa de *P. syringae* puede exhibir un alto grado de especificidad de huésped, siendo capaz de infectar sólo a un número limitado de especies de plantas o incluso a unos pocos cultivares de una misma especie vegetal. Esta especificidad es la base para agrupar las cepas de *P. syringae* en patovares (pv.), que actualmente cuenta con más de 60 patovares descritos (Baltrus *et al.*, 2017).

P. syringae puede describirse como un patógeno hemibiotrófico que infecta principalmente las porciones aéreas de las plantas, como hojas y frutos (Yang *et al.*, 2023). Los patógenos hemibiotróficos son aquellos que infectan a su hospedador utilizando una estrategia de vida dual, combinando fases biotrófica y necrotrófica durante su ciclo de infección. En la fase biotrófica, el patógeno obtiene nutrientes del hospedador sin causar una muerte inmediata, estableciendo una relación íntima con las células vivas del mismo. Esta etapa inicial le permite proliferar mientras evade las defensas del hospedador. Posteriormente, el patógeno transita a una fase necrotrófica, en la cual se observa la muerte de las células de la planta. La infección por *P. syringae* suele limitarse a un área muy específica alrededor del punto de entrada de la bacteria en los tejidos internos de la planta, y, debido a que rara vez se propaga, se la define como una enfermedad local.

El primer genoma de esta especie en ser secuenciado fue el de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*), una cepa patógena de tomate y *Arabidopsis thaliana* (Buell *et al.*, 2003). Posteriormente, se completaron los genomas de los patógenos del poroto *P. syringae* pv. *syringae* B728a y *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A. Estas cepas han sido de particular importancia en los estudios de interacción planta-microorganismo, proporcionando valiosa información sobre los mecanismos de patogénesis y la respuesta de las plantas a las infecciones (Xin *et al.*, 2018).

1.1.3 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, cepa modelo para estudios de fitopatología bacteriana.

El patovar *tomato* de *P. syringae* causa la denominada peca bacteriana en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Los síntomas de esta enfermedad se observan como pequeños puntos negros de varios tamaños y formas, localizados en las hojas, frutos y tallos. En las hojas, las lesiones se concentran principalmente en los márgenes, y el tejido adyacente a las mismas se torna de color amarillo. Las lesiones de los frutos son superficiales, y raramente penetran más que unas pocas capas de células. La infección por este patógeno se ve favorecida por bajas temperaturas (< 21° C) y una alta humedad relativa.

P. syringae pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) es una cepa resistente a rifampicina, derivada de la cepa DC52 (Cuppels, 1986). Años después se comprobó que esta cepa, además de causar la enfermedad en plantas de tomate, tiene la capacidad de infectar *A. thaliana* (Whalen *et al.*, 1991). Desde ese momento, *Pto* se convirtió en la cepa de referencia en estudios sobre los aspectos moleculares de la patogénesis bacteriana. El genoma de *Pto* está compuesto por un cromosoma circular de 6.397.126 pb y dos plásmidos de 73.661 pb y 67.473 pb. Se estima que el 5 % del genoma está conformado por genes implicados en la virulencia de esta cepa, destacando su gran potencial genómico (Buell *et al.*, 2003). Un análisis funcional del genoma de *Pto* evidenció la presencia de 31 genes codificantes para proteínas efectoras secretadas por el T3SS (los cuales conforman el operón conocido como *hrp/hrc*), necesarios para la síntesis de la toxina coronatina, y para la biosíntesis de alginato y levan. Los genes que codifican enzimas que degradan la pared celular están presentes en esta cepa e incluyen una pectina liasa, una poligalacturonasa y tres enzimas que se predice que tienen actividad celulolítica.

1.1.4 Aspectos moleculares de la virulencia de *P. syringae*.

La sintomatología de las enfermedades provocadas por los distintos patovares de esta bacteria es muy diversa, y en un principio, esto se atribuyó a diferencias en los mecanismos moleculares subyacentes. Sin embargo, estudios realizados en las últimas décadas han demostrado que las bases moleculares de estas enfermedades se encuentran notablemente conservadas (Xin *et al.*, 2018).

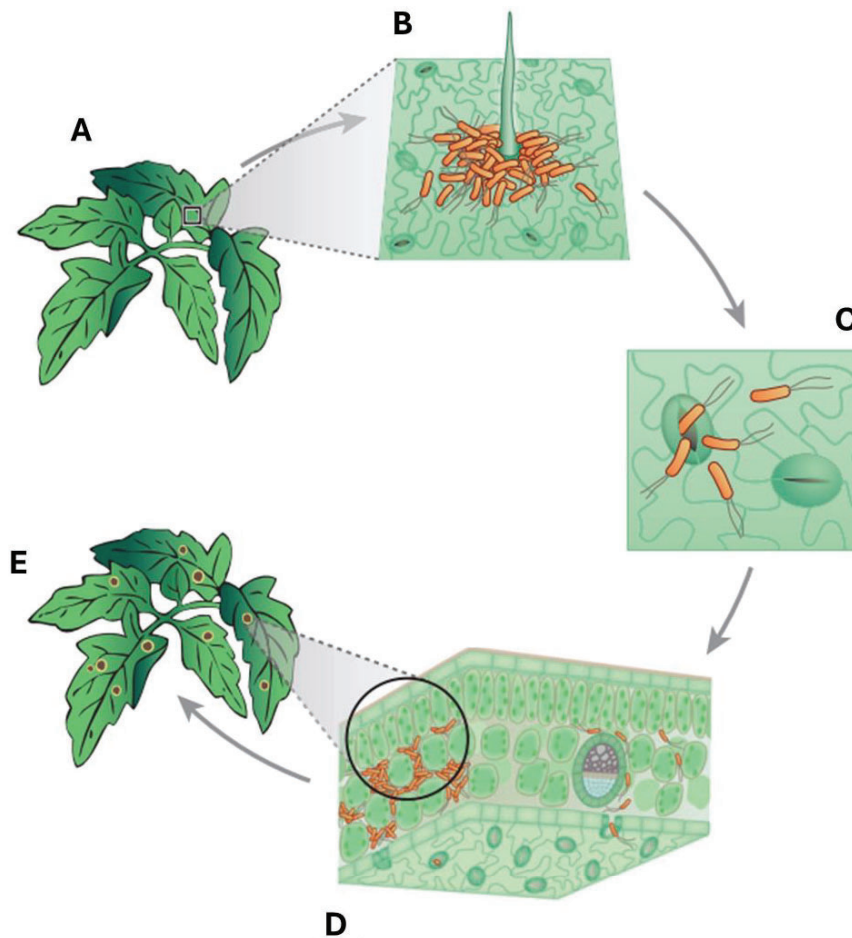


Figura 1.1. Etapas más relevante durante el ciclo de infección de *P. syringae*. (A) Células de *P. syringae* alcanzando la superficie de las hojas de un plantas sanas. (B) Bacterias en la superficie de la hoja se agregan de algunas estructuras de la epidermis, se ilustran tricomas como ejemplo. (C) Las células bacterianas penetran al espacio apoplástico por aberturas naturales, se ilustran estomas abiertos. (D) Sección transversal de una hoja, muestra la proliferación bacteriana dentro del espacio apoplástico. (E) En etapas tardías de infección, aparecen síntomas clásicos de la enfermedad como necrosis y clorosis en los órganos vegetales infectados. Ilustración adaptada de Xin & He (2013).

P. syringae puede diseminarse a través de semillas, agua, insectos vectores y restos de plantas infectadas (Morris *et al.*, 2008). Durante la interacción con la planta hospedante desarrolla dos estilos de vida que están espacial y temporalmente conectados. Así, cuando las bacterias alcanzan la superficie de las partes aéreas de los tejidos vegetales, como hojas, tallos, flores y frutos (conocidos colectivamente como filósfera), comienza su etapa epifítica (Figura 1.1 A). Puede subsistir en este microambiente aprovechando diversos recursos, principalmente los exudados liberados por las hojas, que contienen azúcares, aminoácidos y otros compuestos orgánicos. A su

vez, acciona diferentes mecanismos de adaptación para superar las condiciones ambientales tales como la desecación, las fluctuaciones de temperatura y la radiación UV. En efecto, la humedad, proveniente de la lluvia, el rocío o la condensación, es fundamental para su supervivencia. Es posible encontrar comportamientos contrastantes en esta etapa, dependiendo de la capacidad de cada cepa en persistir sobre la superficie de la hoja (**Figura 1.1 B**). Por ejemplo, mientras que *P. syringae* pv. *syringae* tiene una gran adaptación a la fase epifítica, *P. syringae* pv. *tomato* disminuye drásticamente su población en la superficie de las hojas luego de 48 h (Xin & He, 2013). Se han reportado ciertas características de *P. syringae* pv. *syringae* que estarían asociadas a un buen desempeño como microorganismo epifítico, como lo es la tolerancia a la luz UV y a la desecación (Krishna *et al.*, 2022; Lindow *et al.*, 1982).

Las heridas que se producen en la superficie vegetal, junto a aberturas naturales como los estomas, constituyen las principales vías de entrada de *P. syringae* al interior de los tejidos de la planta (**Figura 1.1 C**) (J. Huang, 1986). La importancia de los estomas desde el punto de vista de la patogénesis está documentada, y se ha demostrado que la planta es capaz de modular la apertura de los mismos ante el reconocimiento del patógeno con la finalidad de limitar su entrada. Algunas cepas de *P. syringae* tienen la capacidad de sintetizar y secretar coronatina, una toxina químicamente similar al grupo de hormonas vegetales conocidas como jasmonatos que participan de la modulación de la apertura estomática (Nomura *et al.*, 2005). Así, la coronatina se une al receptor de jasmonatos y activa las vías de señalización a través de las cuales se induce la apertura de los estomas, de manera tal que facilita la colonización de la bacteria en la planta.

Una vez que la bacteria logra ingresar a los tejidos internos de la planta se desarrolla la segunda fase conocida como endofítica (Xin & He, 2013). En esta etapa, *P. syringae* coloniza el espacio apoplástico, el cual está conformado por todo el espacio externo de la membrana plasmática vegetal incluyendo la pared celular, y constituye el nicho principal de este patógeno (**Figura 1.1 D**). En este lugar se establece un contacto íntimo entre la bacteria y la célula vegetal, dando origen a un diálogo molecular altamente dinámico entre componentes de las respuestas de defensa de la planta y de la activación de diferentes mecanismos de virulencia de la bacteria. En este contexto, *P. syringae* pone en juego distintas estrategias con la intención de suprimir o evitar la inmunidad vegetal e inducir la movilización de nutrientes hacia el apoplasto. Estas estrategias consisten en un aumento de la movilidad celular, la secreción de distintas proteínas efectoras y toxinas, la producción de exopolisacáridos, y la expresión de proteínas detoxificantes.

La motilidad de la bacteria es un factor esencial, no sólo en la etapa endofítica, sino que también cumple un papel de gran importancia en el crecimiento epifítico (Ichinose *et al.*, 2013). Proporciona una gran ventaja a las células bacterianas para adquirir más y mejores nutrientes, evitar sustancias tóxicas y entornos desfavorables, y además, es sumamente importante para el desplazamiento desde la superficie hacia el apoplasto de las hojas. Existen diferentes tipos de motilidad bacteriana y su concreción está altamente regulada por las condiciones ambientales (Palma *et al.*, 2022). Los dos mecanismos de movilidad celular más caracterizados en bacterias son los dependientes de flagelo (movilidad en medio líquido, *swimming*, o sobre superficie sólida, *swarming*) y dependientes de los pili de tipo IV (*twitching*).

Por su parte, el transporte de proteínas hacia el medio extracelular se realiza a través de distintos sistemas de secreción especializados. En *Pto* se han identificado 6 sistemas de secreción, pero sólo 3 de ellos son relevantes para la patogénesis: el sistema de translocación de argininas gemelas (Tat) y los sistemas de secreción tipo II y III (Deng *et al.*, 2017; Guttman & Greenberg, 2001). El sistema Tat de *Pto*, altamente conservado en las bacterias gram-negativas, tiene la capacidad de secretar al menos 60 proteínas plegadas al espacio periplasmático (Caldelari *et al.*, 2006). Por su parte, el sistema de secreción de tipo II estaría encargado de secretar dos enzimas fosfolipasas C y enzimas que participan de la degradación de la pared celular. Por último, el sistema de secreción tipo III (T3SS) es el más estudiado y es el que tendría el mayor peso sobre la virulencia de *Pto*. De forma general, el T3SS establece un conducto entre el citosol de la bacteria y el de la célula huésped, lo que permite translocar directamente proteínas efectoras (Collmer *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2017). La función principal de las proteínas efectoras que son transportadas a través del T3SS es bloquear los mecanismos de inmunidad vegetal, por lo que constituyen un factor de virulencia determinante en la progresión de la enfermedad. Otra de las funciones reportadas para algunos efectores es la de establecer un ambiente acuoso en el apoplasto (*water soaking*) y de esta forma, aumentar la accesibilidad a nutrientes (Xin *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos de estos efectores son reconocidos por proteínas específicas de plantas resistentes, lo que conduce a la inducción rápida y localizada de respuestas de defensa. Esto convierte a los efectores en piezas clave, funcionando como dobles agentes tanto en la patogénesis bacteriana como en la defensa de la planta (Alfano & Collmer, 2004).

Las toxinas, como la coronatina descrita anteriormente, son secretadas por *P. syringae* en los tejidos vegetales y funcionan como factores de virulencia adicionales, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Los niveles de producción de toxinas y de daño están correlacionados, y las

cepas no toxigénicas presentan una reducción marcada de la virulencia. Las toxinas más estudiadas en *P. syringae* han sido la coronatina, la siringomicina, la tabtoxina y la faseolotoxina (Bender *et al.*, 1999).

Otro factor esencial en la patogénesis es la producción de exopolisacáridos (EPS), particularmente el levano y alginato en el caso de *Pto*. Este material viscoso forma parte de las biopelículas (*biofilms*), otorgando una mayor tolerancia al estrés oxidativo, a la acción de moléculas antimicrobianas y a la desecación (Kuchma & O'Toole, 2000; Schenk *et al.*, 2008; J. Yu *et al.*, 1999). Además de esto, participan en la perturbación de las respuestas de defensa inducidas por las plantas mediante la quelación del calcio (Aslam *et al.*, 2008). De esta manera, los EPS contribuyen a la supervivencia de la bacteria tanto durante su fase epifítica como endofítica.

Finalmente, en etapas avanzadas de la infección, caracterizada por una elevada población bacteriana y escasez de recursos nutricionales, comienza la etapa necrotrófica donde se observa la muerte celular del tejido infectado (**Figura 1.1 C**). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el hospedador cuenta con diferentes mecanismos de defensa, cuya función será detener o retrasar el ciclo infeccioso de *P. syringae*. Como será descrito en el apartado siguiente, una de las respuestas típicas observadas luego del reconocimiento del patógeno es un estallido oxidativo, que consiste en la generación rápida de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Yoshioka *et al.*, 2008). En respuesta a esto, se ha descrito que *P. syringae* es capaz de inducir la expresión de enzimas detoxificantes del tipo catalasa y peroxidasa, así como también, la producción de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular (Guo *et al.*, 2012).

1.1.5 Respuestas de defensa de las plantas ante patógenos bacterianos.

Las plantas poseen diferentes mecanismos de defensa que han sido ampliamente estudiados utilizando aproximaciones genéticas, genómicas, y bioquímicas (Glazebrook, 2005). Dichos mecanismos incluyen a las denominadas defensas preformadas, así como defensas inducidas por la presencia de microorganismos potencialmente patógenos. Las respuestas inducidas, además, pueden actuar de forma local, o bien conducir a la inmunidad sistémica donde se activan mecanismos que protegen otros tejidos y órganos del hospedador ante futuros ataques efectuados por el mismo u otros patógenos (Hammond-Kosack & Parker, 2003).

La activación de las respuestas de defensa en la planta es una consecuencia de la percepción de moléculas difusibles derivadas del patógeno o bien de moléculas originadas a partir del daño de las estructuras celulares de la planta. El modo más simple de percepción del patógeno por parte de las células de la planta es la interacción directa entre el efector y un receptor vegetal específico. Los efectores patogénicos pueden dividirse en dos grandes grupos, específicos y no específicos. Los no específicos, también denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), se encuentran conservados en distintos microorganismos debido a que cumplen roles esenciales en los mismos. Así, por ejemplo, los lipopolisacáridos y la flagelina son reconocidos por las plantas desencadenando la inmunidad activada por PAMPs (PTI, del inglés *PAMPs-triggered immunity*) (Jones & Dangl, 2006). Por otra parte, los efectores determinantes de avirulencia (*Avr*) son compuestos específicos de cada patógeno, entre los cuales se suele incluir a ciertas toxinas y proteínas necesarias para la patogénesis. No obstante, el reconocimiento de estas moléculas por parte de receptores de la planta codificados por los genes de resistencia (genes *R* presentes sólo en ciertos genotipos) conlleva a la inmunidad desencadenada por efectores (ETI, del inglés *effector-triggered immunity*). Los patógenos han evolucionado a lo largo del tiempo para adaptarse y evadir el reconocimiento por parte de la planta. Así, es que se da un proceso de co-evolución permanente en el que la selección natural favorece tanto la aparición de nuevas variantes de genes *avr* en los patógenos, como de genes *R* en las plantas.

En conjunto, la activación de los sistemas de defensa descritos conduce a una gran cantidad de cambios fisiológicos en las células vegetales. Estos cambios incluyen la producción de EROS y óxido nítrico (NO), expresión de genes de defensa, cierre de estomas, modificaciones de la pared celular, deposición de calosa y producción de compuestos antimicrobianos tales como fitoalexinas, con la finalidad de restringir el ingreso del patógeno y detener su proliferación. Además, un fenómeno característico del reconocimiento del patógeno mediante proteínas *R* es la inducción de la respuesta hipersensible (HR, del inglés *hypersensitive response*). Esta se manifiesta como un conjunto de eventos desfavorables para el crecimiento y la reproducción del patógeno, que conducen finalmente a la muerte celular localizada en el punto de infección (Heath, 2000). Uno de los primeros eventos durante la HR es la rápida producción y acumulación de EROS y NO en el sitio de infección (Coll *et al.*, 2011). Por lo que, a nivel macroscópico, se observan lesiones necróticas en el sitio de infección del patógeno luego de la HR, las cuales abarcan una pequeña fracción del total de células de la planta. Así, la HR contribuye a la supervivencia de la planta y a la eliminación del patógeno (Jackson & Taylor, 1996).

1.2 Estrés oxidativo.

1.2.1 Características de las EROS

Las EROS no poseen blancos específicos, por lo que tienen la capacidad de causar daños sobre diversos componentes celulares. Los efectos nocivos que puedan provocar estas moléculas dependerán del balance entre su concentración y las defensas antioxidantes que presenten las células (Foyer & Noctor, 2005; Møller *et al.*, 2007). Cuando se pierde dicho balance, el organismo se encuentra en una situación de estrés oxidativo. Bajo esta condición, las EROS reaccionan químicamente con lípidos, hidratos de carbono, proteínas y otros componentes celulares, produciendo modificaciones químicas que pueden llevar a un daño irreversible y consecuentemente, a la muerte celular (Winyard *et al.*, 2005).

Existen distintos tipos de EROS que se distinguen según su poder oxidante, la capacidad de difundir a través de membranas y su vida media. A partir de O_2 , de forma espontánea (en situaciones donde existen una alta disponibilidad de electrones) o de forma endógena (en reacciones mediadas por flavoenzimas), se generan radicales superóxido (O_2^-). Este es un radical con reactividad baja, que no posee la capacidad de penetrar membranas lipídicas y es por ello que queda confinado en el compartimiento en el que se produjo. Dos moléculas de O_2^- rápidamente dismutan a H_2O_2 y O_2 , reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Forman *et al.*, 2004; Nordberg & Arnér, 2001). El H_2O_2 es capaz de atravesar las membranas biológicas cumpliendo un rol importante en la formación de moléculas más reactivas. El H_2O_2 , en una reacción catalizada por iones metálicos como Fe^{2+} o Cu^{2+} (reacción de Fenton), genera radicales oxidrilos (HO^{\cdot}), siendo éste el componente de las EROS más oxidante y más tóxico en los sistemas biológicos.

1.2.2 Efectos nocivos de las EROS sobre las células bacterianas.

Un aumento de EROS constituye un peligro para la célula, ya que son capaces de causar un extenso daño en biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ADN y ARN). La mayoría de las modificaciones oxidativas de las proteínas ocurren en las cadenas laterales de los aminoácidos, como la oxidación de tioles y la formación de grupos carbonilo que afectan su estructura, conformación y función (Dalle-Donne *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). La cisteína y la metionina son los aminoácidos más susceptibles a la oxidación como producto de la presencia de átomos de

azufre reactivos. Cuando las EROS atacan a los lípidos, los productos de esta oxidación son peróxidos lipídicos que afectan principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados, que son componentes críticos de las membranas celulares (Niki, 2009; Yin *et al.*, 2011). En consecuencia, la acumulación de peróxidos lipídicos produce cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana y puede afectar los canales iónicos, inactivar las proteínas transportadoras de la membrana, alterar la homeostasis y afectar las vías de señalización (Blair, 2008; Su *et al.*, 2019; Welsch, 1987). Los ácidos nucleicos son muy susceptibles al daño químico dada la reactividad de los átomos de nitrógeno y oxígeno de las bases nitrogenadas (Simms & Zaher, 2016). Entre las cuatro bases del ADN, la guanina es la más propensa a la oxidación dado su menor potencial de reducción (Steenken & Jovanovic, 1997) y su oxidación puede interferir con el metabolismo del ADN, como la transcripción y la replicación (Lee & Kang, 2019). A diferencia de otras macromoléculas, el ADN dañado no se puede reemplazar, por lo que es necesario repararlo para asegurar la viabilidad celular. A diferencia del ADN, aún no se han identificado mecanismos de reparación para el ARN oxidado, lo que impone a la célula un desafío para mantener su homeostasis. Esto es aún más importante, ya que se ha reportado que el ARN es más susceptible a la oxidación que el ADN.

1.2.3 Mecanismo de respuesta al estrés oxidativo.

Como se mencionó anteriormente, las EROS son muy abundante en la naturaleza, por lo que es altamente probable que las bacterias tengan que lidiar con ellas durante su ciclo de vida. En lo que respecta a bacterias patógenas, una fuente importante de EROS es el metabolismo de sus posibles hospedantes, los cuales producen grandes cantidades de estas moléculas a partir del reconocimiento del patógeno, con la finalidad de que actúen como agentes bactericidas e induzcan mecanismos de defensa adicionales. Además, el propio metabolismo de la bacteria es una fuente, si bien menor pero no por eso despreciable, de EROS. Por lo tanto, estos organismos deben ser capaces de activar mecanismos para contrarrestar los efectos nocivos de las EROS, independientemente de cuál sea la fuente de origen de ellas.

Un antioxidante es una molécula cuya función biológica es la de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Las moléculas antioxidantes tienen como finalidad detener estas reacciones eliminando intermediarios reactivos. Dentro de las células, podremos encontrar dos grandes grupos de sistemas antioxidantes, los no enzimáticos y los enzimáticos.

La mayoría de los organismos vivos contienen altas concentraciones de tioles de bajo peso molecular que funcionan como moléculas antioxidantes. El glutatión reducido (GSH) es el antioxidante no enzimático más importante y ubicuo de los tioles de bajo peso molecular. Su función primaria es la de mantener la homeostasis redox intracelular. Esto se logra mediante la reducción directa de especies reactivas, pero también de un modo indirecto, al oxidarse a glutatión disulfuro (GSSG), el cual actúa como sustrato de otras proteínas responsables de la detoxificación de especies reactivas (sistema antioxidante enzimático), tales como glutatión-S-transferasas (GST) y glutatión reductasa (GP). Además de la GST y GP, las células cuentan con otras enzimas involucradas en la detoxificación de las EROS.

La catalasa es una enzima que está ampliamente distribuida entre los organismos aerobios, principalmente en algunas bacterias, animales y plantas. La naturaleza de su cofactor permite clasificarlas en hemo y no-hemo (o manganeso) catalasa. Todas las hemo-catalasas catalizan la típica reacción de descomposición del H_2O_2 , a O_2 y H_2O (catalasas monofuncionales), mientras que algunas exhiben una actividad peroxidasa adicional y reducen el H_2O_2 en presencia de un sustrato reductor (catalasas bifuncionales) (Mishra *et al.*, 2012). La mayoría de las cepas patógenas de *P. syringae* tienen 5 catalasas, incluidas *P. syringae* pv. *faseolicola* 1448a y *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Sin embargo, *Pto* contiene solo tres de estos genes: *katB* (PSPTO_3582), *katE* (PSPTO_5263) y *katG* (PSPTO_4530) (Buell CR, *et al.* 2003). KatB y KatE son catalasas monofuncionales, mientras que KatG es una catalasa bifuncional (Singh *et al.*, 2008).

La proteína reguladora OxyR es la principal responsable de reconocer y mantener los niveles de peróxido de hidrógeno en la célula (Åslund *et al.*, 1999). OxyR es un regulador transcripcional de tipo LysR, muy extendido en la mayoría de las bacterias gram-negativas. La actividad transcripcional de OxyR depende de su estado redox, ya que puede actuar como activador si está en su forma oxidada (niveles altos de H_2O_2), o como represor, cuando está en condiciones reductoras (Heo *et al.*, 2010). En *Escherichia coli*, el regulón OxyR abarca más de 20 genes diferentes, implicados en varios de los mecanismos moleculares de respuesta adaptativa al estrés redox (Zheng *et al.*, 2001). Además, OxyR regula positivamente la expresión de OxyS, un pequeño ARN regulador que parece desempeñar un papel importante en la protección contra la mutagénesis inducida por H_2O_2 (Fröhlich & Gottesman, 2018). Este mecanismo molecular luego se invierte mediante regulación por retroalimentación, ya que OxyR pasa a su estado reducido cuando los niveles redox regresan a la normalidad, proceso mediado por las enzimas que este factor de transcripción activó previamente (Åslund *et al.*, 1999).

Guo *et al.* (2012) estudiaron la participación de las enzimas catalasas en la virulencia de *Pto* y concluyeron que estas enzimas, en especial KatG y KatB, no sólo son necesarias para eliminar el H₂O₂ en condiciones *in vitro*, sino que también son indispensables para mostrar una completa virulencia en *A. thaliana*. Por su parte, Ishiga & Ichinose (2016) analizaron el rol del regulador OxyR y observaron que la delección del mismo en *Pto* genera un fenotipo hipovirulento, pero puede generar lesiones en plantas mutantes incapaces de inducir la respuesta PTI. Estos antecedentes demuestran que las enzimas detoxificantes de H₂O₂, así como también la regulación del estado redox intracelular mediada por el sistema OxyR son mecanismos de virulencia muy importantes en *Pto*.

1.3 Generalidades de las poliaminas.

Las poliaminas comprenden una familia de compuestos biológicos de bajo peso molecular que presentan dos o más grupos aminos con carga neta positiva a pH fisiológico. Son esenciales para todos los seres vivos y, a diferencia de cationes como Mg⁺² y Ca⁺², las cargas positivas de las poliaminas se encuentran a intervalos regularmente espaciados y funcionan como puentes electrostáticos que estabilizan las cargas negativas en ácidos nucleicos y otros polímeros como proteínas y fosfolípidos de membranas celulares (Shah & Swiatlo, 2008). Las más abundantes en la naturaleza son las diaminas diaminopropano (DAP), putrescina (PUT) y cadaverina (CAD), las triaminas espermidina (ESPD) y noespermidina (NESPD), y las tetraaminas espermina (ESPM) y noespermina (NESPM) (**Figura 1.2**), encontrándose con mayor frecuencia a la PUT y ESPD en bacterias (Michael, 2018). Dependiendo de la especie estudiada, las concentraciones intracelulares relativas de las diferentes poliaminas pueden variar, pudiendo alcanzar concentraciones elevadas, en algunos casos, hasta el rango milimolar (Miyamoto *et al.*, 1993). Se ha estimado que un gran porcentaje de poliaminas permanece unido a ácidos nucleicos y fosfolípidos (esto representa el 57,3 % de la PUT y el 95,1 % de la ESPD en *E. coli*), mientras que sólo una pequeña fracción se encuentra libre, lo que permite explicar la gran participación que tienen estos compuestos en distintos procesos celulares como la traducción de ARN, la replicación de ADN y la estabilidad de la membrana.

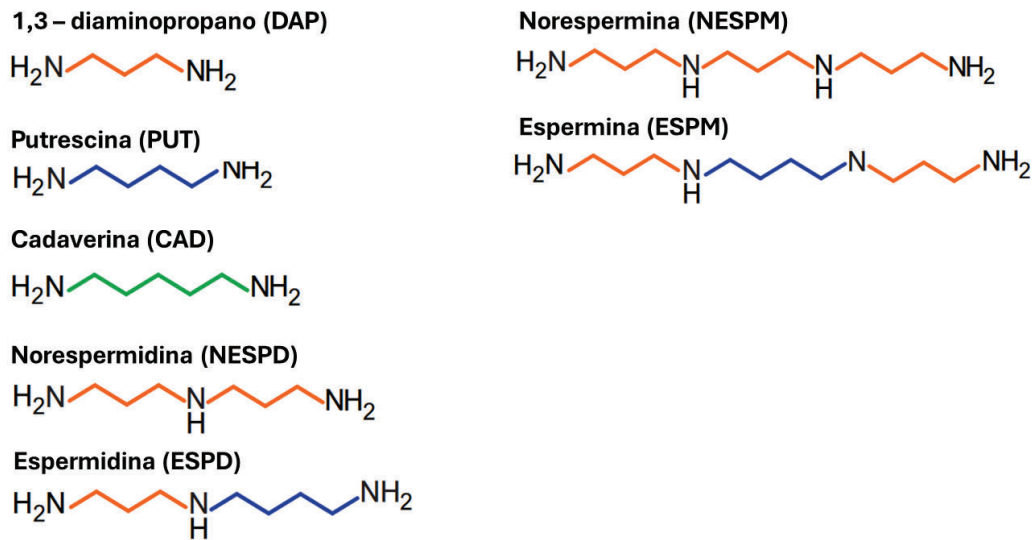


Figura 1.2. Estructura de las poliaminas más frecuentes dentro de los organismos vivos. Todos los grupos amino están protonados a pH fisiológico. Los colores representan grupo DAP (naranja), 1,4-diaminobutano (azul) o 1,5-diaminopentano (verde). Adaptado de Michael (2016).

1.3.1 Metabolismo de poliaminas en bacterias.

Dado que, tanto el aumento en la concentración de poliaminas como su deficiencia conlleva a efectos perjudiciales para las células (Miller-Fleming *et al.*, 2015), sus niveles deben ser estrictamente regulados mediante la adecuación de sus rutas de biosíntesis, degradación y transporte ante diferentes estímulos ambientales (Tabor & Tabor, 1985).

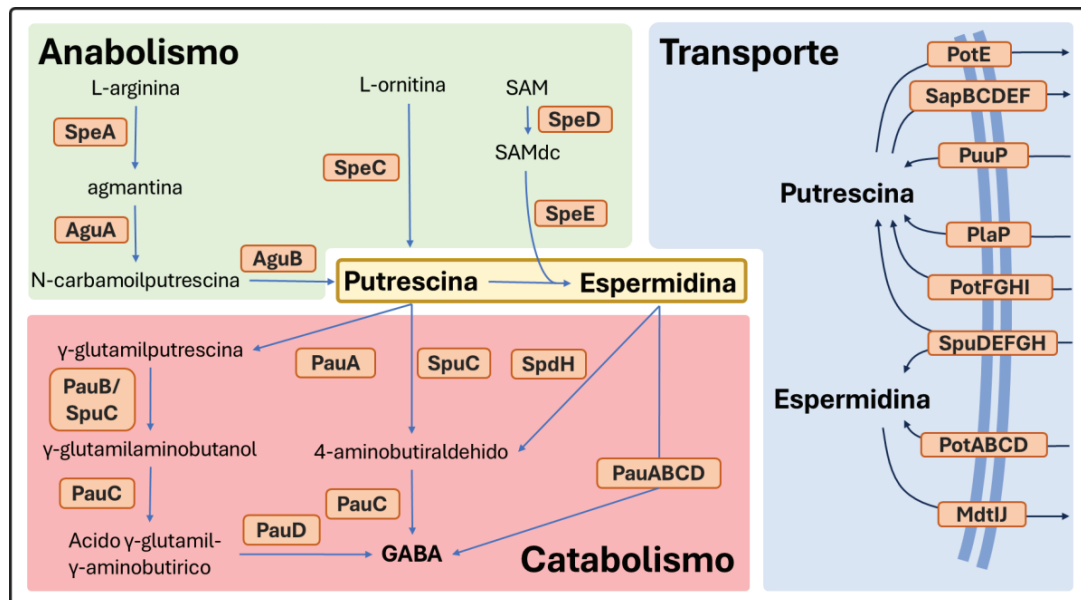


Figura 1.3. Principales rutas de anabolismo, catabolismo y transporte de poliaminas presentes en *Pseudomonas spp.* y *E. coli*. **Metabolitos:** SAM, S-adenosilmetionina; SAMdc, S-adenosilmetionina descarboxilada. **Vía de anabolismo:** SpeA, arginina descaboxilasa; AguA, agmatina deaminasa; AguB, N-carbamoilputrescina amidohidrolasa; SpeC, ornitina descarboxilasa; SpeD, S-adenosilmetionina descarboxilasa y SpeE, espermidina sintasa. **Vía de catabolismo:** PauA, γ -glutamylputrescina sintasa; PauB, γ -glutamylputrescina oxidasa; PauC, γ -glutamyl- γ -aminobutiraldhiedo deshidrogenasa; PauD, γ -glutamyl- γ -aminobutirato hidrolasa; SpuC, putrescina aminotransferasa; SpdH, espermidina deshidrogenasa. **Transportadores:** sistemas de transportes que participan tanto de la incorporación, como secreción de PUT y ESPD.

1.3.1.1 Síntesis de poliaminas.

Existen dos vías alternativas que permiten la formación de PUT. En una de ellas se decarboxila a la arginina para formar agmatina mediante la acción de la arginina descarboxilasa (SpeA), la que luego se convierte en PUT mediante dos pasos enzimáticos consecutivos catalizados por la agmatina deaminasa (AguA) y la N-carbamoilputrescina amidohidrolasa (AguB). En la otra vía mencionada, la enzima ornitina descarboxilasa (SpeC) cataliza la decarboxilación de la ornitina para producir PUT como producto final. Luego, la espermidina sintasa (SpeE) convierte PUT en ESPD mediante la adición de un grupo aminopropilo proporcionado por la S-adenosil metionina descarboxilada (SAMdc). Este metabolito intermediario es sintetizado mediante la acción de la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (SpeD) utilizando SAM como sustrato.

1.3.1.2 Catabolismo de poliaminas.

Las bacterias del género *Pseudomonas* en general poseen un gran potencial catabólico y pueden asimilar una amplia variedad de moléculas. En efecto, el principal aporte al conocimiento actual de estas vías se generó utilizando *P. aeruginosa* como modelo de estudio. En este sentido, la degradación de poliaminas no es la excepción. Por un lado, el catabolismo de PUT involucra tres vías metabólicas que pueden consistir de varios pasos y donde a su vez, intervienen más de una isoforma enzimática. Uno de ellos, implica la desaminación oxidativa de PUT mediante la acción coordinada de la transaminasa SpuC y la posterior oxidación por parte de PauC, originando GABA como producto de reacción (Yao *et al.*, 2011). Por otro lado, la vía catabólica de γ -glutamilación, puede degradar tanto PUT, como ESPD. En un primer paso, la enzima glutamil-poliamina sintasa (PauA), esterifica el grupo amino de la poliamina con el grupo γ -carboxilo del L-glutamato, generando un derivado γ -glutamylcarboxilado. Posteriormente, se elimina oxidativamente la

fracción γ -glutamato por acción secuencial de las enzimas PauB, PauC y PauD, para rendir ácido γ -aminobutírico (GABA) (Kurihara *et al.*, 2008). Además, se ha comprobado que PauB puede actuar directamente sobre PUT, oxidando esta amina sin su glutamilación previa (Van Hellemond *et al.*, 2008). Por su parte, la degradación oxidativa de ESPD por parte de la enzima ESPD deshidrogenasa (SpdH), produce 1,3-diaminopropano y γ -aminobutiraldehído, donde este último puede metabolizarse a GABA (Dasu *et al.*, 2006; Hisano *et al.*, 1992). Existe además una ruta alternativa en *E. coli*, donde la ESPD es acetilada por la enzima espermidina acetiltransferasa (SpeG), previamente a su oxidación por parte de la N-acetil-PUT-deacetilasa, para rendir acetil-PUT y γ -aminobutiraldehído (Luengo & Olivera, 2020). Debemos mencionar que, la nomenclatura utilizada en este trabajo para denominar las proteínas implicadas en la degradación de poliaminas, es la empleada en *P. aeruginosa*.

1.3.1.3 Transporte de poliaminas.

Si bien se han publicado una gran cantidad de trabajos caracterizando los sistemas de transporte de poliaminas en *E. coli*, los estudios en otras especies bacterianas son realmente escasos. Así, se han identificado en *E. coli* dos sistemas de incorporación de poliaminas pertenecientes a la familia de los transportadores con dominio de cassette de unión al ATP (ABC, *ATP binding cassette*). Uno de ellos, incorpora de forma preferencial ESPD y está compuesto por cuatro proteínas, PotA, PotB, PotC y PotD. Mientras que el otro, incorpora PUT de forma específica y está conformado por las proteínas PotF, PotG, PotH y PotI (Igarashi & Kashiwagi, 2010). En *P. aeruginosa*, se encontró un sistema similar, también del tipo ABC, denominado SpuDEFGH. Mientras que las proteínas SpuG y SpuH forman el canal transmembrana, SpuF presenta el sitio de unión al ATP, y las proteínas de localización periplasmática SpuD y SpuE son las que poseen la capacidad de unión al sustrato. Wu *et al.* (2012), demostraron que, mientras SpuD se une preferencialmente a PUT, SpuE se une a ESPD de forma exclusiva. Además de los transportadores de tipo ABC, *E. coli* expresa dos sistemas importadores de poliaminas dependientes de protones, PpuP y PlaP, que participan en la incorporación de PUT (Sugiyama *et al.*, 2017), pero no existen evidencias experimentales que indiquen que *Pseudomonas* podría codificar para alguno de ellos. Por último, la proteína PotE tiene una función dual en *E. coli*, dado que a pH neutro se comporta como un importador de PUT dependiente de protones, pero en presencia de un ambiente ácido acciona como un antiportador que secreta PUT al medio, a la vez que incorpora una molécula de ornitina. Otros complejos

proteicos que median la secreción de poliaminas en *E. coli* son el SapBCDF, para el caso de PUT, y MtdJl, para ESPD.

1.3.2 Rol de las poliaminas en la fisiología general de las bacterias.

Se ha demostrado que las poliaminas desempeñan un papel fundamental en la condensación del ADN y en la estabilización de la estructura del mismo, favoreciendo la unión de proteínas claves como factores de transcripción (Pastré *et al.*, 2006). Además, las poliaminas facilitan la síntesis de proteínas en general, e inducen la traducción de un conjunto de genes característicos que son conocidos como el modulón de poliaminas (Yoshida *et al.*, 2004). Este grupo de genes incluye cuatro factores de la transcripción: *cya*, *rpoS*, *fecI* y *fis*. Se ha planteado que estos factores regularan múltiples genes, muchos de los cuales están implicados en la multiplicación bacteriana. En general, la unión de poliaminas parece causar un cambio conformacional en un tramo de ARN bicatenario relativamente inestable del mensajero de estos genes que contiene la secuencia *Shine–Dalgarno* (SD) y el codón de inicio, lo que conduce a una mejora de la traducción (Higashi *et al.*, 2006).

Por otro lado, las poliaminas juegan un papel crucial en la funcionalidad de la membrana externa de bacterias. En este sentido, se ha descrito que las porinas OmpC y OmpF en *E. coli* interactúan con las poliaminas de manera dependiente de la concentración y del voltaje transmembrana (Iyer & Delcour, 1997). La PUT y la ESPD se unen a residuos específicos de ácido aspártico presentes en estas porinas, alterando la carga y el tamaño de los poros, lo que resulta en el cierre del canal disminuyendo la permeabilidad de la membrana externa (Iyer *et al.*, 2000). La PUT, en particular, también es un constituyente abundante de la membrana externa de algunas bacterias gram-negativas tales como *Salmonella enterica* SP *typhimurium*, *E. coli* y *Proteus mirabilis*, donde participa en el mantenimiento de la estabilidad de esta estructura (Koski & Vaara, 1991).

1.3.3 Rol de las poliaminas en la virulencia bacteriana.

En las últimas décadas se han reportado múltiples trabajos que conectan a las poliaminas con diferentes procesos asociados a la patogénesis bacteriana, aunque los roles que parecen jugar estos compuestos pueden variar significativamente entre las especies estudiadas. El principal aporte sobre el rol de las poliaminas en la virulencia bacteriana fue originado a partir del estudio de bacterias patógenas de humanos, como los son *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *Streptococcus*

pneumoniae, y *Vibrio cholerae* (Chattopadhyay *et al.*, 2003; Dasu *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2002; Sugiyama *et al.*, 2016; Donghui Wu *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2011). Esto ha llevado a proponer la perturbación de su metabolismo como blanco terapéutico. Se ha observado que en *Shigella spp.* y *Legionella pneumophila* las poliaminas favorecen la supervivencia bacteriana dentro del huésped, aunque si bien *Shigella* depende de la generación *de novo* de poliaminas, el establecimiento de la enfermedad por parte de *L. pneumophila* está condicionado a la absorción de poliaminas producidas por el huésped (Di Martino *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que otros patógenos requieren poliaminas para promover la expresión de determinados factores de virulencia durante la infección. Esto sucede típicamente en *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, donde las poliaminas son necesarias para la inducción completa del T3SS (Jelsbak *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2007) y en *S. pneumoniae*, que requiere un transportador de poliaminas para una virulencia completa (Shah *et al.*, 2011). Además, en *Yersinia pestis*, *V. cholerae* y *Burkholderia pseudomallei*, las poliaminas son cruciales para activar los genes implicados en la formación de *biofilms* (Chan & Chua, 2010; J. Lee *et al.*, 2009; Wortham *et al.*, 2010).

Existen, a su vez, trabajos que indican la conexión entre el metabolismo de estos compuestos y la virulencia en bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, la mutante del patógeno del maíz *Dickeya zeeae*, deficiente tanto en la síntesis de PUT como en su transporte, presentó un fenotipo avirulento (Shi *et al.*, 2019). Además, este trabajo demostró que la bacteria es capaz de detectar y responder a la PUT producida por su propio metabolismo o bien la originada por el metabolismo de la planta, induciendo procesos asociados a la virulencia tales como la motilidad y la formación de *biofilms*, lo que sugiere que esta molécula actuaría como señal intra e interespecies. Otra evidencia indirecta sobre la importancia que cumplen las poliaminas durante la patogénesis bacteriana, surge de la observación que fitopatógenos tales como *Ralstonia solanacearum* y *P. syringae* secretan abundantes cantidades de PUT cuando se encuentran en el interior de los tejidos de la planta o bien creciendo *in vitro* en condiciones que imitan este ambiente (Lowe-Power *et al.*, 2018; Vilas *et al.*, 2018). Además, se ha demostrado que plantas de tomate pre-tratadas con PUT muestran síntomas acelerados de la enfermedad producida por *R. solanacearum*, así como una mayor propagación sistémica del patógeno (Lowe-Power *et al.*, 2018). Estos datos llevaron a postular a la PUT como un factor de virulencia para esta especie bacteriana. Otros datos que dan cuenta de la importancia para el desarrollo de la enfermedad que tienen las poliaminas presentes en el ambiente vegetal se deriva de estudios que demuestran que distintos efectores secretados por bacterias promueven su síntesis por parte de la planta. En este sentido, el efector Brg11 de *R. solanacearum* tiene la capacidad de unirse a una región específica del promotor del gen que codifica a la enzima ADC de

tomate e inducir la expresión del mismo (Wu *et al.*, 2019). Algo similar fue descrito para el caso de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, donde el efector AvrBsT induce la síntesis de PUT gracias a la activación de la expresión del gen *ADC1* de *Capsicum annuum* (Kim *et al.*, 2013). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas estrategias no serían compartidas por otros fitopatógenos. Por ejemplo, si bien se ha observado que la acumulación de PUT en el xilema de tomate favorece el crecimiento de *R. solanacearum*, esto inhibe la multiplicación de *P. syringae*, por lo que se ha planteado la hipótesis de que este sea un mecanismo inducido por la primera para tener una ventaja competitiva respecto a otros microorganismos (Lowe-Power *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha reportado que la ESPD resulta necesaria para la síntesis de la toxina Fevamina A en *P. syringae*, la cual contribuye a suprimir el estallido oxidativo provocado en los tejidos vegetales tras la activación de la inmunidad vegetal (O'Neill *et al.*, 2018). A su vez, la síntesis y transporte de poliaminas es inducida por la incidencia de luz UV en *P. syringae* durante su crecimiento epifítico en tomate (Santamaría-Hernando *et al.*, 2020), aunque no se ha comprobado aún si esto modula la patogénesis de la bacteria o bien las poliaminas tienen un efecto protector ante condiciones adversas del ambiente. Estos estudios son importantes debido a que no sólo corroboran la participación del metabolismo de poliaminas bacteriano en la regulación de las respuestas de defensa de plantas, sino que indican que podría presentar efectos contrastantes dependiendo del nicho donde se encuentra el patógeno.

1.3.4 Rol de las poliaminas en la respuesta al estrés oxidativo en bacterias.

Como se mencionó en apartados anteriores, los patógenos bacterianos se enfrentan a la acumulación de EROS durante el proceso infeccioso, debido a que estos compuestos suelen ser generados como mecanismo de defensa del hospedador. Se sabe que en bacterias las poliaminas contribuyen significativamente a contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, ya sea interactuando directamente e inactivando radicales libres o alterando la expresión de genes involucrados en la tolerancia a este tipo de estrés (Gevrekci, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que reaccionan con el radical hidroxilo para formar aldehídos inocuos, lo que explicaría su rol protector sobre el ADN y ARN (Ha *et al.*, 1998). Además, las poliaminas pueden modular la actividad de enzimas antioxidantes, como la superóxido-dismutasa y la catalasa, potenciando la capacidad de las bacterias de neutralizar las EROS (Alexander G. Tkachenko *et al.*, 2012). También se ha observado que las poliaminas influyen en la estabilización de las membranas celulares, reduciendo la

peroxidación lipídica inducida por el estrés oxidativo. Estas múltiples funciones destacan la importancia de las poliaminas en la respuesta global de las bacterias al estrés oxidativo. En concordancia, se ha observado que cepas de *E. coli* mutantes en genes de la biosíntesis de poliaminas son más susceptibles al oxígeno (Chattopadhyay *et al.*, 2003), un fenotipo que se revierte mediante la suplementación del cultivo con PUT, CAD o ESPD. Asimismo, la exposición de mutantes incapaces de sintetizar PUT a paraquat, un inductor de la acumulación de O_2^- , da como resultado una mayor síntesis de soxS y de los genes regulados por este factor de transcripción (Jung & Kim, 2003). Así, se ha demostrado que los niveles de PUT aumentan durante el estrés oxidativo y que estas poliaminas regulan positivamente los genes *oxyR* y *katG*, ambos involucrados en la respuesta celular a un cambio en el estado redox intracelular (Tkachenko *et al.*, 2001). Además, el regulador de respuesta al estrés oxidativo SoxR se une a la región promotora del operón *cadBA* en *Vibrio vulnificus*, lo que resulta en una mayor síntesis de CAD (Kim *et al.*, 2006). En base a todos estos resultados, se cree que la disminución en la tasa de crecimiento observada en algunas mutantes de la síntesis de poliaminas se explica, al menos parcialmente, por la ausencia de los efectos protectores que poseen estas moléculas respecto al estrés oxidativo (Jung *et al.*, 2003). No obstante, es necesario realizar más estudios para entender el peso relativo que tienen los distintos mecanismos de defensa al estrés oxidativo en las bacterias.

1.4 Hipótesis de trabajo y Objetivos

Este proyecto tuvo como hipótesis de que **“El metabolismo de poliaminas es modulado en bacterias fitopatógenas durante su crecimiento en los tejidos vegetales, un proceso que juega un papel crucial en el desarrollo de la patogénesis”**. El **objetivo general** fue evaluar de manera integral el papel de las poliaminas en bacterias patógenas de plantas, lo que permitirá ampliar los conocimientos actuales sobre los eventos moleculares que ocurren durante las interacciones entre plantas y patógenos. Se utilizó como modelo de estudio la cepa DC3000 del patovar *tomato* de *Pseudomonas syringae*.

En relación con el objetivo general, los **objetivos específicos** fueron:

1. Explorar, mediante un meta-análisis de datos transcriptómicos públicos, los perfiles de expresión de los genes del metabolismo de poliaminas en distintas bacterias durante la colonización de tejidos vegetales y en respuesta al estrés oxidativo, con énfasis en *P. syringae*.
2. Investigar el papel que cumple la biosíntesis de poliaminas en la tolerancia al estrés oxidativo de la bacteria e identificar los mecanismos subyacentes.
3. Evaluar la importancia de las poliaminas en la activación de mecanismos de virulencia bacteriana y en la habilidad para infectar *Arabidopsis thaliana*.

2. CAPITULO II: Un meta-análisis de datos transcriptómicos como primera aproximación para inferir la importancia del metabolismo de poliaminas en la patogénesis y la resistencia al estrés oxidativo en *Pseudomonas syringae*.

Un meta-análisis consiste en la agrupación de resultados de múltiples estudios enfocados en una problemática común, para obtener conclusiones sólidas y reproducibles (Nordmann *et al.*, 2012). El paradigma del meta-análisis se ha utilizado con éxito en una variedad de aplicaciones, incluida la oncogenómica (Segal *et al.*, 2004), la reutilización de fármacos (Sirota *et al.*, 2011), el diagnóstico de enfermedades (Huang *et al.*, 2010), entre otras. Además, el avance en las herramientas tecnológicas y la creación de bases de datos, con la consiguiente accesibilidad para explorar grandes colecciones de estudios transcriptómicos, ha sido un gran impulso para esta clase de análisis. Los desafíos que implica realizar un meta-análisis surgen de la complejidad intrínseca de los fenotipos biológicos analizados, junto con la heterogeneidad observada entre estudios independientes, es decir, el uso de diferentes plataformas, muestras biológicas y procedimientos experimentales. Para minimizar el impacto de estos factores, los métodos de meta-análisis que contemplan datos de expresión génica generalmente se centran en examinar patrones de expresión diferencial entre estudios. Esto consiste en dividir cada estudio en un conjunto de comparaciones realizadas entre diferentes condiciones, y luego, identificar patrones en los niveles de expresión diferencial. Luego, se establecen conexiones entre las comparaciones de diferentes estudios con el propósito de encontrar similitudes. Las posibles medidas de similitud incluyen, por ejemplo, métodos basados en correlación o medidas de relevancia probabilística (Caldas *et al.*, 2012; Kupersmidt *et al.*, 2010). Si bien las pruebas estadísticas orientadas a genes o vías específicas se han utilizado con frecuencia en el contexto de meta-análisis basados en expresión diferencial, se fundamentan en descomponer cada estudio en un conjunto de comparaciones para minimizar la variabilidad experimental (Subramanian *et al.*, 2005).

Bajo esta premisa, este tipo de enfoque podría permitirnos discernir procesos asociados a la regulación del metabolismo de poliaminas en bacterias patógenas de plantas, y descubrir conexiones potenciales entre la homeostasis de poliaminas y la virulencia bacteriana. Dado que el número de estudios moleculares que examinan bacterias fitopatógenas crece constantemente, el meta-análisis de datos transcriptómicos disponibles públicamente representa una herramienta valiosa para comprender la funcionalidad de las redes genéticas en la patogénesis (Caldas & Vinga, 2014). Nuestro análisis contempló principalmente trabajos que estudiaron la expresión génica de

la especie *Pseudomonas syringae* durante la colonización de los tejidos vegetales. Además, nos propusimos investigar cómo es la respuesta transcriptómica al estrés oxidativo en esta especie bacteriana y de otras especies relacionadas filogenéticamente, con la finalidad de hallar mecanismos conservados.

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.1 Identificación de los genes que participan en el metabolismo de poliaminas en distintos genomas bacterianos.

Se utilizaron como referencia los genomas de las cepas MG1655 de *E. coli* y PAO1 de *P. aeruginosa*, seleccionando sólo los genes que forman parte del metabolismo de poliaminas cuya funcionalidad se encuentra demostrada experimentalmente. Además, utilizamos como consulta (*query sequence*) a las secuencias peptídicas codificadas por los mismos, ya que estas se encuentran más conservadas que las secuencias génicas debido a la redundancia propia del código genético. Se siguieron dos criterios para la identificación de los grupos de genes ortólogos en los genomas de las bacterias consideradas en este trabajo. Por un lado, aplicamos el método del mejor *hit* recíproco (*RBH, Reciprocal Best Hits*) utilizando el *software* blastp del NCBI (Altschul *et al.*, 1990), ofrecido por el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, exploramos el grupo de miembros ortólogos (*Ortholog Group Member*) de la base de datos genómicas de bacterias del género *Pseudomonas* (Winsor *et al.*, 2016; www.pseudomonas.com). Incluimos en nuestro análisis los genes cuyo resultado de cobertura era superior al 80 % y el valor E era inferior a 1×10^{-10} .

2.2.2 Selección de sets de datos transcriptómicos en bases de datos públicas.

Los datos de estudios transcriptómicos mediante la utilización de las metodologías de *microarrays* y *RNAseq*, se descargaron del *Gene Expression Omnibus* (GEO) del NCBI. En total, se seleccionaron nueve conjuntos de datos, siete de estos provienen de trabajos realizados en tres patovares diferentes de *P. syringae*, así como en otras especies del género, como *P. putida* y *P. aeruginosa*, mientras que los otros dos consideraron los patógenos humanos *E. coli* y *Salmonella enterica* (**Tabla 2.1**). Para explorar los vínculos entre el metabolismo de las poliaminas y la patogénesis se seleccionaron estudios en *P. syringae* cultivada en condiciones *in vitro* e *in planta*. Por su parte, aquellos trabajos donde evaluaron las respuestas bacterianas al H₂O₂ se seleccionaron para corroborar el papel potencial de estos metabolitos en la respuesta al estrés oxidativo. En este último caso, excluimos los estudios que analizaron la expresión génica más allá de 1 h de tratamiento para enfocarnos así en la respuesta temprana. Además, se descartaron los estudios que emplean

concentraciones superiores a 15mM de H₂O₂, ya que estas concentraciones son significativamente más altas que las cantidades fisiológicas encontradas por las bacterias en tejidos vegetales. Es importante destacar que, debido a la heterogeneidad experimental de estos conjuntos de datos, no se volvieron a analizar utilizando un canal unificado debido a la complejidad subyacente en su normalización. En cambio, identificamos patrones transcripcionales en un sentido más amplio comparando los niveles de expresión informados por los autores. Así, se consideraron los genes expresados diferencialmente (*DEGs, differentially expressed genes*) tal como fueron reportados en cada estudio cuyo cambio de expresión relativa en escala logarítmica (log₂FC) resultó >|0,5| con valores ajustados de p <0,05.

Tabla 2.1. Descripción de los sets de datos utilizados para el meta-análisis descrito en este capítulo.

Autores	N° de accesión del trabajo	Cepa bacteriana	Planta hospedadora	Condiciones de crecimiento
Nobori <i>et al.</i> (2018, 2020)	GSE103442GSE138901	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>In vitro</i> (medio rico y mínimo) e <i>in planta</i>
Lovelace <i>et al.</i> (2018)	GSE110100	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>In planta</i>
Yu <i>et al.</i> (2013)	GSE42544	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	<i>Phaseolus vulgaris</i> cultivar Bush Blue Lake 274	<i>In vitro</i> (medio rico y mínimo, condiciones de estrés) e <i>in planta</i>
McAtee <i>et al.</i> (2018)	PRJNA472664	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> CMP 18884	<i>Actinidia chinensis</i> Planch. var. <i>chinensis</i> "Hort16A"	<i>In planta</i>
Vandelle <i>et al.</i> (2021)	GSE164472	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovars 1, 2 y 3	-	<i>In vitro</i> (medio LB y HIM)
Bojanovic <i>et al.</i> (2017) ~	GSE85475	<i>P. putida</i> KT2440	-	<i>In vitro</i> (medio suplementado con H ₂ O ₂)
Jozefczuk <i>et al.</i> (2010)	GSE20305	<i>E. coli</i> MG1655	-	<i>In vitro</i> (medio suplementado con H ₂ O ₂)
Chang <i>et al.</i> (2005)	GSE3090	<i>P. aeruginosa</i> PA01	-	<i>In vitro</i> (medio suplementado con H ₂ O ₂)
Liu <i>et al.</i> (2020)	GSE 155479	<i>S. enterica</i> subs. <i>enterica</i> serovar enteritidis ATCC 13076	-	<i>In vitro</i> (medio suplementado con H ₂ O ₂)

2.2.3 Análisis de co-expresión.

Los valores de expresión génica informados por Nobori *et al.* (2018; 2020) y Yu *et al.* (2013) se utilizaron para realizar un análisis de correlación de Pearson por pares en todas las muestras, para generar una matriz de similitud. Luego, esta matriz se utilizó como punto de partida para la construcción de redes de co-expresión usando el software R/WGCNA versión 1.34 (Langfelder & Horvath, 2008) como lo describen Sharma *et al.* (2018). Los árboles de grupos jerárquicos se crearon estableciendo el módulo de co-expresión genética en 30, deepSplit en el nivel 1 y el árbol mergecutHeight en 0,20. Las figuras se crearon usando el software Cytoscape (Killcoyne *et al.*, 2009) y su complemento BINGO para identificar los términos de genes ontólogos (GO, *gene ontology*) enriquecidos.

2.3 RESULTADOS.

2.3.1 Identificación de los genes que participan de las rutas metabólicas de poliaminas en *Pto.*

Para realizar la búsqueda de genes implicados en el metabolismo de poliaminas en *Pto.*, *P. syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), *P. syringae* pv. *syringae* BL728 (*Pss*), *P. putida* KT2440 (*Pp*) y *S. enterica* serovar *enteritidis* (ATCC 13076) se utilizaron en principio las secuencias peptídicas de los genes identificados en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (*Pa*). Esto se fundamenta principalmente en la cercanía filogenética entre las especies mencionadas y que, además, la función de estos genes ya ha sido caracterizada con anterioridad. A su vez, también se utilizaron las secuencias codificadas por genes cuya funcionalidad se encuentra demostrada experimentalmente en *E. coli*, pero que están ausentes o su función no está demostrada experimentalmente hasta el momento en PAO1. Por otro lado, se utilizó el genoma de *S. enterica* serovar *enteritidis* P125109 para la identificación de genes con alta similitud en la cepa ATCC 13076 de la misma especie, del mismo modo que se realizó en (Vidovic et al., 2019). Los genes identificados se dividieron en tres grandes grupos según su función predicha, ya sea que se encuentren asociados a la síntesis, catabolismo o transporte de PUT y ESPD; siendo éstas, las poliaminas más abundantes encontradas en bacterias (Miyamoto et al., 1993) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Listado de genes que participan en el metabolismo de poliaminas y sus códigos de identificación (IDs) en las bacterias utilizadas en este capítulo.

	Nombre del gen	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (ICMP 18884)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728A	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. putida</i> KT2440	<i>E. coli</i> MG1655	<i>S. enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> (ATCC 13076)
Síntesis	<i>speA</i>	PSPTO_4842	IYO_RS04855	Psyr_4381	PA4839	PP_0567	b2938	SEN2930
	<i>speC</i>	PSPTO_4572	IYO_RS04125	Psyr_4247	PA4519	PP_0864	b2965	SEN2958
	<i>speF</i>	-	-	-	-	-	b0693	SEN0665
	<i>speE</i>	PSPTO_2055	IYO_RS09100	Psyr_1864	PA1687	PP_1867	b0121	SEN0171
	<i>speD</i>	PSPTO_0598	IYO_RS02565	Psyr_4575	PA0654	-	b0120	SEN0170
	<i>speB</i>	-	-	-	-	-	b2937	SEN2921
	<i>aguA</i>	PSPTO_5393	IYO_RS28130	Psyr_4932	PA0292	PP_0266	-	-
	<i>aguB</i>	PSPTO_5394	IYO_RS28135	Psyr_4933	PA0293	PP_0382 PP_4463 PP_0939 PP_3846 PP_0859 PP_0896	-	-

Catabolismo	<i>aguR</i>	PSPTO_5311	IYO_RS27760	Psyr_4869	PA0294	PP_0242	-	-
	<i>pauA1</i>	PSPTO_5310	IYO_RS27825	Psyr_4868	PA0296	PP_5184 PP_5299	b1297	-
	<i>pauA2</i>	PSPTO_5309	IYO_RS27820	Psyr_4867	PA0298	PP_3184 PP_5183	-	-
	<i>pauA3</i>	PSPTO_1921	IYO_RS09770	Psyr_3492	PA1566	PP_4399	-	-
	<i>pauA4</i>	PSPTO_0359	IYO_RS01995	Psyr_2273	PA2040	PP_5046	-	-
	<i>pauA5</i>	-	-	Psyr_4817	PA3356	-	-	-
	<i>pauA6</i>	-	-	-	PA5522	-	-	-
	<i>pauB1</i>	PSPTO_2694	IYO_RS14455	Psyr_0158	PA0534	PP_2448	b1301	SEN2971
	<i>pauB2</i>	PSPTO_5074	IYO_RS26025	Psyr_0455	PA1565	PP_4893	-	-
	<i>pauB3</i>	PSPTO_0248	IYO_RS01145	Psyr_2427	PA2776	-	-	-
	<i>pauB4</i>	PSPTO_0098	IYO_RS00670	Psyr_0232	PA5309	PP_5273 PP_3146	-	-
	<i>pauC</i>	PSPTO_0092	IYO_RS00690	Psyr_0227	PA5312	PP_5278	b1300	-
	<i>pauD1</i>	PSPTO_2902	IYO_RS16305	Psyr_2706	PA0297	PP_2179	b1298	-
	<i>pauD2</i>	PSPTO_2063	IYO_RS10495	Psyr_1873	PA1742	PP_1842	-	-
	<i>spuC</i>	PSPTO_5308	IYO_RS27815	Psyr_4866	PA0299	PP_2180 PP_5182	b3073	SEN3060
	<i>speG</i>	-	-	-	-	-	b1584	SEN1548
<i>spdH</i>	-	-	-	PA3713	-	-	-	
Transporte	<i>plaP</i>	-	-	-	-	-	b2014	-
	<i>puuP</i>	-	-	-	-	PP_1229	b1296	-
	<i>potA</i>	PSPTO_0562 PSPTO_3882 PSPTO_0489	IYO_RS02370 IYO_RS20035 IYO_RS27260	Psyr_4615 Psyr_1602 Psyr_4692	PA3607	PP_0411 PP_3817 PP_1484	b1126	SEN1823
	<i>potB</i>	PSPTO_0564	IYO_RS02380	Psyr_4613	PA3608		b1125	SEN1824
	<i>potC</i>	PSPTO_0565 PSPTO_2665	IYO_RS02385 IYO_RS14310	Psyr_4612 Psyr_2399	PA3609	PP_3816 PP_1482	b1124	SEN1826
	<i>potD</i>	PSPTO_0563 PSPTO_2785 PSPTO_2667	IYO_RS02375 IYO_RS15285 IYO_RS14320	Psyr_4614 Psyr_2516 Psyr_2401	PA3610	PP_0873 PP_3147 PP_3845 PP_5341 PP_3719 PP_2195 PP_1486	b1123	SEN1827
	<i>spuD</i>	PSPTO_5307	IYO_RS27275	Psyr_4865	PA0300	PP_5181	b1293	-
	<i>spuE/potF</i>	PSPTO_5306 PSPTO_0486	IYO_RS27805 IYO_RS27810	Psyr_4864 Psyr_4695	PA0301	PP_5180	b0854	SEN0823
	<i>spuF/potG</i>	PSPTO_5303 PSPTO_2664	IYO_RS27800	Psyr_4863	PA0302	PP_5179	b0855	SEN0824
	<i>spuG/potH</i>	PSPTO_5302 PSPTO_2666 PSPTO_0488	IYO_RS27795 IYO_RS14315 IYO_RS27265	Psyr_4862 Psyr_2400 Psyr_4693	PA0303	PP_5178	b0856	SEN0825
	<i>spuH/potI</i>	PSPTO_5301	IYO_RS27790	Psyr_4861	PA0304	PP_5177	b0857	SEN0826
	<i>potE</i>	PSPTO_5276 PSPTO_2026	IYO_RS27035 IYO_RS10315 IYO_RS14305	Psyr_4834 Psyr_1835 Psyr_2398	PA2041 PA1819	PP_5031	b0692	SEN0664
	<i>sapB</i>	PSPTO_2575	IYO_RS13730	Psyr_2266	-	PP_0881	b1293	SEN1340
	<i>sapC</i>	PSPTO_2574	IYO_RS13725	Psyr_2265	-	PP_4455 PP_0880 PP_4454	b1292	SEN1339
	<i>sapD</i>	PSPTO_2573	IYO_RS13720	Psyr_2264	-	PP_0879	b1291	SEN1338
	<i>sapF</i>	PSPTO_2572	IYO_RS13715	Psyr_2263	-	PP_0878	b1290	SEN1337

	<i>mdtI</i>	-	-	-	PA1540	PP_1701	b1599	SEN1566
	<i>mdtJ</i>	-	-	-	PA1541	PP_4930	b1600	SEN1567

2.3.1.1 Síntesis de poliaminas.

Nuestro análisis demostró que los genes principales de las dos vías de síntesis de poliaminas, la vía de la arginina descarboxilasa (SpeA) y la vía de la ornitina descarboxilasa (SpeC) se encuentran presentes en el género *Pseudomonas*. En la vía de la arginina descarboxilasa, la agmatina sirve de sustrato para la síntesis de PUT mediante dos reacciones en cadena llevadas a cabo por las enzimas AguA y AguB (Nakada *et al.*, 2001). Esto contrasta con lo observado en *E. coli*, dado que esta función es llevada a cabo por una única enzima denominada SpeB y que no está presente en las bacterias del género *Pseudomonas* evaluadas en esta tesis. Es interesante observar que *Pp*, a lo largo de la evolución, acumuló varios genes que codificarían para diferentes isoformas de la enzima AguB. Por su parte, la vía de la ornitina descarboxilasa está conservada en todas las bacterias evaluadas. Una particularidad que diferencia esta ruta metabólica en *Pseudomonas* con respecto *E. coli* es que, en esta última, así como en otras especies tal como *S. enterica*, se encuentra una variante de la enzima ornitina descarboxilasa que resulta inducible (SpeF) y tiene un rol importante en la homeostasis del estado redox intracelular (Schneider & Wendisch, 2011). En cuanto a la ruta de síntesis de ESPD, todas las bacterias presentaron genes homólogos a los genes *speE* y *speD*, a excepción de *Pp* que no presenta en su genoma la secuencia que codificaría para este último. Si bien el producto de *speD* resulta necesario para la síntesis de SAMdc, intermediario que actúa como dador de grupos aminopropano en la síntesis de ESPD, en algunas bacterias se ha reportado la existencia de una vía de síntesis para esta poliamina que es independiente de SpeE/SpeD, la cual podría ser la utilizada por *Pp* (Barrientos-Moreno *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Catabolismo de poliaminas.

Las vías de degradación de poliaminas reportadas tanto en *E. coli* como *Pa* se encuentran conservadas en las bacterias del género *Pseudomonas* consideradas en este trabajo. Como se mencionó en el **Capítulo I**, la degradación de poliaminas por la vía de γ -glutamilación en *Pseudomonas* es compleja e involucra varias enzimas, de las cuales se pueden encontrar múltiples isoformas. Se encontraron varias isoformas para las enzimas PauA, PauB y PauD, siendo *Pp* la que

presento un mayor número de variantes. El gen que codifica a la enzima SpuC, que junto a PauB participan de la vía catabólica oxidativa, también está presente en todos los genomas analizados. Por otro lado, no se encontraron secuencias similares a genes implicados en la degradación específica de ESPD en *P. syringae*, tales como el de la espermidina deshidrogenasa (*spdH*) presente en *Pa* o la espermidina acetiltransferasa (*speG*) de *E. coli* (Dasu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2018). Es interesante mencionar que el operón *spuI-spuABCDEFGH* (Lu *et al.*, 2002), con un rol importante en la utilización de PUT y ESPD (*spu*, *spermidine and putrescine utilization*), se encuentra altamente conservado en *Pseudomonas*. Este sistema está integrado por genes que codifican enzimas catabólicas (*spuI* a PauA1; *spuA* a PauD1; *spuB* a PauA2 y *spuC* para SpuC) y proteínas implicadas en el transporte, las cuales serán descritas en el siguiente apartado.

2.3.1.3 Transporte de poliaminas: incorporación.

De todos los genes que componen al operón *spuI-spuABCDEFGH*, los genes *spuDEFGH* codifican para el sistema de transporte transmembranas encargado de la incorporación de PUT y ESPD. Las proteínas que se localizan en el espacio periplásmico tienen afinidad específica a sus ligandos siendo PUT para el caso de SpuD y ESPD para el caso de SpuE (Wu *et al.*, 2012). Este sistema de transporte comparte una alta homología con los genes del sistema PotFGHI de *E. coli* encargado de la incorporación de PUT. Encontramos, además, la existencia de ortólogos de un sistema de incorporación específico de ESPD, PotABCD, que se encuentra conservado en *E. coli* y *Pseudomonas* (Furuchi *et al.*, 1991). Por su parte, en las bacterias *Pseudomonas* estudiadas en este trabajo, no se encontró ningún gen con homología a los genes *puuP* y *plaP* presentes en *E. coli*, los cuales codifican para dos canales transmembrana que permiten la incorporación de PUT (Kurihara *et al.* 2009; 2013).

2.3.1.4 Transporte de poliaminas: secreción.

Existen dos sistemas de secreción de PUT cuya funcionalidad ha sido demostrada experimentalmente en *E. coli*, denominados SapBCDF y PotE. Por su parte, la secreción de ESPD en *E. coli* está a cargo principalmente de las proteínas MdtJ y MtdI. Dado que no hay reportes de proteínas secretoras de estas aminas en *Pseudomonas*, para realizar esta búsqueda sólo consideramos los genes mencionados de *E. coli*. Así, se encontraron genes con similitud a PotE en los genomas de todas las cepas del género *Pseudomonas*, mientras que el sistema SapBDCF

estaría presente en los 3 patovares de *P. syringae* (*Pto*, *Pss* y *Psa*) y *Pp*, pero ausente en *Pa*. Por otro lado, genes codificantes a homólogos de las proteínas MdtJ/I sólo estarían presentes en los genomas de *Pa* y *Pp*.

2.3.2 *Pseudomonas syringae* reprime la síntesis de poliaminas durante su crecimiento en condiciones similares al apoplasto vegetal.

El espacio intercelular vegetal junto con la pared celular, conforman el apoplasto vegetal, el cual sirve de nicho para un gran número de microorganismos entre los cuales puede incluirse *P. syringae* (Farvardin *et al.*, 2020; Rico & Preston, 2008). El medio de cultivo HIM (*hrp/hrc induction medium*) asemeja las condiciones nutricionales del apoplasto, caracterizado por un pH levemente ácido y una relación baja de nitrógeno/carbono, y logra así inducir la expresión de los genes de virulencia *hrp/hrc* (Huynh *et al.*, 1989). Este conjunto de genes codifica, entre otras proteínas, para los componentes del sistema de secreción tipo 3 (T3SS, del inglés *type 3 secretion system*). Para evaluar de forma preliminar si existe un vínculo entre la activación de la virulencia en *P. syringae* y la homeostasis de poliaminas, analizamos la expresión de los genes que forman parte de su metabolismo utilizando los datos proporcionados por estudios donde se comparó el transcriptoma de células cultivadas en el medio inductor HIM con el de células cultivadas en medio rico (LB) como control. En este sentido, se utilizaron los datos publicados por Vandelle *et al.* (2021), donde se empleó una plataforma de microarreglos para evaluar las respuestas en tres biovares de *Psa* (*Psa*1, 2 y dos cepas del biovar 3, 3.1 y 3.2), así como en *Pto*. Debe entenderse por biovares, a diferentes cepas de un mismo patovar, que presenta una alta similitud genética, bioquímica y biológica (Vandelle *et al.*, 2021). Además, se incluyeron los datos reportados por Nobori *et al.* (2018), donde se utilizó *RNAseq* para investigar el perfil transcripcional de *Pto* en estas mismas condiciones. Como se muestra en la **Figura 2.1**, nuestro análisis evidenció la regulación negativa de la vía anabólica, aunque el nivel de represión y los genes reprimidos variaron entre especies y biovares. De los genes que forman parte de la síntesis de poliaminas, el patrón más conservado entre las diferentes cepas fue la reducción de la expresión de *speE* y *speD*. Esto estaría indicando que, frente a las condiciones nutricionales que asemejan al apoplasto, se reprime principalmente la producción de ESPD mientras que la síntesis de PUT no sería afectada. A su vez, los cambios de expresión en genes implicados en la degradación y el transporte de poliaminas fueron relativamente menores y no conservadas entre las especies o biovares analizados. Los efectos más notables en estas vías se observaron en una de las cepas del biovar 3 de *Psa* (3.2), que mostró una reducción

en la expresión de varios genes del catabolismo. Por su parte, *Pto* muestra inducción de algunos de los genes del complejo PotABCD de incorporación de ESPD.

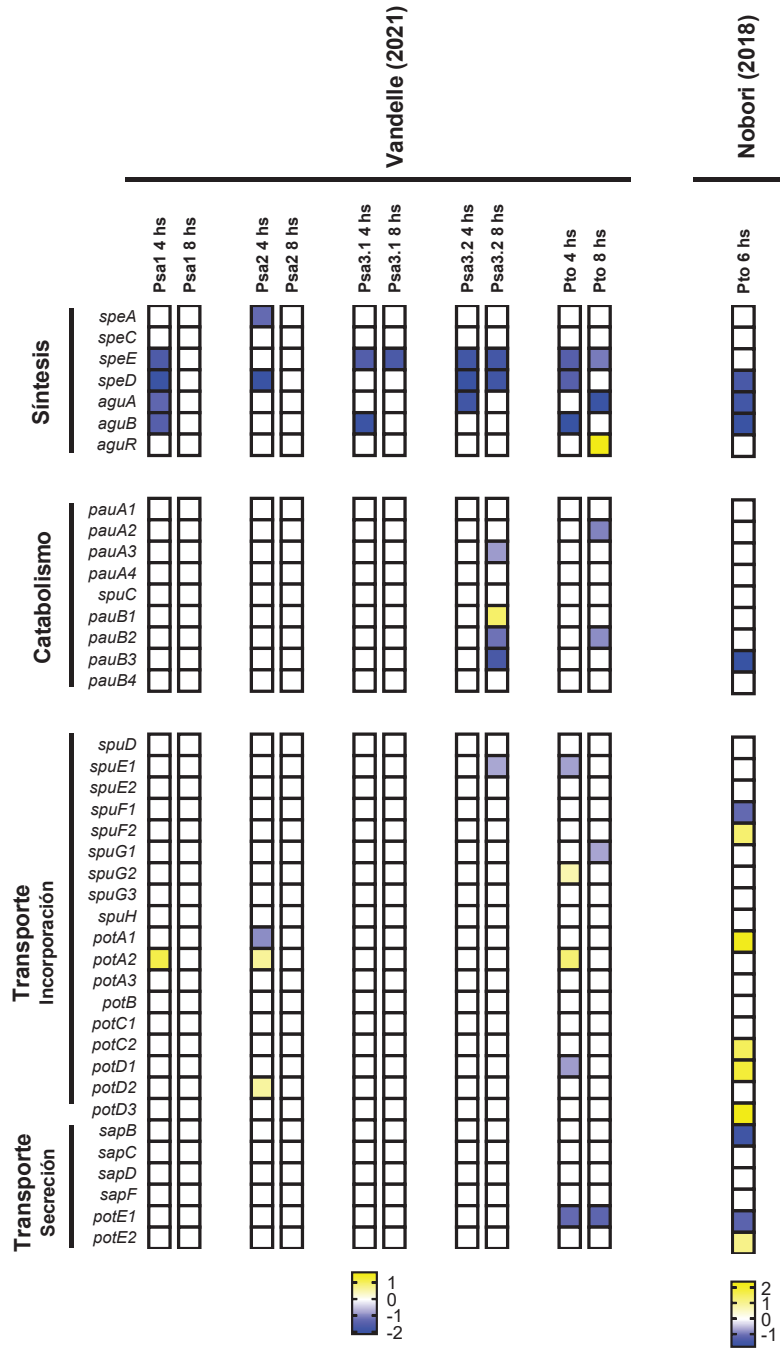


Figura 2.1. Genes del metabolismo de poliaminas diferencialmente expresados en *P. syringae* en condiciones inductoras de la virulencia. Para la confección de este mapa de calor sólo se consideraron los genes del metabolismo de poliaminas cuyos niveles de expresión mostraban una tasa de expresión de $\geq |0,5|$ (LogFC_2) con un p -ajustado $\leq 0,05$. Se utilizaron los valores reportados por Vandelle *et al.* (2021) y Nobori *et al.* (2018), donde se evaluó la expresión génica en células de *Pto*, *Psa* biovares 1, 2 (*Psa1*, *Psa2*), y dos cepas del biovar 3 (*Psa3.1* y *Psa 3.2*) cultivadas en medio HIM en comparación con su crecimiento en LB. Los niveles de expresión reportados por los autores se representan a través de la escala de color indicada.

2.3.2 El metabolismo de poliaminas se induce en *P. syringae* durante la colonización de los tejidos vegetales.

Varios estudios han reportado que durante el proceso patogénico se producen modificaciones en la composición del apoplasto, lo que resulta importante en el control de la multiplicación de patógenos (O'Leary *et al.*, 2016; Scalschi *et al.*, 2018). En este sentido, las cepas virulentas de *P. syringae* deberían ser capaces de adaptarse a estos cambios para poder prosperar y colonizar el tejido vegetal de forma exitosa. Con el objetivo de ampliar nuestras investigaciones, analizamos los perfiles transcriptómicos que se obtuvieron a partir distintos patovares de *P. syringae* durante su crecimiento en la planta hospedadora. Con este propósito, se seleccionaron cinco estudios que analizaron patovares de *P. syringae* en tales condiciones: Lovelace *et al.* (2018) y Nobori *et al.* (2018; 2020) evaluaron la expresión génica en *Pto* durante la invasión de *A. thaliana*, mientras que Yu *et al.* (2013) y McAtee *et al.* (2018) centraron sus investigaciones en *Pss* y *Psa* colonizando *Phaseolus vulgaris* y *Actinidia chinensis*, respectivamente. En contraste con los perfiles de expresión obtenidos durante el crecimiento *in vitro*, observamos una inducción temprana en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de poliaminas en *Pto*, particularmente de *speA*, *speC*, *aguA*, *aguB*, *speD* y *speE* (**Figura 2.2 A**). Este efecto no se observó en *Psa*, mientras que no fue posible corroborarlo en *Pss*, dado que sólo se cuenta con datos obtenidos a las 48 horas post inoculación (hpi). Considerando las etapas más tardías de infección, no se encontraron cambios en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PUT, mientras que la síntesis de ESPD se reprimió tanto en *Pto* como en *Pss*. Por lo tanto, especulamos que, al menos para estas cepas, una rápida inducción de la producción de poliaminas es importante al comienzo del proceso infectivo, y que estas vías no serían necesarias en las etapas más avanzadas. Las discrepancias entre *Pto* y *Psa* sugieren que el rol de las vías sintéticas de poliaminas podría depender del patovar involucrado. Por otro lado, la expresión de los genes del catabolismo y del transporte de poliaminas en condiciones *in planta* no permite discernir un patrón común, dado que muchos de ellos mostraron perfiles de expresión contrastantes en el conjunto de datos incluidos (**Figura 2.2 A**). Es posible, entonces, que

estas vías sean más sensibles a diferentes diseños experimentales y/o que su regulación esté altamente influenciada por el genotipo bacteriano. De hecho, mientras que *Pto* y *Pss* muestran distintos efectos regulatorios sobre genes de la misma vía, la mayoría de los genes expresados diferencialmente en *Psa* se encontraron inducidos.

Como fue mencionado en el **Capítulo I**, en plantas se desencadenan principalmente dos tipos de respuestas de defensa contra el ataque de patógenos (Nishad *et al.*, 2020). La primera línea de defensa se activa tras el reconocimiento de PAMPs (como, por ejemplo, el péptido de la flagelina flg22) y se conoce como inmunidad activada por PTI. Por su parte, muchos patógenos translocan efectores en las células vegetales con la intención de contrarrestar los mecanismos de defensa asociados a la PTI y de esta manera favorecer a la virulencia (Macho, 2016). Las plantas pueden detectar directa o indirectamente algunos de estos efectores iniciando una segunda respuesta de defensa, denominada inmunidad inducida por efectores o ETI (Lolle *et al.*, 2020). Tanto la activación de PTI como de ETI imponen una situación de estrés al patógeno, lo que conduce a cambios en la expresión de genes específicos en ellos. Utilizando las bases de datos descritas por Nobori *et al.* (2018; 2020) realizamos una primera aproximación al estudio de la expresión de los genes de la homeostasis de poliaminas en *Pto*, bajo situaciones de estrés impuestas por el hospedador. Nuestro análisis mostró que la pre-inducción de la PTI (en este caso inducida mediante el tratamiento de las plantas con flg22 antes de la inoculación) reprime la expresión de los genes biosintéticos de poliaminas en la bacteria y provoca una inducción de genes de los sistemas de transporte *sapBCDF* y *potABCD* (**Figura 2.2 B**, flg22 vs control). También observamos una represión en los genes de la biosíntesis de poliaminas en la cepa polimutante D36E, la que es incapaz de sintetizar efectores y, por lo tanto, no puede suprimir el sistema inmunológico vegetal. Sin embargo, sí se observó la inducción de componentes de los operones *sapBCDF* y *potABCD*. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos de defensa inducidos en plantas afectan la síntesis de poliaminas en la bacteria, la cual activa los mecanismos de transporte, probablemente, con el propósito de superar esta limitación. Estos resultados también sugieren que la translocación de efectores bacterianos ayuda a contrarrestar los efectos negativos de las respuestas de defensa de las plantas sobre la homeostasis de poliaminas. A su vez, la activación de ETI (evaluada mediante la inoculación de plantas resistentes con cepas que expresan los genes de avirulencia *avrRpt2* o *avrRps4*) originó ligeros efectos sobre el metabolismo de poliaminas bacterianas, ya que sólo se verificó una mayor inducción de genes que codifican para transportadores de poliaminas en la cepa *AvrRpt2*. Sin embargo, debe considerarse que la ETI provoca una rápida inducción de mecanismos de defensa de las plantas que tienen un impacto muy fuerte sobre el crecimiento de patógenos. Por

lo tanto, es posible que los efectos de la activación de ETI sobre el metabolismo de poliaminas bacteriano puedan quedar enmascarados por las condiciones tan drásticas para el crecimiento de la bacteria que se suscitan.

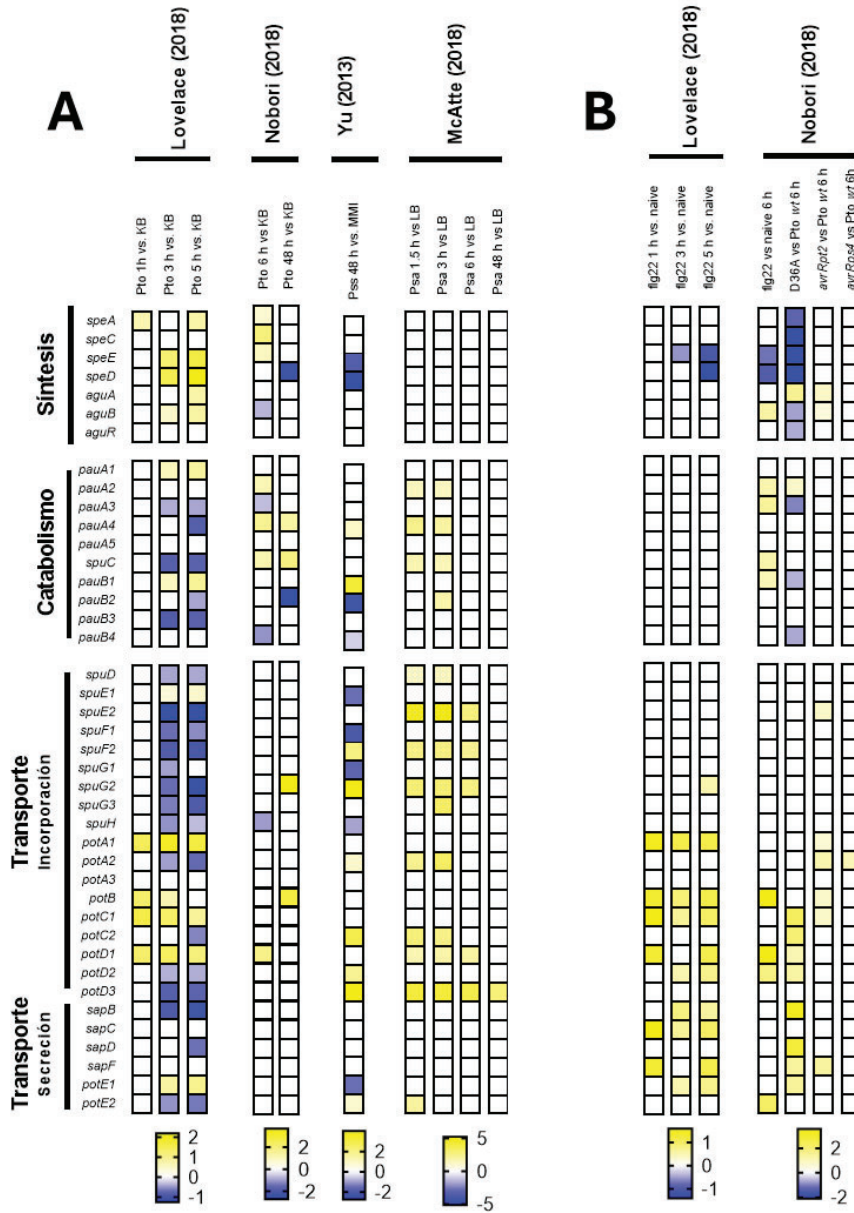


Figura 2.2. Genes del metabolismo de poliaminas diferencialmente expresados en *P. syringae* durante su interacción con la planta hospedadora. Para la confección de este mapa de calor, se consideraron únicamente los genes del metabolismo de poliaminas cuyos niveles de expresión mostraban una tasa de expresión de $\geq |0,5|$ (LogFC_2) con un p -ajustado $\leq 0,05$. El conjunto de datos **A** describe los niveles de expresión de genes de *Pto* y *Psa* durante su crecimiento en el espacio apoplástico de plantas susceptibles en comparación con bacterias cultivadas en medios de cultivo King's B (KB), Luria Bertani (LB) o medio mínimo (MM). Por otro lado, los datos utilizados para confeccionar el panel **B** de la figura provienen de estudios donde se compararon los niveles de expresión en células de *Pto* creciendo en plantas pre-tratadas con flg22 frente a células creciendo en plantas sin tratar (*naive*), o bien en cepas avirulentas (D36E, *avrPto2* y *avrPto4*) interactuando con plantas control en comparación con la cepa *wt* bajo las mismas condiciones. Los niveles de expresión reportados por los autores se representan a través de la escala de color indicada.

2.3.3 Los genes del metabolismo de poliaminas muestran relaciones de co-expresión con una gran variedad de genes relevantes para la fisiología de *P. syringae*.

Se conoce la importancia que tienen las poliaminas con diferentes procesos fisiológicos esenciales para las células, ya sean de origen vegetal, animal o de microorganismos. Haciendo uso de la extensa información que existe sobre los cambios transcripcionales que se producen en *P. syringae* en respuesta a diferentes estímulos, realizamos un análisis de co-expresión con el objetivo de descubrir los procesos celulares que se encuentran asociados a la homeostasis de poliaminas. Nuestro primer análisis se realizó utilizando los datos recopilados por Nobori *et al.* (2018; 2020), los que incluyeron numerosas combinaciones de líneas y cepas mutantes de *A. thaliana* y *Pto*, respectivamente (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Descripción de las muestras presentadas por Nobori *et al.* (2018; 2020), que fueron incluidas en el análisis de co-expresión. El nombre de las muestras corresponde al asignado por Nobori *et al.* (2018; 2020). Con colores se diferencian las muestras que fueron agrupadas en un mismo clado en el árbol presentado en la Figura 2.4. SA, ácido salicílico; AJ, ácido jasmonico.

Nombres de muestras	Cepas bacterianas (fenotipo)	Experimento	Medio de cultivo	Hospedantes (fenotipo)	Tiempo
In vitro KB <i>avrRps4</i>	<i>avrPps4</i> (ETI)	<i>In vitro</i>	KB	ninguno	6 h
In vitro KB D36E	D36E (PTI)	<i>In vitro</i>	KB	ninguno	6 h
In vitro KB <i>avrRtp2</i>	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In vitro</i>	KB	ninguno	6 h
In vitro KB Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In vitro</i>	KB	ninguno	6 h
In vitro HIM Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In vitro</i>	HIM	ninguno	6 h
Col-0 Pst DC3000-48 h	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0	48 h
ps Pst DC3000-48 h	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>pad4 sid2</i> (afectada en la vía del AS)	48 h
p Pst DC3000-48 h	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>pad4</i> (afectada en la vía del AS)	48 h

s Pst DC3000-48 h	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>sid2</i> (afectada en la vía del AS)	48 h
Flg22 Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 (pre-tratada con Flg22)	6 h
D36E Pst DC3000	D36E (PTI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0	6 h
Chitosan Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 (pre-tratada con quitosano)	6 h
stp AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>stp2/stp13</i> (afectada en el transporte de azúcares)	6 h
stp <i>Pto</i>	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>stp2/stp13</i> (afectada en el transporte de azúcares)	6 h
rr AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>rps2/rpm1</i> (afectada en la inducción de ETI)	6 h
Col-0 AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0	6 h
b2b3 AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>cyp79b2 cyp79b3</i> (afectada en el metabolismo de triptófano)	6 h
sid2-pmr4 AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>spm</i> (afectada en la vía del AS y deposición de calosa)	6 h
b2b3 DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>cyp79b2 cyp79b3</i> (afectada en el metabolismo de triptófano)	6 h
sid2-pmr4	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>spm</i> (afectada en la vía del AS y deposición de calosa)	6 h
deps AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>dde2 ein2 pad4 sid2</i> (afectada en la vía del AS, AJ y etileno)	6 h
AvrPps4	<i>avrPps4</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0	6 h
SA	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 (pre-tratada con SA)	
pad4 AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>pad4</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
de AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>dde2 ein2</i> (afectada en la vía del AS, AJ y etileno)	6 h
deps DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>dde2 ein2 pad4 sid2</i> (afectada en la vía del AS, AJ y etileno)	6 h
de DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>dde2 ein2</i> (afectada en la vía del AS, AJ y etileno)	6 h
npr1 AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>npr1</i> (afectada en la vía del AS)	6 h

nrp1 Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>npr1</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
ps AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>pad4 sid2</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
sid2 AvrRpt2	<i>avrRtp2</i> (ETI)	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>sid2</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
pad4 Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>pad4</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
ps Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>pad4 sid2</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
sid2 Pst DC3000	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 <i>sid2</i> (afectada en la vía del AS)	6 h
mock	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0 (pretratada con agua, control)	6 h
Col-0 pst	<i>Pto</i>	<i>In planta</i>	ninguno	Col-0	6 h

Nuestro análisis identificó que cuatro genes que codifican para enzimas biosintéticas de poliaminas (*speA*, *speC*, *speE* y *speD*), el transportador de poliaminas *potF* y cuatro genes implicados en el catabolismo (*pauA1*, *pauA2*, *pauA4* y *spuC*), establecen relaciones de co-expresión significativas con otros nodos genéticos. Una evaluación de estos grupos de genes, así como un análisis de enriquecimiento de términos GO (*gene ontology*), evidenció una sobrerrepresentación de categorías de genes íntimamente relacionados con la biosíntesis de compuestos nitrogenados, el metabolismo de ácidos carboxílicos, la generación de energía, los procesos metabólicos primarios, el transporte transmembrana, la regulación de la expresión génica y procesos biosintéticos de macromoléculas (**Figuras 2.3 B**). Particularmente, encontramos que algunos de los genes que pertenecen a las vías de la degradación establecieron interacciones contrastantes con estos nodos, lo que sugiere la existencia de mecanismos regulatorios que evitan la activación simultánea del anabolismo y catabolismo de estos compuestos (**Figura 2.3 A**).

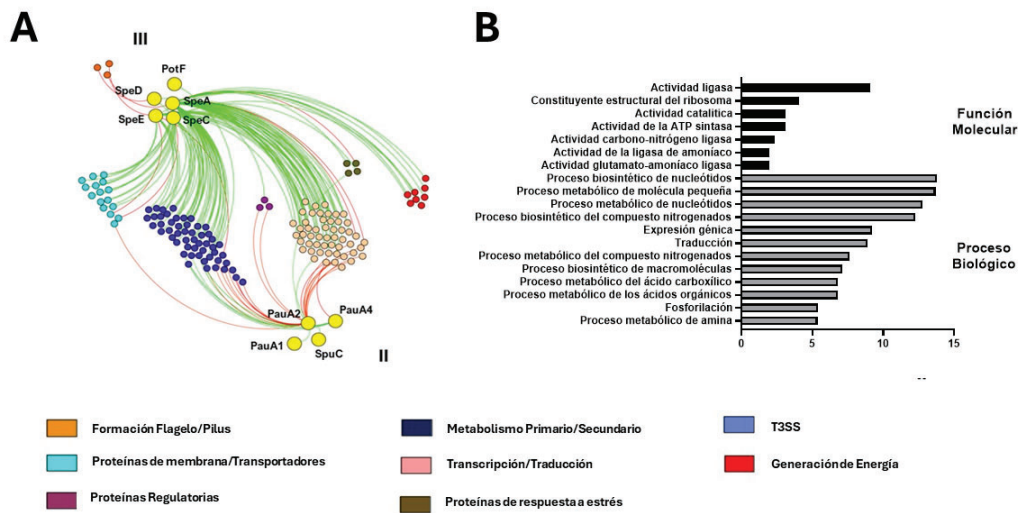


Figura 2.3. Análisis de co-expresión de genes de *Pto* utilizando los conjuntos de datos reportados por Nobori et al. (2018; 2020). Utilizando el conjunto de datos correspondiente descrito en la **Tabla 2.3** se realizó un análisis de co-expresión según la metodología descrita en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. En el panel **A** se describen los genes cuyas expresiones demostraron niveles de correlación con un $R^2 \geq 0,75$, distinguiendo las correlaciones positivas (ramas verdes) de aquellas negativas (ramas rojas). Además, las funciones biológicas a las cuales están asociados los genes seleccionados están codificadas por colores. En el panel **B** se observan los resultados del análisis de enriquecimiento GO de los genes considerados en **A**.

Otra observación importante es que la biosíntesis de poliaminas tuvo una correlación positiva con los genes implicados en la generación de energía (subunidades de ATP sintasa y proteínas transportadoras de electrones), pero una correlación negativa con los genes implicados en el desarrollo del flagelo (**Figura 2.3 A**). Por lo tanto, esto sugiere que la producción de energía está estrechamente relacionada con la síntesis de poliaminas, pero que estas tendrían un impacto negativo sobre la movilidad bacteriana.

Para comprender mejor los vínculos en la regulación de estos genes desde el punto de vista temporal, realizamos posteriormente un dendrograma de agrupación. Este análisis mostró que los genes biosintéticos se agrupan en el grupo III (**Figura 2.4**), siendo este un grupo de genes que incluye a aquellos inducidos al comienzo de la invasión de la planta y reprimidos en etapas posteriores. Es interesante notar que estos genes también están reprimidos en las muestras tomadas de las plantas donde la PTI fue inducida (flg22) o cuando se utilizó a la cepa hipovirulenta D36E. Los genes de este grupo también se encontraron reprimidos en pruebas *in vitro*, ya sea que se hayan utilizado medios ricos como mínimos. Por su parte, los genes catabólicos de poliaminas fueron asignados al grupo II. Aunque este grupo está compuesto por genes levemente inducidos en los primeros

períodos de invasión de la planta y reprimidos *in vitro*, son fuertemente inducidos en etapas posteriores de la infección. En conjunto, estos hallazgos respaldan nuestra hipótesis, donde se plantea que la producción de poliaminas es esencial al inicio de la invasión de los tejidos vegetales, pero que su acumulación no es necesaria en etapas posteriores donde la vía catabólica tiene un mayor peso.

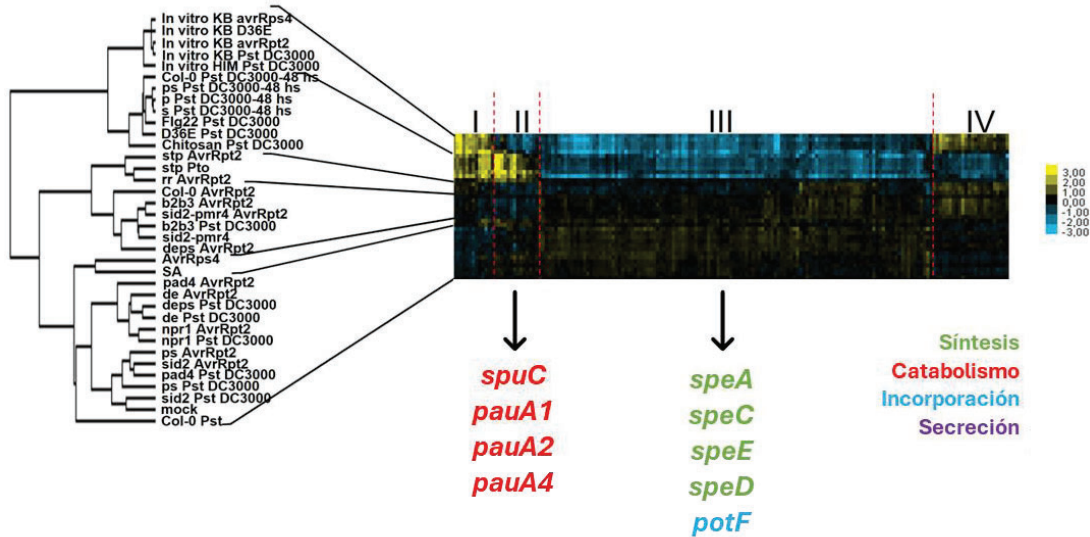


Figura 2.4. Agrupación jerárquica de los genes de *Pto* que demostraron niveles de co-expresión significativos. Se realizó el análisis de agrupación jerárquica utilizando el conjunto de genes descritos en la **Figura 2.3**, los que surgen de los trabajos de Nobori *et al.* (2018; 2020). En el eje Y se indican las muestras incluidas en el análisis (información más detallada en **Tabla 2.3**). El eje X representa la identidad de los distintos genes y se indican sus niveles de expresión según la escala indicada. A su vez, se identifican los genes del metabolismo de poliaminas presentes en cada *cluster*, referenciando su funcionalidad con colores diferentes.

Asimismo, aplicamos el mismo proceso analítico utilizando el conjunto de datos publicado por Yu *et al.* (2013). Debe tenerse en cuenta que en este trabajo se investigó la expresión génica en la cepa *Pss* B728a durante la infección de *P. vulgaris* luego de 48 hpi (tanto en su modo de crecimiento apoplástico como epifítico) y también *in vitro* bajo diferentes condiciones estresantes (deficiencia de nitrógeno o hierro y estrés oxidativo u osmótico), por lo que las conclusiones resultantes sólo pueden ser válidas al considerar etapas tardías de la infección (**Tabla 2.4**).

Tabla 2.4. Descripción de las muestras seleccionadas de Yu *et al.* (2013), que se utilizaron para llevar a cabo el análisis de co-expresión. El nombre de las muestras corresponde al asignado por los autores.

Nombres de muestras	Cepas bacterianas (fenotipo)	Experimento	Medios de cultivo	Hospedantes (fenotipo)	Tiempo
Apo	<i>Pss</i> B728a	<i>In planta</i>	ninguno	<i>P. vulgaris</i>	72 h
Epi	<i>Pss</i> B728a	<i>In planta</i>	ninguno	<i>P. vulgaris</i>	48 h
Low N	<i>Pss</i> B728a	<i>In vitro</i>	Medio mínimo sin glutamina, (NH ₄)SO ₄ y N-(β-ketocaroil)-L-homoserin lactona	ninguno	2 h
Low Fe	<i>Pss</i> B728a	<i>In vitro</i>	Medio mínimo sin FeCl ₃	ninguno	2 h
H ₂ O ₂	<i>Pss</i> B728a	<i>In vitro</i>	Medio mínimo con 0,5mM H ₂ O ₂	ninguno	15 min
NaCl	<i>Pss</i> B728a	<i>In vitro</i>	Medio mínimo con 0,23 M NaCl	ninguno	15 min

Después de realizar un análisis de enriquecimiento de GO, se descubrió que los procesos degradativos y las categorías de transporte de membrana se encontraban sobrerrepresentadas (**Figura 2.5 B**). Además, descubrimos que una mayor cantidad de genes del metabolismo de poliaminas mostraron valores de co-expresión significativos (**Figura 2.5 A**). El gen biosintético *speA* está vinculado principalmente de forma negativa a genes del metabolismo secundario y reguladores de la transcripción/traducción de genes. Además, encontramos un gran número de genes que forman parte del catabolismo o transporte con conexiones positivas a distintos procesos metabólicos. Estas observaciones sugieren que, como se concluyó anteriormente, el catabolismo y transporte de poliaminas pueden ser procesos más relevantes en etapas tardías de la infección o bajo condiciones de crecimiento estresantes.

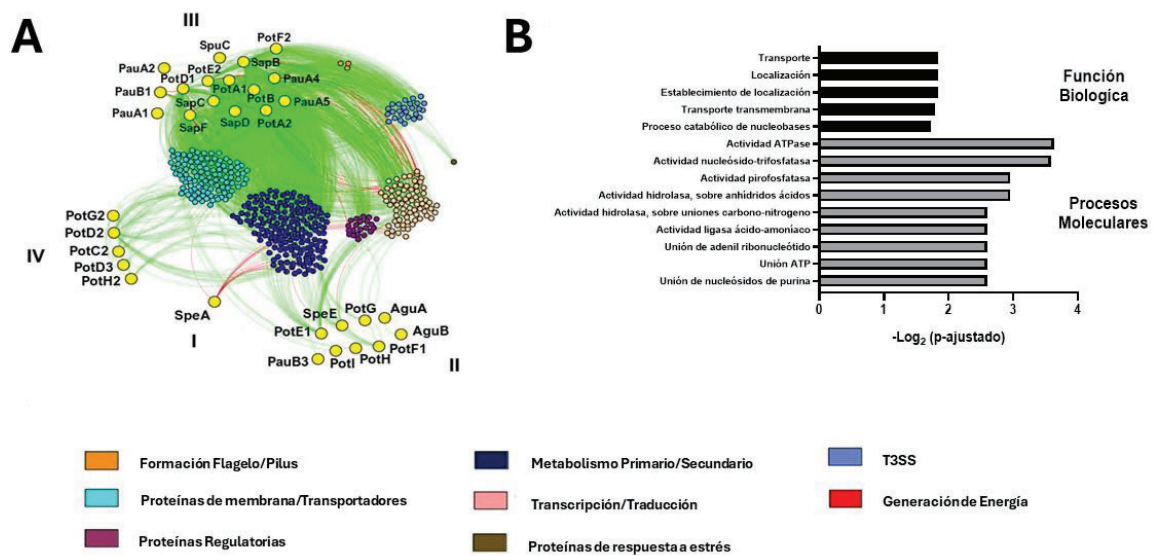


Figura 2.5. Análisis de co-expresión de genes de *Pss* utilizando los conjuntos de datos reportados por Yu et al. (2013). Utilizando el conjunto de datos correspondiente descrito en la **Tabla 2.4**, se realizó un análisis de co-expresión según la metodología descrita en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. En el panel **A** se describen los genes cuyas expresiones demostraron niveles de correlación con un $R^2 \geq 0,99$, distinguiendo las correlaciones positivas (ramas verdes) de aquellas negativas (ramas rojas). Además, las funciones biológicas a las cuales están asociados los genes seleccionados están codificadas por colores. En el panel **B** se observan los resultados del análisis de enriquecimiento GO de los genes considerados en **A**.

Por otro lado, representantes de las distintas vías metabólicas se agruparon en los mismos grupos al visualizarlos en forma de dendograma (**Figura 2.6**). Por lo tanto, se puede especular que en esta etapa de la infección o en condiciones estresantes para la bacteria, existen mecanismos regulatorios que afectan la expresión de genes específicos de cada una de las distintas vías del metabolismo de poliaminas, en lugar de regular una vía completa. Además de eso, *speA* se agrupó en el grupo I, junto con genes que están levemente reprimidos en respuesta a la baja disponibilidad de nitrógeno, pero que permanecieron inalterados en otras condiciones de crecimiento (**Figura 2.6**). Esto concuerda con la idea de que las bacterias enfrentan una reducción en la disponibilidad de nitrógeno durante el desarrollo de la enfermedad y, en consecuencia, reprimen la expresión de *speA* para limitar el uso de nitrógeno en favor de la síntesis de otros compuestos esenciales. El grupo II contiene el operón *spuDEFGH*, el gen de la proteína secretora de PUT *potE1*, el de la oxidasa catabólica *pauB3* y la espermidina sintasa *speE*. Estos genes presentaron correlaciones positivas con reguladores de la expresión génica y proteínas transmembrana ligeramente inducidas en células cultivadas en condiciones hiperosmóticas, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel en la adaptación a este tipo de estrés (**Figura 2.5 A**). A su vez, el grupo III incluye la mayor cantidad de genes del metabolismo de poliaminas. Todos estos genes pertenecen a las vías del catabolismo y transporte, y establecen una correlación positiva con una gran cantidad de genes inducidos en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno. Estos resultados respaldan la idea de que inducir la degradación y el transporte de poliaminas ayuda a la bacteria a optimizar el uso de nitrógeno en condiciones estresantes. De manera interesante, estos genes también mostraron conexiones positivas con muchos genes que forman parte del sistema *hrp/hrc*, lo que sugiere que la inducción de los mismos acompaña a la activación de la virulencia bacteriana (**Figura 2.5 A**). Por último, el grupo IV contiene los genes del sistema transportador de poliaminas *potABCD* y otros genes regulados positivamente en la planta, pero que cuya expresión no es modulada en otras condiciones (**Figura 2.6**). Esta observación concuerda con la idea de que el transporte de poliaminas podría desempeñar un papel importante en etapas avanzadas de la infección.

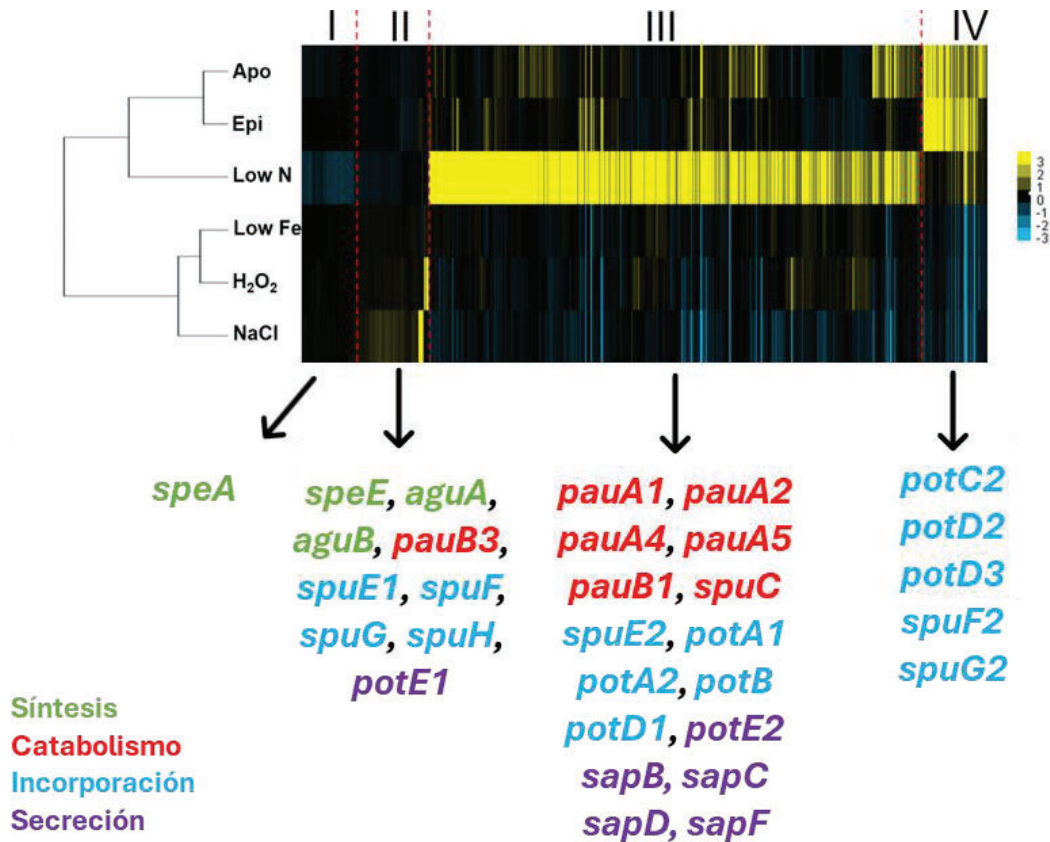


Figura 2.6. Agrupación jerárquica de los genes de *Pss* que demostraron niveles de co-expresión significativos. Se realizó el análisis de agrupación jerárquica utilizando el conjunto de genes descritos en la **Figura 2.5**, los que surgen del trabajo de Yu *et al.* 2013. En el eje Y se indican las muestras incluidas en el análisis (información más detallada en **Tabla 2.4**). El eje X representa la identidad de los distintos genes y se indican sus niveles de expresión según la escala indicada. A su vez, se identifican los genes del metabolismo de poliaminas presentes en cada *cluster*, referenciando su funcionalidad con colores diferentes. Low N y Low Fe: condiciones de crecimiento con deficiencia de nitrógeno o hierro, respectivamente.

2.3.4 Modulación de los genes del metabolismo de poliaminas durante la respuesta al estrés oxidativo.

Las poliaminas han sido reconocidas como metabolitos importantes que favorecen la tolerancia de bacterias al estrés oxidativo (Chattopadhyay *et al.*, 2003; Jung & Kim, 2003; Tkachenko *et al.*, 2012; Akhova & Tkachenko, 2020; Felix *et al.*, 2021). A pesar de esto, nuestro análisis de co-expresión descrito en la sección anterior, no arrojó ninguna correlación significativa entre los genes del

metabolismo de poliaminas y genes implicados en la homeostasis del estado redox. Solo se observó una correlación positiva entre el gen que codifica la catalasa KatG y los genes que se ubicaron en el grupo II del árbol jerárquico obtenido a partir de los datos de Nobori *et al.* (2018; 2020) (**Figura 2.4**). Dado que el gen *katG* (junto con *katB*) es necesario para la virulencia en *Pto* (Guo *et al.*, 2012) y que su inducción en respuesta al H₂O₂ en *E. coli* depende de poliaminas (Jung & Kim, 2003), nos preguntamos si la activación de los mecanismos de desintoxicación de H₂O₂ en *P. syringae* va acompañada de modificaciones en la homeostasis de poliaminas. Con esto en mente, buscamos datos transcriptómicos donde se evaluó la expresión de genes bacterianos en respuesta al H₂O₂, centrándonos en trabajos cuyo diseño experimental consideraba la aplicación del estresor durante un período corto de tiempo (≥ 1 h) a los fines de evaluar la respuesta inmediata. Además, debido a que no se encontró en la literatura un gran número de trabajos que utilizaran *Pto* como modelo de estudio, se incluyeron otros estudios realizados en especies cercanas filogenéticamente como son *Pp* y *Pa*. Sumado a esto, seleccionamos trabajos que utilizaron *E. coli* y *S. enterica* como especies modelos, y de esta manera, obtener una idea general del comportamiento del metabolismo de poliaminas de bacterias en respuesta a este estrés.

Como se muestra en la **Figura 2.7 A**, a excepción de la inhibición de la síntesis de PUT o ESPD poco después de la adición de H₂O₂ al medio de cultivo, nuestro análisis muestra que el metabolismo de poliaminas permanece prácticamente sin cambios durante la respuesta al estrés oxidativo en especies de *Pseudomonas*. En *E. coli* y *S. enterica*, sin embargo, se produce una mayor represión de la síntesis y el transporte de poliaminas (**Figura 2.7 B**), lo que sugiere que la regulación temprana de la concentración intracelular de estos metabolitos podría desempeñar un papel más importante en las enterobacterias. De hecho, genes que son inducidos en respuesta al estrés oxidativo tales como *oxyR*, *soxS* y *soxR*, resultaron mayormente activados en estas especies en comparación con *Pseudomonas*. En general, concebimos que se requiere una rápida represión de la síntesis de poliaminas como parte de la respuesta al estrés oxidativo en bacterias. Sería interesante explorar, entonces, cómo las bacterias fitopatógenas adaptan el metabolismo de poliaminas para hacer frente al estrés oxidativo impuesto por las plantas sin afectar su aptitud ni la patogénesis.

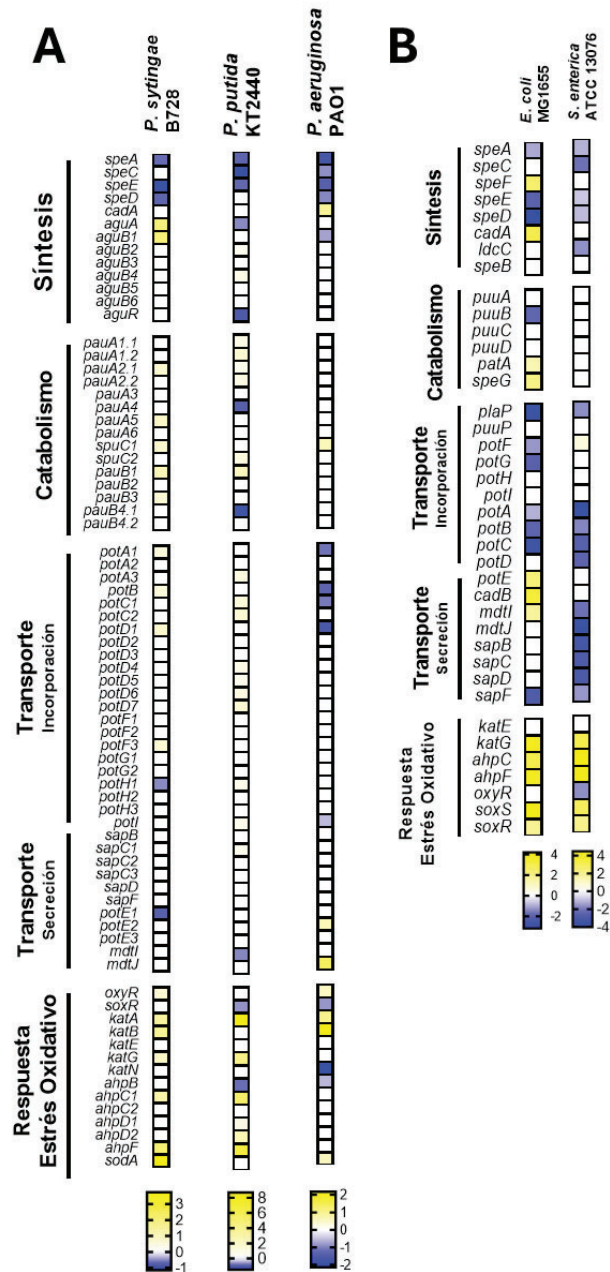


Figura 2.7. Genes del metabolismo de poliaminas diferencialmente expresados en bacterias en respuesta al estrés oxidativo. El mapa de calor representa la tasa de cambio en los niveles de expresión (\log_2FC) de genes del metabolismo de poliaminas en **A)** *Pto*, *Pp* K2400 y *Pa* PAO1; y **B)** *Escherichia coli* K-12 y *Salmonella enterica* ATCC 13076, cultivadas en medio suplementado con H_2O_2 respecto a células cultivadas en condiciones control. Se incluyó al análisis, además, genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo. Se consideraron únicamente los genes cuyos niveles de expresión mostraban una tasa de expresión de $\geq |0,5|$ (LogFC_2) con un valor p -ajustado $\leq 0,05$.

2.4 DISCUSIÓN.

La creciente cantidad de conjuntos de datos transcriptómicos en bacterias proporciona un recurso valioso para identificar características claves involucradas en procesos celulares como el crecimiento, el desarrollo y la tolerancia al estrés (Caldas & Vinga, 2014). En el caso de los microbios patógenos, estos estudios no sólo permiten evaluar la relevancia relativa de diferentes vías metabólicas, sino que también proporcionan una gran cantidad de información sobre los mecanismos comunes que participan en la activación de la virulencia. En este capítulo, exploramos distintas bases de datos como una primera aproximación para comprender la modulación de la expresión de los genes del metabolismo de poliaminas durante el establecimiento de enfermedades y en la respuesta al estrés oxidativo en especies de *Pseudomonas*.

En una primera instancia, identificamos en *P. syringae* y otras especies bacterianas relacionadas, los genes del metabolismo de poliaminas utilizando como referencias los genes que han sido previamente caracterizados y evaluados experimentalmente en *Pa* y *E. coli* MG1655. Agrupamos estos genes en 3 categorías según su función biológica: anabolismo, catabolismo y transporte (aquellos que participan tanto en la secreción, como en la incorporación de poliaminas). Analizando los genes identificados de forma global, podemos concluir que las rutas metabólicas de poliaminas se encuentran altamente conservadas en *E. coli* y *S. enterica*, coincidente con la cercanía filogenética observada entre estas especies (Williams *et al.*, 2010). Por su parte, si bien el género *Pseudomonas* se caracteriza por su versatilidad metabólica (Silby *et al.*, 2011), dentro de las especies analizadas encontramos poca variación en lo que respecta a las vías del metabolismo de poliaminas.

En relación a esto, encontramos genes que participan tanto en la síntesis de PUT (ya sea por la vía de la ornitina descarboxilasa, como de la arginina descarboxilasa) y de ESPD (*speE/speD*). Como única excepción, en el genoma de *Pp* KT2440 no se encontró ningún gen que codifique para la enzima SpeD, la cual cataliza la síntesis de SAMdc. Existen rutas alternativas que explican la síntesis de ESPD en otras bacterias mediante la acción de las enzimas carboxiespermidina descarboxilasa (CASDC) y carboxiespermidina deshidrogenasa (CASDH), aunque su presencia no ha sido demostrada en *Pp* hasta el momento (Barrientos-Moreno *et al.*, 2019). En concordancia con esta hipótesis, Melnyk *et al.* (2019) reportaron que prácticamente todas las bacterias del género *Pseudomonas* tienen el potencial genómico de sintetizar ESPD a través de la vía SpeE/SpeD o CASDC/CASDH, aunque rara vez se pueden encontrar ambas en simultáneo. Por su parte,

encontramos en *Pseudomonas* los homólogos para la mayoría de los genes que forman parte de las vías catabólicas de poliaminas que han sido caracterizados en *E. coli*. Un hecho interesante en relación a esto, es la alta tasa de duplicación observada en los genes *pauA* y *pauB* en las bacterias de este género. Se ha descrito que la presencia de duplicaciones génicas ofrece oportunidades evolutivas para que los organismos se diversifiquen y se adapten a condiciones ambientales cambiantes, ya que los genes duplicados pueden modificar sus patrones de expresión (Huminiński y Wolfe, 2004; Tümpel *et al.*, 2006), cambiar las afinidades de sustrato (Voordeckers *et al.*, 2012) y cambiar entre módulos reguladores (Thompson *et al.*, 2013). Por otro lado, se observó que solo *Pa* codifica para la enzima SpeG, la cual participa en la degradación de ESPD y tendría un rol muy relevante para la patogénesis de esta bacteria (Hu *et al.*, 2018). Dado la falta de estudios sobre la degradación de esta amina en *P. syringae*, se desconoce si existe algún gen que pueda cumplir una función biológica similar a la enzima SpeG o si este mecanismo es exclusivo de *Pa*. El operón *spuABDCDEFGH* fue identificado en todos los genomas de *Pseudomonas*, destacando su relevancia en la incorporación y utilización de PUT y ESPD (Lu *et al.*, 2002). Nuevamente, observamos genes duplicados para algunos de los genes que forman parte de este operón, en especial los que codifican para los complejos transmembrana. Una vía alternativa para la asimilación de ESPD en *Pseudomonas* estaría mediada por la acción del complejo PotABDC. Sin embargo, se desconoce la existencia de una vía alternativa para PUT como la que cumplen los transportadores codificados por los genes *puuP* y *plaP* en *E. coli*, siendo *Pp* la única que tendría la capacidad de expresar un gen homólogo a *puuP*. Por su parte, la secreción de PUT es llevada a cabo por los productos del gen *potE* y el operón *sapBCDF* en *E. coli*. En relación con esto, se encontraron secuencias génicas homólogas para estos transportadores en los genomas de *Pseudomonas*, con la excepción del operón *sapBDCF*, que no fue encontrado en *Pa*. En cambio, esta cepa es la única de las *Pseudomonas* evaluadas que posee homólogos para el complejo MtdJI (Higashi *et al.*, 2008) encargado de la secreción de ESPD en *E. coli*. Si bien la secreción de poliaminas tiene un rol relevante en la fisiología bacteriana dado que participan en la producción del *biofilms* (Karatan *et al.*, 2005), en la respuesta al estrés oxidativo y a antibióticos (Johnson *et al.*, 2012), así como en la comunicación célula-célula (Shi *et al.*, 2019), actualmente no contamos con trabajos que demuestren experimentalmente cuáles son los genes que participarían en estos procesos en *Pseudomonas*.

Una vez identificados los genes que participan del metabolismo de las poliaminas, comparamos los niveles de expresión de estos en células de *P. syringae* cultivadas en medios ricos en relación a aquellas que crecieron en medio HIM. Los trabajos seleccionados para nuestro análisis estudiaron

un lapso de tiempo que abarcó 8 h de cultivo y evidenciaron la existencia de un mecanismo regulador que suprime principalmente la síntesis de poliaminas en HIM. Estos resultados indican que las poliaminas tendrían una importancia relativamente menor durante el crecimiento en condiciones inductoras de la virulencia, además, sugieren que los mecanismos que gobiernan la homeostasis de las poliaminas son distintos de los que inducen la expresión del conjunto de genes pertenecientes al *hrp/hrc*. Esta observación contradice resultados previos de nuestro grupo de trabajo, en donde se demostró mediante qRT-PCR que el gen biosintético de poliaminas *speC* y las enzimas catabólicas *pauA3* y *pauB2* son levemente inducidos en estas mismas condiciones de cultivo (Vilas *et al.*, 2018). Sin embargo, debe considerarse que en el trabajo mencionado sólo se analizaron muestras recolectadas a las 6 hpi, por lo que las variaciones en la expresión genética antes o después de ese tiempo podrían diferir.

Si bien lo descrito anteriormente ofrece una primera aproximación al entendimiento de la importancia de las poliaminas en la patogénesis bacteriana, es sabido que el crecimiento bacteriano *in planta* genera modificaciones mucho más amplias en los patrones de expresión génicas que las condiciones de crecimiento *in vitro*. En consecuencia, los resultados obtenidos en condiciones *in vitro* e *in planta* no siempre son comparables (Vandelle *et al.*, 2021). Por lo tanto, posteriormente evaluamos datos de expresión *in planta* publicados en diferentes estudios, los cuales deberían reflejar con mayor precisión las alteraciones del metabolismo de poliaminas y su conexión con el desarrollo de la infección. En esta línea, nuestros estudios demostraron cambios significativos respecto al comportamiento metabólico que mostraron las células *in vitro*. En este sentido, evidenciamos que los genes que participan de síntesis de poliaminas se inducen durante las primeras etapas de la infección, pero se reprimen a medida que avanza la patogénesis. Si este aumento inicial en el contenido de poliaminas a través de su síntesis es necesario para apoyar la aptitud celular en esta etapa, entonces las cepas mutantes perturbadas en la síntesis de poliaminas deberían verse afectadas en su virulencia. En relación con esto, trabajos en *R. solanacearum* (que depende exclusivamente de la vía de la ornitina descarboxilasa para la síntesis de PUT) demostraron que la delección del gen *speC* conduce a un fenotipo hipovirulento en tomate (Lowe-Power *et al.*, 2018).

Otro dato interesante que surge de nuestro análisis es que la pre-inducción de respuestas de defensa vegetal conduce a la represión en los genes de la biosíntesis de poliaminas y a la regulación positiva de los genes del transporte en la bacteria. Este fenómeno también se observa en la cepa D36E, deficiente en la translocación de efectores, resaltando la importancia de la función del T3SS

para contrarrestar los mecanismos de defensa de las plantas. Por lo tanto, entendemos que la síntesis de poliaminas disminuye en *P. syringae* cuando esta bacteria se enfrenta a los mecanismos de inmunidad vegetal o bien, cuando no posee las herramientas moleculares para contrarrestar los efectos de los mismos. En efecto, es concebible que la mayor expresión de transportadores de poliaminas en estas condiciones se deba a un intento por parte de la bacteria de incorporar estos compuestos desde el nicho extracelular como resultado de la reducción de la producción *de novo*. Pero cabe entonces preguntarse, ¿por qué disminuye la síntesis de poliaminas en estas condiciones? ¿Es esto una respuesta del metabolismo bacteriano al ambiente nocivo impuesto por la activación de la inmunidad vegetal, o bien es una consecuencia de la acción de los mecanismos de defensa de las plantas para influir en la fisiología bacteriana?

Para intentar responder estas interrogantes, se realizaron análisis de co-expresión utilizando como matriz los datos reportados por Nobori *et al.* (2018; 2020) y Yu *et al.* (2013), donde las muestras corresponden a células que crecieron tanto *in vitro* como *in planta*. Estos estudios indicaron que los genes implicados en la biosíntesis de poliaminas se co-expresan positivamente con componentes ribosomales, así como con reguladores de la transcripción/traducción. Por el contrario, los genes catabólicos de poliaminas mostraron una relación de co-expresión negativa con el mismo grupo de genes. Esto concuerda con estudios que demuestran que las poliaminas son necesarias para garantizar la correcta interacción del complejo ribosomal, promoviendo una mayor eficiencia de la transcripción (Winther *et al.*, 2021). También distinguimos el mismo patrón de co-expresión con genes implicados en la formación de ATP, ácido carboxílico y metabolismo del nitrógeno. Así, la acumulación de poliaminas estaría asociada a la síntesis de compuestos metabólicamente importantes, a una mayor tasa de generación de energía y expresión génica. Otro hallazgo interesante es el hecho de que los genes biosintéticos de poliaminas se encontraron inversamente relacionados con genes implicados en la producción de flagelos, ya que sugiere que el movimiento bacteriano podría verse afectado por poliaminas en *Pseudomonas*. En concordancia, recientemente se demostró que la acumulación de PUT en *Pa*, lo que se logra interrumpiendo la degradación de la misma o alterando la síntesis de ESPD, promueve la transición celular hacia un estado sésil (Liu *et al.*, 2021). Asimismo, la falta de *speA* en *Dickeya zeae* y *Proteus mirabilis* disminuye la movilidad celular y la producción de *biofilms* (Shah and Swiatlo, 2008; Shi *et al.*, 2019), lo que también se logra en *Yersinia pestis* mediante la eliminación de *speA* y *speC* (Patel *et al.*, 2006). Debido al rol pleiotrópico de las poliaminas y su amplia distribución, más estudios serán necesarios para establecer mecanismos regulatorios precisos que conectan la homeostasis de estas moléculas y la motilidad celular.

Nuestro estudio también mostró que la biosíntesis de poliaminas bacteriana se reprime durante las etapas más tardías de la infección, lo que también se asocia con la inducción de transportadores y genes catabólicos. Un escenario similar puede observarse en etapas tardías de interacciones patogénicas establecidas por otras bacterias. Por ejemplo, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycine* reduce la expresión de *speD* mientras que regula positivamente otros genes biosintéticos y del transporte de poliaminas luego de 72 hpi durante el establecimiento de la enfermedad en soja (Chatnaparat *et al.*, 2016). Del mismo modo, la síntesis de poliaminas se reprime en *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* después de 5 días de su inoculación en plantas de arroz, a la vez que se observa una activación del transporte (Lee *et al.*, 2017). Es interesante destacar que nuestro análisis de agrupamiento jerárquico de genes co-expresados muestra que los perfiles de transcripción de muestras tomadas 48 hpi se agrupan con los obtenidos de células que crecen *in vitro* en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno o en medio mínimo, así como en experimentos que utilizan plantas con mecanismos de inmunidad pre-inducidos (mediante tratamientos previos con flg22) o que utilizan a la cepa D36E. Por lo tanto, es razonable concluir que las bacterias se enfrentan a condiciones más restrictivas en la última fase de la invasión de la planta en términos de disponibilidad de nutrientes. Además, la inducción de varios genes metabólicos de poliaminas se correlaciona con la inducción del T3SS a las 48 hpi. En conjunto, estos hallazgos conducen a la hipótesis de que la síntesis de poliaminas en los patovares de *Pseudomonas syringae* es importante durante la etapa más temprana de invasión del hospedante, un proceso que se acompaña de la activación del metabolismo del nitrógeno y del ácido carboxílico, la traducción/transcripción y la generación de energía. Esta vía, sin embargo, sería reprimida en las últimas etapas de la infección con la consiguiente inducción del transporte de poliaminas y de los sistemas catabólicos, lo cual constituye posiblemente una adaptación a la menor disponibilidad de nutrientes.

Se sabe que uno de los principales mecanismos de defensa desplegados por las plantas contra los patógenos bacterianos endofíticos es la generación y acumulación de EROS en el apoplasto (Yu *et al.*, 2013; O'Leary *et al.*, 2016), imponiendo así condiciones de estrés oxidativo con la intención de contener la proliferación del microorganismo y de inducir otros mecanismos de defensa. Con esto en mente, exploramos datos transcriptómicos obtenidos de diferentes especies bacterianas expuestas a estrés oxidativo inducido por la suplementación de medios de cultivo con H₂O₂. Nuestro análisis mostró que, aunque en diferentes grados, los genes biosintéticos de poliaminas fueron regulados negativamente en las bacterias cultivadas en tales condiciones estresantes. Por lo tanto, especulamos que existe un mecanismo regulatorio que conduce a la reducción de la síntesis de poliaminas cuando las bacterias se enfrentan a condiciones no favorables. Si una menor

expresión de los genes de síntesis de poliaminas se asocia con la activación de la maquinaria antioxidante en bacterias, esto desafía el paradigma aceptado actualmente donde se afirma que las poliaminas son necesarias para la tolerancia al estrés oxidativo (Chattopadhyay *et al.*, 2003; El-Halfawy & Valvano, 2014; Jelsbak *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2012). En relación a esto, Lowe-Power *et al.* (2018) propusieron que la síntesis y secreción de poliaminas por *R. solanacearum* en el xilema de tomate sería un mecanismo utilizado por esta bacteria para atenuar el estrés oxidativo. Es importante destacar que los autores demostraron que la PUT se acumula en este compartimento vegetal presumiblemente como producto de la activación del metabolismo bacteriano, y que la mutante $\Delta speC$ resultó completamente avirulenta. En un trabajo llevado a cabo previamente por nuestro grupo de trabajo, se demostró que *Pto* también puede secretar grandes cantidades de PUT mientras crece en fluidos apoplásticos de tomate, aunque no se pudo encontrar un vínculo entre este fenómeno y la aptitud/virulencia bacteriana (Vilas *et al.*, 2018). Por lo tanto, la síntesis de poliaminas podría no estar relacionada a la respuesta al estrés oxidativo, aunque sí lo podría estar la secreción de las mismas, proceso que también sería importante para la virulencia. En los **Capítulos III y IV** de la presente tesis doctoral exploramos estos aspectos utilizando cepas mutantes de *Pto* incapaces de sintetizar poliaminas.

3. CAPITULO III: Participación del metabolismo de poliaminas de *P. syringae* en la tolerancia al estrés oxidativo.

Los organismos superiores responden a microorganismos potencialmente dañinos con la producción de EROS, tales como el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por ejemplo, la síntesis de EROS es una conocida respuesta de defensa evocada en las plantas tras la detección de patógenos, que consiste en la rápida síntesis y acumulación de altas concentraciones de estas moléculas en las proximidades del microorganismo invasor. Esta respuesta crea un ambiente oxidativo, que actúa directa e indirectamente, afectando el crecimiento microbiano y el desarrollo de enfermedades. El estrés oxidativo en microorganismos también puede ser causado por la acción de compuestos antimicrobianos producidos por plantas, que promueven tasas más altas de producción interna de EROS. Como resultado, los microorganismos deben tener mecanismos para lidiar con los efectos negativos de estos compuestos. Si esto no se gestiona adecuadamente, puede tener consecuencias deletéreas sobre el crecimiento y el desarrollo debido al daño oxidativo de biomoléculas importantes.

Las poliaminas han sido relacionadas en la modulación de la respuesta a este estrés en bacterias. Sin embargo, esto se ve cuestionado por los resultados del meta-análisis que describimos en el **Capítulo II**, donde se observa la represión de los genes implicados en el anabolismo de poliaminas en diversas especies bacterianas, poco después de exponer las células a H_2O_2 . Además, los antecedentes reportados hasta el momento surgen de trabajos donde no se contemplaron bacterias fitopatógenas, por lo que desconocemos aún la relación entre el metabolismo de poliaminas en esta clase de microorganismos y su tolerancia a agentes oxidantes. Con el fin de estudiar este aspecto en *Pto*, en este capítulo evaluamos el fenotipo de cepas perturbadas en la síntesis de poliaminas y exploramos las posibles conexiones entre estos compuestos y los mecanismos que subyacen a la respuesta al estrés oxidativo en esta especie.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.1 Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados en este capítulo.

Las cepas bacterianas utilizadas para la construcción de mutantes, así como los plásmidos y cebadores empleados son detallados en las **Tablas 3.1 y 3.2**.

Tabla 3.1. Cepas bacteriana y plásmidos utilizados a lo largo de este capítulo. Se detallan los nombres de las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este capítulo, con sus características más relevantes e indicando el origen de los mismos.

Cepas bacterianas	Características Relevantes	Origen o referencia
<i>Pto wild type (wt)</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Buell <i>et al.</i> (2003)
Δ <i>speA</i>	<i>Pto</i> con delección en marco del gen <i>speA</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speC</i>	<i>Pto</i> con delección en marco del gen <i>speC</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speE</i>	<i>Pto</i> con delección en marco del gen <i>speC</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speAΔ<i>speC</i></i>	<i>Pto</i> con delección en marco de los genes <i>speA</i> y <i>speC</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speE</i> (<i>speE</i>)	<i>Pto</i> Δ <i>speE</i> complementada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa el gen <i>speE</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speAΔ<i>speC</i> (<i>speA</i>)</i>	<i>Pto</i> Δ <i>speA</i> Δ <i>speC</i> complementada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa el gen <i>speA</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speAΔ<i>speC</i> (<i>speC</i>)</i>	<i>Pto</i> Δ <i>speA</i> Δ <i>speC</i> complementada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa el gen <i>speC</i>	Solmi <i>et al.</i> (2023)
<i>Pto</i> PkatG::GFPuv	<i>Pto wild type</i> transformada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa la fusión transcripcional PkatG::GFPuv	Solmi <i>et al.</i> (2023)
<i>Pto</i> PkatB::GFPuv	<i>Pto wild type</i> transformada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa la fusión transcripcional PkatB::GFPuv	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speE</i> PkatG::GFPuv	<i>Pto</i> Δ <i>speE</i> transformada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa la fusión transcripcional PkatG::GFPuv	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speE</i> PkatB::GFPuv	<i>Pto</i> Δ <i>speE</i> transformada con el plásmido pBBR1MSC-5 que expresa la fusión transcripcional PkatB::GFPuv	Solmi <i>et al.</i> (2023)
<i>Pto</i> roGFP	<i>Pto wild type</i> transformada con el plásmido pDSK-psbA-RBS-roGFP	Solmi <i>et al.</i> (2023)
Δ <i>speE</i> roGFP	<i>Pto</i> Δ <i>speE</i> transformada con el plásmido pDSK-psbA-RBS-roGFP	Solmi <i>et al.</i> (2023)
<i>Escherichia coli</i> One Shot® OmniMAX™ 2 T1R	Cepa competente, químicamente mejorada de <i>E. coli</i>	Invtrogen®

<i>Escherichia coli</i> S17 λ pir	<i>E. coli</i> que permite la movilización de plásmidos mediante conjugación dependiente de RP-4 y replicación de los plásmidos de la familia R6K (<i>incX</i>)	Simon <i>et al.</i> (1983)
Plásmidos	Características Relevantes	Origen o referencia
pBBR1MSC-5	Pequeño tamaño, de amplio espectro de hospedadores, resistencia a gentamicina (Gm ^R)	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pDSK-GFPuv	Estable y de amplio espectro de hospedador, alta expresión de GFPuv, resistencia a kanamicina (Km ^R)	Wang <i>et al.</i> (2007)
pFVP 25.1 roGFP	Pequeño tamaño, expresión constitutiva de roGFP en <i>Salmonella enterica</i> , resistencia a gentamicina (Gm ^R)	van der Heijden & Finlay, (2015)
pK18MobsacB	Pequeño tamaño, movilizable, sensible a sacarosa (sacB), resistencia a kanamicina (Km ^R)	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pBBR1MSC-5 <i>PkatB</i> ::GPFuv	Pequeño tamaño, de amplio espectro de hospedadores, expresión de GFPuv bajo el control del promotor de <i>katB</i> , resistencia a gentamicina (Gm ^R)	Solmi <i>et al.</i> (2023)
pBBR1MSC-5 <i>PkatG</i> ::GPFuv	Pequeño tamaño, de amplio espectro de hospedadores, expresión de GFPuv bajo el control del promotor de <i>katG</i> , resistencia a gentamicina (Gm ^R)	Solmi <i>et al.</i> (2023)
pDSK-GFPuv	Estable y de amplio espectro de hospedador, alta expresión de roGFP, resistencia a kanamicina (Km ^R)	Solmi <i>et al.</i> (2023)

Tabla 3.2. Cebadores implementados en este capítulo. Subrayado en la secuencia de cada cebador, se señala el sitio de corte reconocida por la enzima de restricción indicada en la columna derecha de la tabla.

ID	Secuencia	Sitio de corte de enzima de restricción
speA AF	AAC <u>GGATCC</u> GGGACCTCTGTGTGCATCG	<i>Bam</i> HI
speA AR	TGCCCTCAGGACGACAAGTATGTGCGTCGTACGGACATCGAGG	-
speA BF	ATGTCCGTACGACGCACATACTTGTGCTCCTGAGGGCACG	-
speA BR	GCA <u>AAGCTT</u> AGCCCCTTCTCCAAGTGCCT	<i>Hind</i> III
speA SeqA	GGATCGCTCAAGGACGATGT	-
speA SeqB	TCGGATTCAGCGAGTTCAGC	-
speC AF	TAAGCAG <u>AATTC</u> CTCGCTGGTCAGCATCAC	<i>Eco</i> RI
speC AR	AAAATTTACAGGTAGAACGAGGCGGTATCAATGACCACGA	-
speC BF	TCGTGGTCATTGATACCGCCTCGTTCTACCTGTAAATTTTCAGC	-
speC BR	<u>CTGCAG</u> GCAGGATGCGATGGTAATCAGGT	<i>Pst</i> I
speC SeqA	CAGGTCCTTGGGAAGGCA	-
speC SeqB	GCGGTTCAACTGAAGTAACC	-

speE-AF	TAAGCAGAATTCACCCGATTGATGCGCTCC	<i>EcoRI</i>
speE-AR	GTCTGTCAGTCGTTACTGGCCTGATAATCGCTCATGGGTAAGC	-
speE BF	ATGAGCGATTATCAGGCCAGTAACGACTGACAGAC	-
speE BR	CGAGTCGACTAACGCACCACCGGAAAGC	<i>Sall</i>
speE SeqA	GGCGCAACTATCCTAGCA	-
speE SeqB	CCATTGAACAGCGCTTCGA	-
GFPuv F	GGGGTACCAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC	<i>KpnI</i>
PromKatB F	CGGAATTCGACACTGTCATCTTCCTGC	<i>EcoRI</i>
PromKatB R	GGGGTACCATGAACCATGTGTCTGGACC	<i>KpnI</i>
PromKatG F	CGGAATTCGCGATCAGTTCGATGACTGC	<i>EcoRI</i>
PromKatG R	GGGGTACCCAGTTGACATGCTTGATACACC	<i>KpnI</i>
roGFP F	CCICTAGATTTAAGAAGGAGATATACAT	<i>XbaI</i>
roGFP R	GGCTGCAQTATTGTATAGTTCATCCATGCC	<i>PstI</i>
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	-
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	-
pK18 M13 R	AACAGCTATGACATGA	-

3.1.2 Medios de cultivos.

Los medios líquidos utilizados en este capítulo para el cultivo de bacterias fueron los medios LB (extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L), y M9 [sales M9 cuya composición es: 3 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de NaCl, 6,78 g/L de Na₂HPO₄ y 1 g/L NH₄Cl a pH 7,2; glucosa 0,4 % (p/v), MgSO₄ 2mM y CaCl₂ 0,1mM]. Como medio sólido para el crecimiento bacteriano se utilizó LB-agar (LB, agar 10 g/L). Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con rifampicina (50 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL para medios sólidos y 30 µg/mL para medios líquidos) o kanamicina (50 µg/mL).

3.1.3 Condiciones de cultivo y cuantificación de la tasa de crecimiento.

Las cepas de *Pto* fueron cultivadas a 28 °C de forma estática en medio sólido o bien en medios líquidos con agitación constante a 160 rpm (revoluciones por minuto), mientras que se modificó la temperatura a 37 °C para el caso de *E. coli*. Las curvas de crecimiento se obtuvieron cuantificando la absorbancia óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de cultivos de 200 µL en pocillos de placas multipocillo X96 utilizando el lector de microplacas híbrido multimodo *Synergy H1* (*BioTek Instruments, Inc.*).

3.1.3 Construcción de cepas mutantes de *Pto*.

Las cepas de *Pto* con deleciones en marco en los genes que codifican la arginina descarboxilasa (*speA*, PSPTO_4842), la ornitina descarboxilasa (*speC*, PSPTO_4572) y la espermidina sintasa (*speE*, PSPTO_2055), se construyeron siguiendo el método de doble recombinación homóloga descrito por Kvitko & Collmer (2011), utilizando el plásmido suicida pK18mobsacB. Para ello, las secuencias aguas arriba (fragmento A, ~ 1.000 pb) y aguas abajo (fragmento B, ~ 500 pb) de cada gen se amplificaron mediante PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad *HiFi* TransTaq® (TRANS) y los pares correspondientes de cebadores AF-AR y BF-BR (**Tabla 3.2 y Figura 3.1 A**). A continuación, ambos fragmentos se fusionaron por PCR utilizando los cebadores AF y BR para generar un fragmento de ~ 1.500 pb, el cual se insertó en pK18mobsacB mediante reacciones de restricción/ligación dando como resultado el cassette de deleción correspondiente. Este plásmido posteriormente se transformó en células competentes de *E. coli* OmniMAX™ (Invitrogen) mediante el método de choque térmico (**Figura 3.1 A, B y C**). Se usaron los cebadores M13-F y pK18M13-R para amplificar los fragmentos clonados y verificar su identidad mediante su secuenciación y comparación con la secuencia original. La transferencia de plásmido de *E. coli* a *Pto wt* se realizó mediante conjugación biparental utilizando la cepa *E. coli* S17-1 como donante. Las colonias de *Pto* transformadas se seleccionaron en placas de LB suplementadas con rifampicina y kanamicina en concentraciones adecuadas. Estas bacterias sufrieron un primer evento de recombinación por el cual el vector pK18mobsacB se insertó en el genoma mediante las secuencias de homología de la región A o de la región B (**Figura 3.1 D**). La contraselección se realizó en placas de LB suplementadas con rifampicina y 10 % (p/v) de sacarosa, la que implica un segundo evento de recombinación por el cual se libera el plásmido pK18mobsacB del genoma dejando una versión truncada del gen de interés (**Figura 3.1 E**). Luego se repicaron colonias individuales y se cultivaron en placas con la combinación de kanamicina y rifampicina o con rifampicina sola para comprobar la pérdida de resistencia a kanamicina. Las colonias seleccionadas se confirmaron mediante PCR utilizando el par de cebadores SeqA y SeqB (**Figura 3.1 F**). Para construir la mutante doble $\Delta speA\Delta speC$, se realizó la deleción de *speC* utilizando la mutante simple $\Delta speA$ como fondo genético.

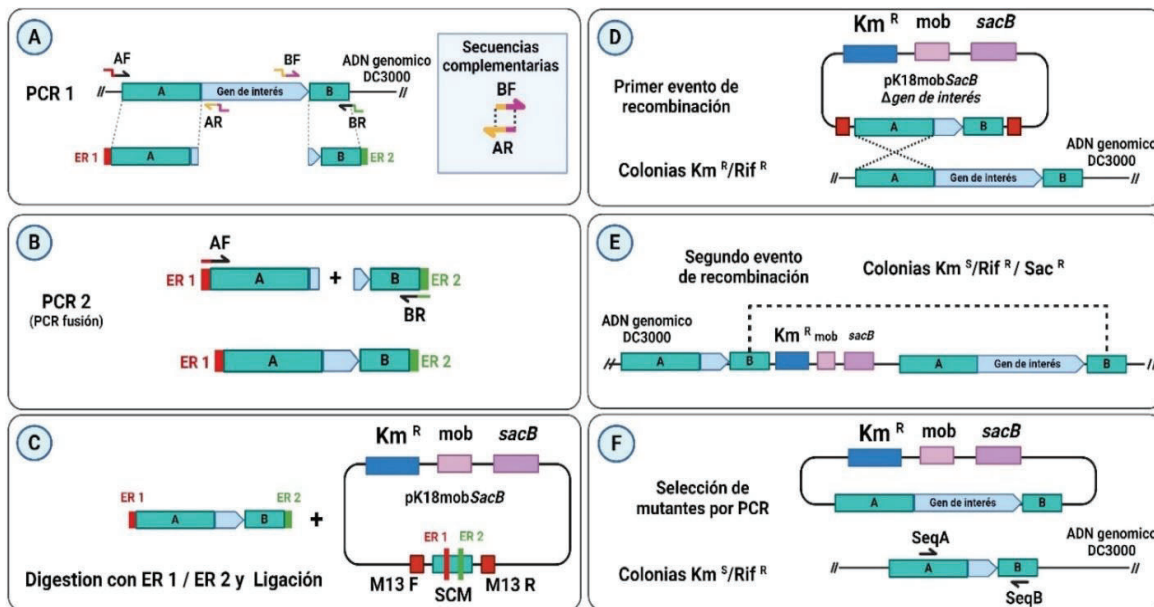


Figura 3.1. Representación esquemática del protocolo utilizado para la eliminación de genes de *Pto* en este estudio. Se encuentra una breve explicación de cada panel en la sección 3.2.3.

3.1.4 Extracción y cuantificación de poliaminas.

Las muestras de los cultivos bacterianos se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 min y se tomaron 60 µL del sobrenadante libre de células como muestra de la fracción de poliaminas extracelulares. Los sedimentos bacterianos se lavaron dos veces con buffer PBS 1X y finalmente se resuspendieron en 300 µL de la misma solución. Se agregaron 50 mg de perlas de vidrio (100 nm) y se lisaron las células mediante agitación vigorosa durante 45 s usando un disruptor celular (*Cell Disruptor Genie*, Scientific Industries, Inc, Bohemia, NY, EE. UU.). Luego, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 min y se recogieron 60 µL del sobrenadante para determinar la fracción de poliaminas intracelulares y 20 µL para la cuantificación de proteínas. La cuantificación de poliaminas se realizó mediante su derivatización con cloruro de dansilo. Para ello, se agregaron 4,6 µL de ácido perclórico al 70 % (v/v) para alcanzar una concentración final de 5 %, 6 µL de 1,7-diaminoheptano (100 µM) como estándar interno, 60 µL de Na₂CO₃ saturado y 75 µL de cloruro de dansilo (10 mg/mL en acetona), y la mezcla se incubó en la oscuridad a 55 °C durante 2 h. La reacción se detuvo añadiendo 25 µL de prolina (100 mg/mL) y los tubos se incubaron otros 30 min a 55 °C. Se extrajeron las poliaminas dansiladas en 200 µL de tolueno, fase que se evaporó al vacío. Los estándares de poliaminas se trataron de la misma manera que las muestras. Finalmente, las muestras de

poliaminas dansiladas se resuspendieron en 40 μ L de acetonitrilo puro y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como estándar.

3.1.5 Ensayo de tolerancia al H₂O₂.

Se cultivaron las cepas bacterianas correspondientes en LB a 28 °C durante 16 h en agitación, las que luego se lavaron mediante dos ciclos de centrifugación/resuspensión con buffer PBS 1X. Posteriormente, se utilizaron estas suspensiones celulares para inocular 5 mL de medio M9 hasta alcanzar una OD_{600nm} final de 0,1. Los cultivos se incubaron durante 18 h sin o con la adición de 2mM de PUT o ESPD y finalmente fueron centrifugados a 10.000 xg durante 5 min. Los pellets bacterianos obtenidos se lavaron en buffer PBS 1X y se resuspendieron en la misma solución a una OD_{600nm} igual a 0,12. Se colocaron alícuotas de 200 μ L de estas suspensiones celulares en tubos Eppendorf de 1,5 ml y posteriormente se agregaron 50 μ L de PBS 1X sin o con la adición de 10mM o 20mM de H₂O₂ para alcanzar concentraciones finales de 0mM, 2mM y 4mM, respectivamente. Las células se incubaron estáticamente a 28 °C durante 1 h. Transcurrido este período, las bacterias se lavaron con PBS 1X y se colocaron 5 μ L de diluciones seriadas (1/10) en placas de agar LB con rifampicina. Las unidades formadoras de colonias se determinaron luego de 48 h y los porcentajes de supervivencia se expresaron como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de células tratadas versus controles (sin adición de H₂O₂).

Por otro lado, también se utilizó el ensayo de zona de inhibición según lo descrito por Guo *et al.* (2012). Con este fin, las cepas bacterianas se cultivaron durante toda la noche a 28 °C en M9. Los cultivos se lavaron y resuspendieron en medio M9 fresco, se ajustaron a una OD_{600nm} igual a 0,3 y se mezclaron con agar al 0,4 % (p/v) a 50 °C en una proporción 1:10. Rápidamente, se colocaron 5 mL de la mezcla en placas que contenían 20 mL de medio M9 agarizado. Luego se colocaron discos de papel de 0,5 cm de diámetro en el centro de cada placa y se agregaron a cada uno 3 μ L de H₂O₂ al 10 % (v/v). Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron utilizando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.1.6 Atenuación de la capacidad oxidante del H₂O₂ mediada por poliaminas.

La posible atenuación de la capacidad oxidante del H₂O₂ mediada por las poliaminas se evaluó utilizando el kit de ensayo de peroxidasa/peróxido de hidrógeno Amplex® Red (Invitrogen™). Para ello, a distintos pocillos de una microplaca de 96 pocillos se les dispensaron 50 µL de solución de trabajo 1X de buffer de reacción/HRP conteniendo 10mM de H₂O₂. Luego, se agregaron 50 µL de buffer PBS 1X sin suplementar o suplementado con las poliaminas correspondientes hasta alcanzar concentraciones de 5, 50 o 200mM, y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La emisión de fluorescencia se determinó a 590 nm usando el lector de microplacas híbrido multimodo *Synergy H1* (BioTek Instruments, Inc.), mientras que la concentración de H₂O₂ se estimó usando una curva estándar según lo recomendado por el fabricante.

3.1.7 Determinación de actividad catalasa.

Para cuantificar la actividad catalasa se llevó a cabo el protocolo descrito previamente por Tondo *et al.* (2016) con modificaciones menores. Las cepas de *Pto* se cultivaron durante 18 h a 28 °C en M9, se lavaron y se resuspendieron en medio fresco. La OD_{600nm} se ajustó a 1,0 en un volumen de 5 mL y se añadió H₂O₂ hasta alcanzar concentraciones finales de 0, 0,25 y 0,5mM. Las células se incubaron durante 1 h, se recogieron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C, y se lavaron y resuspendieron en 250 µL de buffer fosfato de potasio (pH 7,0) a 4° C conteniendo PMSF 1mM. Posteriormente, se usaron perlas de vidrio (100 nm) para lisar las células como se describió anteriormente, y las suspensiones se clarificaron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se determinaron las concentraciones de proteínas en extractos celulares solubles mediante el método de Bradford y se monitoreó la actividad catalasa mediante la descomposición del H₂O₂ siguiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm. Los ensayos se realizaron a 25 °C en presencia de 10mM de H₂O₂, considerando un coeficiente de extinción de 43,6 M⁻¹ cm⁻¹ para calcular la actividad específica. Una unidad de actividad catalasa se definió como la cantidad de actividad necesaria para descomponer 1 µmol de H₂O₂ por minuto.

3.1.8 Evaluación de la estabilidad de la membrana externa.

Los ensayos de estabilidad de la membrana externa se realizaron según lo descrito por Yang *et al.* (2021). Así, los cultivos de células en M9 se ajustaron a una OD_{600nm} de 0,3 y se trataron con PUT o ESPD durante 1 h. Alternativamente, previo a la incubación con PUT o ESPD, algunas células fueron

tratadas con solución de HEPES 10mM y NaCl 1M (pH 7,4), para remover las poliaminas unidas a membrana. Las concentraciones evaluadas de suplementación fueron de 1mM (para las células lavadas), 2mM o 5mM. Después de la incubación con poliaminas, las muestras se lavaron con una solución de NaCl al 0,85 % (p/v) y se dividieron en dos alícuotas iguales de 500 μ L. Luego, a las diferentes fracciones se le agregaron 500 μ L de NaCl al 0,85 % (p/v) o de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1 % (p/v). Se determinó la disrupción celular mediante el monitoreo de la OD_{600nm} en intervalos de 5 min.

3.1.9 Construcción de fusiones transcripcionales y cuantificación de la actividad promotora *katG* y *katB*.

Las secuencias promotoras de los genes que codifican para las catalasas *katB* y *katG* de *Pto*, incluidos sus codones de inicio, se amplificaron utilizando los cebadores PromKatB F-R y PromKatG F-R (**Tabla 3.2**), respectivamente. La secuencia del gen GFPuv sin el codón ATG se amplificó utilizando los cebadores GFPuv-F y M13-F, utilizando el plásmido pDSK-GFPuv como molde. El tamaño esperado de los productos de amplificación se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) y las bandas se purificaron utilizando el kit *Easy Pure Quick Gel Extraction* (TRANS™). Posteriormente, se digirieron con *KpnI/EcoRI* (para el caso de los promotores) y *KpnI/PstI* (GFPuv) y se ligaron usando la ligasa T4 (TRANS™). Los fragmentos se clonaron en el plásmido pBBR1MCS-5 linealizado con *EcoRI/PstI* y se transformaron en células competentes *E. coli* OmniMAX. Se utilizó la conjugación biparental con *E. coli* S17 para transformar la cepa *wt* de *Pto* y sus mutantes derivadas.

Las bacterias transformadas con las diferentes versiones de pBBR1MCS-5 se cultivaron durante toda la noche a 28 °C en M9. Para evitar el desarrollo de sideróforos que emiten fluorescencia en la misma longitud de onda que la GFPuv, el medio se complementó con 50mM FeCl₃. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio fresco hasta una OD_{600nm} de 0,8. Luego, se dispensaron 100 μ L en los pocillos de una microplaca negra de 96 pocillos y se agregaron 100 μ L de M9 conteniendo 0mM, 4mM u 8mM de H₂O₂. Finalmente, la fluorescencia derivada de GFPuv (excitación, 410 nm; emisión, 508 nm) y los valores de OD_{600nm} después de 2 h de incubación se registraron utilizando un lector de microplacas híbrido multimodo *Synergy H1* (*BioTek Instruments, Inc.*). Se utilizaron bacterias transformadas con el plásmido pBBR1MCS-5 salvaje para estimar la señal de

fluorescencia de fondo y se calculó la intensidad de fluorescencia específica utilizando el método descrito por Eiamphungporn (2012) según la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia específica: } \frac{\text{(fluorescencia fusión transcripcional – fluorescencia plásmido vacío)}}{\text{OD}_{600\text{nm}}}$$

3.2.10 Expresión de roGFP en *P. syringae* y monitoreo del estado redox intracelular.

Se generó una nueva variante del plásmido pDSK-GFPuv, reemplazando la secuencia de GFPuv por roGFP. Brevemente, la secuencia de roGFP se amplificó con los cebadores roGFP-F/R (Tabla 3.2), utilizando el plásmido pFPV25-roGFP como molde. Por otra parte, se digirió con *Xba*I y *Pst*I el vector pDSK-GFPuv, para eliminar la secuencia de GFPuv. El tamaño esperado de los productos de amplificación se corroboró por electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (p/v), al igual que el vector pDSK (sin GFPuv) y las bandas se purificaron utilizando el kit *Easy Pure Quick Gel Extraction* (TRANS™). A continuación, se digirió con *Xba*I y *Pst*I el producto de amplificación purificado y finalizada la digestión enzimática, se inactivaron las enzimas mediante calor según especifica el proveedor. El vector y el inserto se ligaron usando ligasa T4 para generar el plásmido pDSK-roGFP. Finalmente, se transformaron células competentes *E. coli* OmniMAX con este plásmido y se empleó la conjugación biparental con *E. coli* S17 para introducirlo en las cepas de *Pto*.

La cuantificación del estado redox intracelular en tiempo real y el análisis de datos se realizaron como lo describen van der Heijden & Finlay (2015). Células cultivadas durante toda la noche en M9 suplementado con 50mM FeCl₃, se lavaron y resuspendieron en buffer PBS 1X ajustando su OD_{600nm} en 1,0. Se dispensaron 100 mL de esta suspensión en pocillos de placas negras multipocillo X96 y se agregaron 100 mL de buffer PBS 1X con 0, 5, 10 y 20mM de H₂O₂. Se cuantificaron los niveles de fluorescencia (405nm y 480nm de excitación, 510 nm de emisión) durante 30 min en el lector de microplacas híbrido multimodo *Synergy* H1 (BioTek Instruments, Inc.) en intervalos de 3 min durante 30 min. Se incluyeron tratamientos con 100mM H₂O₂ y 2mM de DTT para obtener los valores de máxima oxidación (IF_{OX}) y reducción (IF_{RED}) de roGFP, respectivamente. Además de esto, se determinaron los valores de OD_{600nm} en cada pocillo tanto al inicio como al final del experimento. En un mismo ensayo se utilizaron cepas transformadas con el vector pDSK-roGFP (IF) y cepas transformadas con el vector pDSK vacío para estimar los niveles de fluorescencia de fondo (IF_{BG}). Para cada intervalo de tiempo el estado redox intracelular se estimó realizando los siguientes cálculos:

$$\text{Intensidad de fluorescencia neta (IF}_{\text{NETA}}) = \frac{\text{IF}_{405 \text{ nm}} - \text{IF}_{\text{BG } 405 \text{ nm}}}{\text{IF}_{480 \text{ nm}} - \text{IF}_{\text{BG } 480 \text{ nm}}}$$

$$\text{IF normalizado (IF}_{\text{NOR}}) = 0,9 * ((\text{IF}_{\text{NETA}} - \text{IF}_{\text{RED}}) / (\text{IF}_{\text{NETA}} - \text{IF}_{\text{OX}})) + 0,1$$

3.2 RESULTADOS.

3.2.1 La concentración de PUT extracelular se ve incrementada en respuesta al estrés oxidativo.

Inicialmente, se investigaron los efectos de un entorno oxidativo sobre el crecimiento de *Pto* a los fines de seleccionar una concentración de trabajo de H_2O_2 adecuada. Para ello, las absorbancias ópticas de cultivos bacterianos creciendo en medio mínimo M9 en condiciones control, o con la adición de concentraciones crecientes de H_2O_2 se registraron durante 8 h. Como se muestra en la **Figura 3.2 A**, las concentraciones de H_2O_2 que se utilizaron retrasaron el inicio de la fase exponencial, pero luego la tasa de crecimiento de las células tratadas se recuperó y, finalmente, no se diferenció de la observada en la condición control. Intentamos discernir si este retraso se debe a un efecto bactericida o si está dado por acción bacteriostática del H_2O_2 . Para comprobarlo, evaluamos la supervivencia bacteriana después de su incubación en 2 y 4mM de H_2O_2 durante 1 h. Como puede observarse en la **Figura 3.2 B**, el tratamiento con 2mM de H_2O_2 disminuyó la supervivencia bacteriana en un 40 %, mientras que 4mM de H_2O_2 provocó una reducción considerablemente mayor en la viabilidad celular en comparación con el control. En función de estos resultados, se decidió utilizar la concentración de 2mM en ensayos posteriores. Estos resultados muestran que, si bien el estrés oxidativo provocado por H_2O_2 tiene un gran efecto bactericida, *Pto* cuenta con mecanismos apropiados para contrarrestarlo, permitiendo así su adaptación a estas condiciones estresantes y recuperar la tasa de crecimiento.

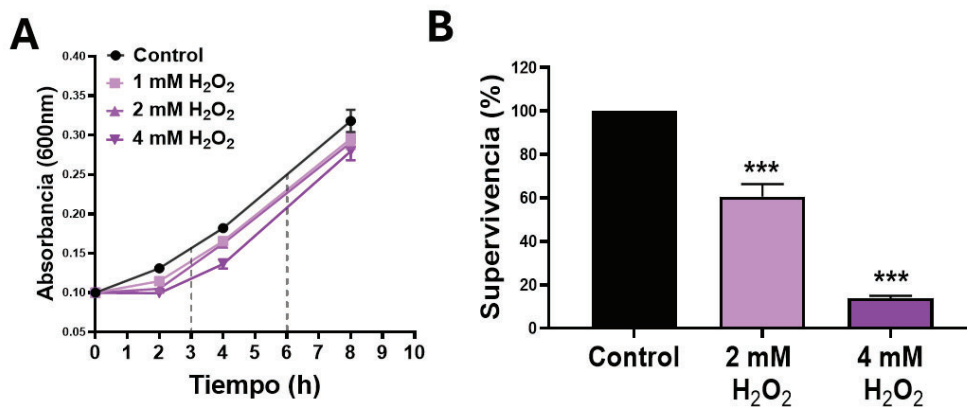


Figura 3.2. Tolerancia de *Pto* al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 . A) Efecto del H_2O_2 sobre el crecimiento de *Pto*. Las células fueron cultivadas en medio M9 en condiciones control y en presencia de

diferentes concentraciones de H_2O_2 . El crecimiento se registró periódicamente mediante la cuantificación de la absorbancia óptica a 600 nm de los cultivos. **B) Supervivencia de células de *Pto* a la exposición al H_2O_2 .** Las células fueron cultivadas en medio M9 durante 18 h, se lavaron 2 veces con buffer PBS 1X y se resuspendieron en la misma solución a una $OD_{600nm} = 0,2$. Las suspensiones celulares se incubaron durante 1 h en condiciones control o en presencia de H_2O_2 a concentraciones de 2 o 4mM. Después de este período, se determinaron las UFC y se expresaron como porcentaje de los valores obtenidos en cultivos control. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para las comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por triplicado, con resultados similares. Diferencias significativas entre el control y los tratamientos se muestran como: $***p < 0,001$.

Para investigar si la adaptación al estrés oxidativo se relaciona con un cambio en la homeostasis de poliaminas, se cuantificaron las concentraciones extracelulares e intracelulares de estos compuestos en células creciendo en condiciones control y tratadas con 2mM de H_2O_2 . No encontramos diferencias en el contenido intracelular de PUT y ESPD entre las células tratadas y aquellas cultivadas en condiciones control. Así, en ambos casos la PUT resultó ser la poliamina más abundante, y su concentración intracelular se redujo después de 6 horas de cultivo (**Figura 3.3**). Por su parte, si bien los niveles del ESPD fueron inferiores a los del PUT a lo largo del período analizado, siguieron un comportamiento similar. Sin embargo, al desafiar las células con H_2O_2 se observó una notable acumulación de PUT en el espacio extracelular, no así de ESPD que siempre se mantuvo en concentraciones bajas. Como resultado, especulamos que la secreción de PUT podría formar parte de un mecanismo de adaptación empleado por *Pto* para soportar ambientes oxidativos.

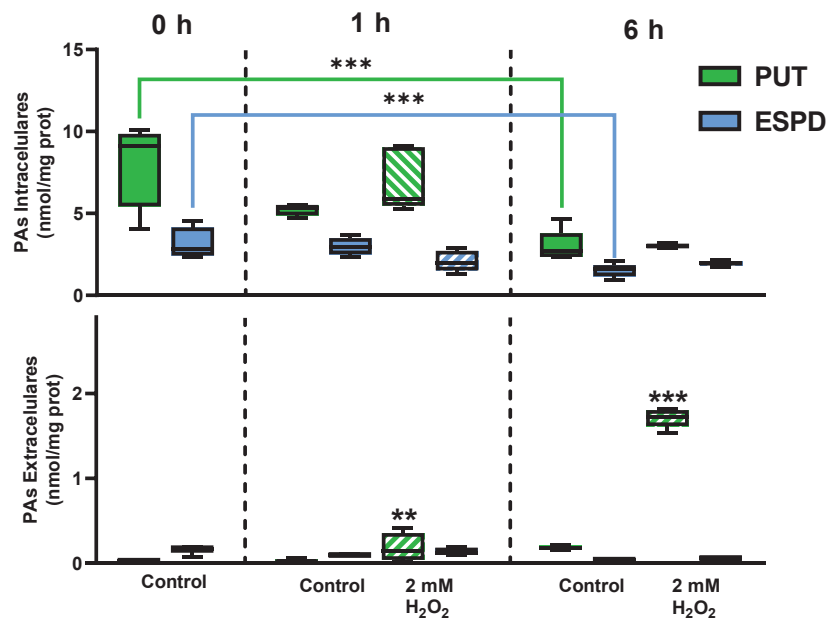


Figura 3.3. Concentración de poliaminas en las fracciones intra- y extracelulares de *Pto* en respuesta al estrés oxidativo. Las células se cultivaron durante 6 h en medio M9 en condición control o en el mismo medio suplementado con H₂O₂ a una concentración final de 2mM. Las concentraciones de poliaminas se determinaron en los espacios intracelulares **(A)** y extracelulares **(B)** como se describe en materiales y métodos (sección 3.2.4). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas entre el control y los tratamientos en un mismo tiempo, o entre distintos tiempos de cultivo (indicadas entre corchetes), se presentan como: ***p* < 0,01, ****p* < 0,001). Las barras correspondientes a valores de poliaminas en condiciones control se representan coloreadas completamente, mientras que las que pertenecen a células tratadas con un patrón de líneas. PAs, poliaminas.

Con el objetivo de estudiar en mayor profundidad la funcionalidad de las poliaminas cuando se encuentran en el espacio extracelular, evaluamos la supervivencia luego del tratamiento con H₂O₂ de células cultivadas previamente en medio mínimo M9 suplementado con PUT y/o ESPD. Mientras que la suplementación previa de PUT al medio de cultivo aumentó ligeramente la tolerancia bacteriana al H₂O₂, la adición de ESPD no mostró ningún efecto significativo (**Figura 3.4 A**). Cabe mencionar que ambas poliaminas se utilizaron en una concentración de 2mM, lo cual no tuvo un impacto en la tasa de crecimiento celular (**Figura 3.4 B**). En cambio, la adición de ambas poliaminas en simultáneo no mostró diferencias respecto al control, por lo que la ESPD atenuó el efecto protector mostrado por la PUT cuando esta se suplementó de forma individual. En función de estos resultados, puede especularse que la PUT puede atenuar por sí sola la capacidad oxidante del H₂O₂ (capacidad *scavenger*). Para corroborar este posible efecto, a continuación, analizamos la fluorescencia emitida por la sonda *Amplex Red* luego de su reacción con el H₂O₂, en presencia y ausencia de poliaminas, observando que tanto PUT como ESPD resultaron incapaces de prevenir la oxidación de este sustrato fluorescente (**Figura 3.3 C**). Por lo tanto, concluimos que otros mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo podrían estar mediados por las poliaminas presentes en el espacio extracelular.

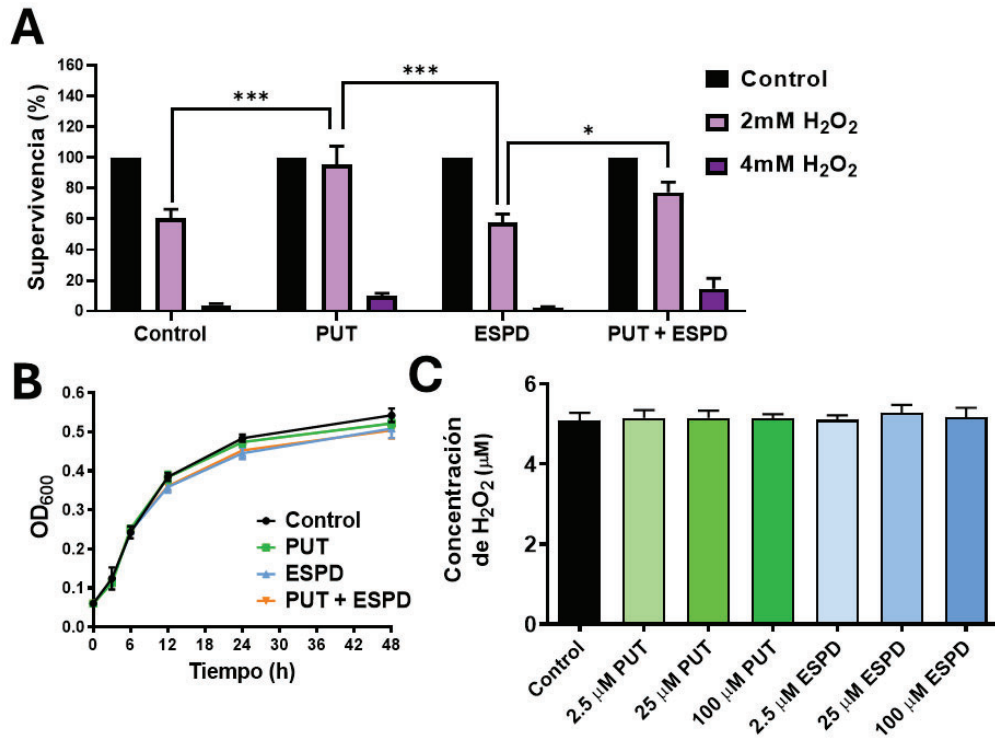


Figura 3.4. A) Efecto de la suplementación de poliaminas sobre la tolerancia al estrés oxidativo. Las células se cultivaron en medio M9 sin o con la suplementación de 2mM de PUT y/o ESPD durante 18 h. Luego de este período se lavaron 2 veces y se resuspendieron en PBS 1X hasta obtener una $OD_{600nm} = 0,2$. Las suspensiones celulares se incubaron durante 1 h en condiciones control o en presencia de H₂O₂ a una concentración final de 2 o 4mM. Después de este período, se determinaron las UFC y se expresaron los valores como porcentaje de aquellos obtenidos en los cultivos control. **B) Efecto de las poliaminas en el crecimiento de *Pto*.** Se cultivó *Pto* en medio M9 sin suplementar o suplementado con 2mM de PUT y/o ESPD. El crecimiento fue registrado periódicamente cuantificando la OD_{600nm} . **C) Capacidad atenuadora de las poliaminas de los efectos oxidativos del H₂O₂.** Se incubaron diferentes concentraciones de PUT y ESPD con 2mM de H₂O₂ en presencia de *Amplex Red* y peroxidasa de rabanito durante 15 minutos, y se determinó la fluorescencia remanente (Ex. 571 nm/Em 585 nm). En todos los casos, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por triplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas se presentan como: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

3.2.2 La perturbación de la síntesis de poliaminas genera fenotipos contrastantes respecto a la tolerancia al estrés oxidativo.

Para comprender en mayor profundidad el papel que desempeñan las poliaminas en la tolerancia al estrés oxidativo decidimos estudiar el fenotipo de diferentes cepas mutantes afectadas en la síntesis de PUT y ESPD. En este sentido, con el objetivo de interrumpir la producción de PUT

eliminamos los genes que codifican para la arginina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa generando las mutantes simples $\Delta speA$ y $\Delta speC$, respectivamente. Además, construimos una cepa doble mutante en la cual se eliminó el gen *speC* utilizando el fondo genético de la cepa $\Delta speA$, la cual denominamos $\Delta speA\Delta speC$. Por otro lado, la producción de ESDP se interrumpió eliminando el gen que codifica a la espermidina sintasa ($\Delta speE$). Las deleciones se corroboraron mediante PCR utilizando cebadores flanqueantes a los genes bajo estudio (**Figura 3.5 A**).

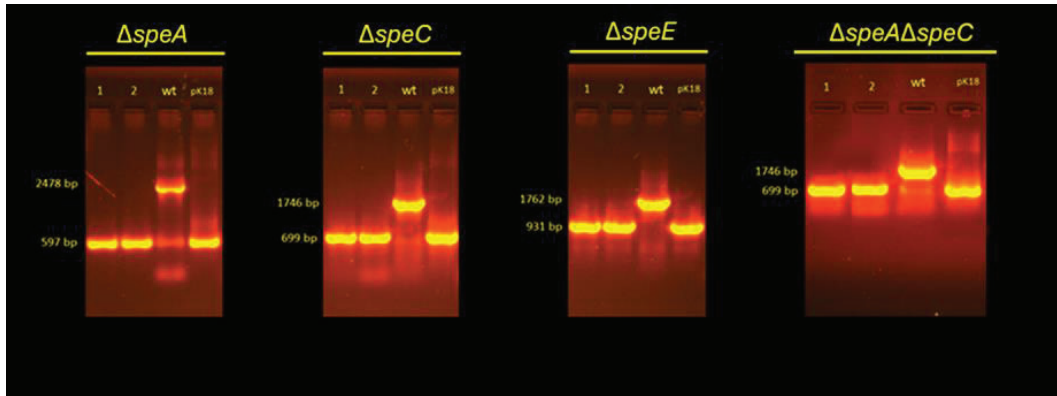


Figura 3.5 Confirmación de la deleción de genes que participan en la síntesis de PUT y ESDP en *Pto*. La figura muestra los productos de amplificación visualizados en geles de agarosa al 0,8 % (p/v), obtenidos mediante PCR utilizando los cebadores SeqA-B específicos para *speA*, *speC* y *speE* (ver **Tabla 2.1**). Como molde se utilizó ADN genómico de colonias seleccionadas entre las mutantes (calles 1 y 2 de cada panel), obtenidas según se detalla en la sección 3.2.3 de materiales y métodos. La cepa mutante $\Delta speA\Delta speC$ se obtuvo a partir de la deleción del gen *speC* utilizando $\Delta speA$ como fondo genético. En cada gel, se incluyó el producto de amplificación obtenido utilizando como molde ADN genómico de la cepa *wt* o el plásmido pK18*mobsacB* conteniendo los *cassettes* de deleción como controles. Los tamaños esperados para cada producto se detallan sobre el lateral izquierdo de cada gel.

Las deleciones únicas en los genes *speA* o *speC* no causaron ningún cambio significativo en comparación con la cepa *wt* de *Pto*, tanto en el contenido intracelular de poliaminas como tampoco en la tasa de crecimiento bacteriano y la tolerancia al estrés oxidativo (**Figura 3.6 A-C**). Por lo tanto, entendemos que los requerimientos de PUT pueden ser satisfechos en *Pto* mediante la descarboxilación de arginina (vía *SpeA*) u ornitina (vía *SpeC*), existiendo un mecanismo compensatorio si se interrumpe cualquiera de estas rutas alternativas.

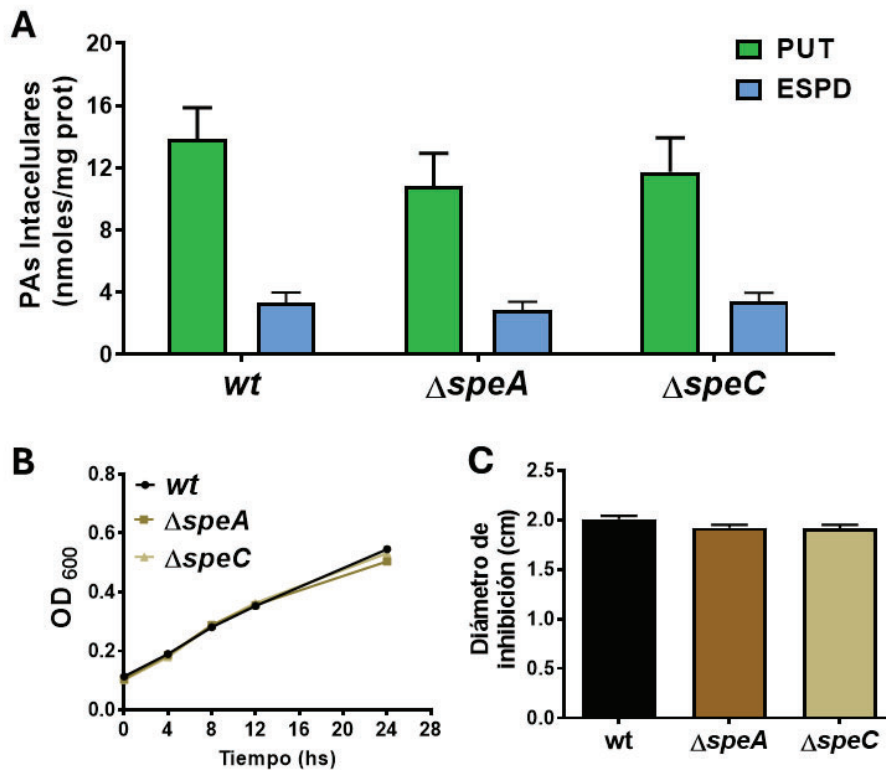


Figura 3.6. Efecto de la delección de los genes *speA* o *speC* en *Pto*. **A)** Concentraciones de poliaminas intracelulares en las cepas *wt*, $\Delta speA$ y $\Delta speC$ cuantificadas como se describe en la sección 3.2.4 de materiales y métodos. **B)** Crecimiento de las distintas cepas en medio M9, registrado según la absorbancia del cultivo a 600 nm. **C)** Tolerancia al estrés oxidativo de las cepas mutantes. En este caso se utilizó el diámetro del halo de inhibición generado por acción del H₂O₂ sobre el crecimiento bacteriano, como una estimación de la tolerancia, luego de 48 h de cultivo en placas con medio M9. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos realizaron por duplicado, con resultados similares.

Por su parte, la eliminación simultánea de los genes *speA* y *speC* ($\Delta speA\Delta speC$) resultó en una reducción significativa del crecimiento celular y niveles intracelulares muy bajos de PUT (**Figuras 3.7 A-B**). De manera contraintuitiva, encontramos que los niveles de ESPD eran comparables a los de la cepa *wt* a pesar de que esta mutante no debería poder sintetizar ESPD debido a la falta de su sustrato. Para explicar esta observación debe considerarse que la ESPD presente en la cepa $\Delta speA\Delta speC$ podría provenir de la absorción de este compuesto durante la preparación del inóculo en medio LB, el cual contiene poliaminas en su composición (Vilas *et al.*, 2018). Por otro lado, una explicación alternativa a este fenómeno podría consistir en la liberación de ESPD libre de la fracción que existe conjugada a compuestos orgánicos, o a la posibilidad de que *Pto* posea una vía diferente de biosíntesis de ESPD tal como se identificó previamente en *V. cholerae* (Lee *et al.*, 2009). A su vez,

la pérdida de gen *speE* redujo el contenido intracelular de ESPD, mientras que los niveles de PUT no se vieron afectados (Figura 3.7 B). Esta cepa muestra una tasa de crecimiento más baja en comparación con la cepa *wt*, pero mayor a la observada en la doble mutante (Figura 3.7 A).

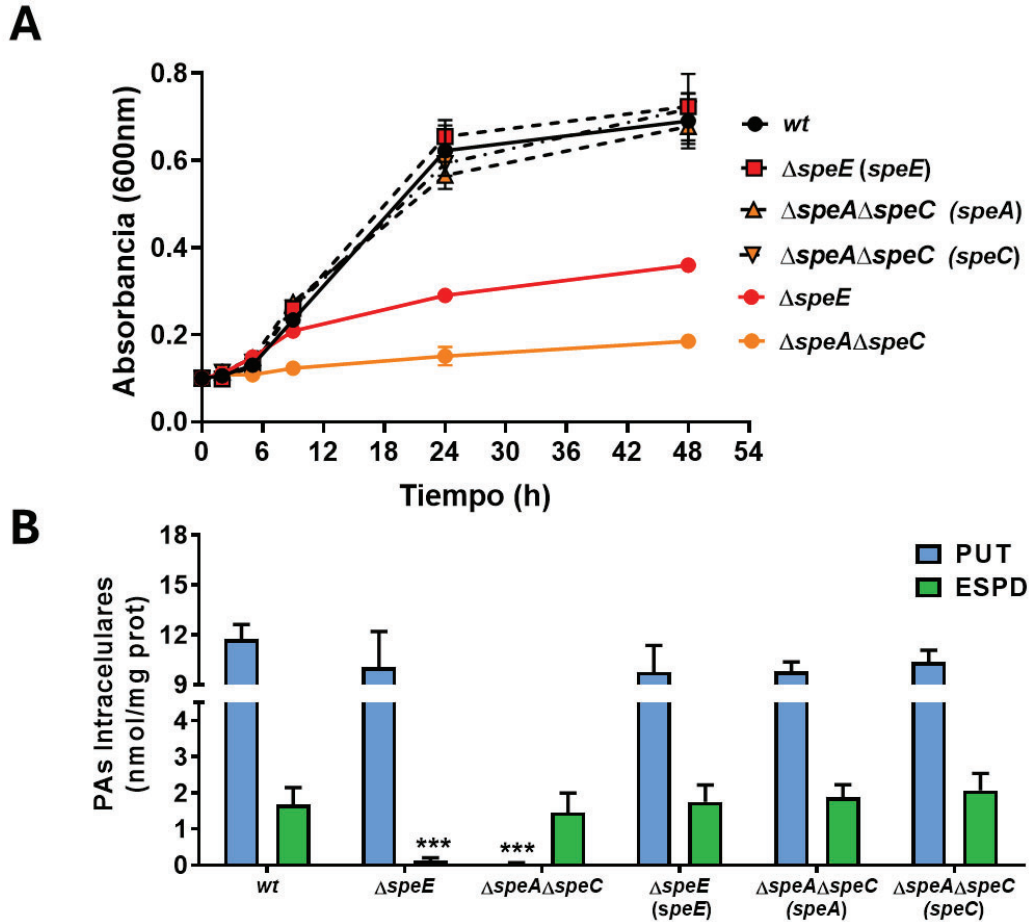


Figura 3.7. La interrupción de las vías de síntesis de PUT y ESPD en *Pto* impacta en el crecimiento y en el contenido de poliaminas. A) Curva de crecimiento de *Pto wt* y las cepas mutantes incapaces de sintetizar PUT ($\Delta speA\Delta speC$) o ESPD ($\Delta speE$) en medio mínimo M9. Se incluyó en este experimento a las cepas mutantes complementadas con los genes indicados utilizando el vector pBBR1MSC-5. El crecimiento de los cultivos se cuantificó a diferentes tiempos mediante la determinación de su absorbancia óptica a 600 nm. **B)** Concentración de PAs intracelulares en las células luego de 16 h de cultivo en medio mínimo M9. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 (A) y 5 (B) replicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas entre el contenido de poliaminas de las cepas mutantes o mutantes complementadas con la *wt* se presentan como: *** $p < 0,001$).

La suplementación de los medios de cultivo con PUT, a diferencia de la adición de ESPD, restableció parcialmente el crecimiento de la doble mutante (Figura 3.8). En cambio, la adición de ESPD (pero

no de PUT) al medio de cultivo de la cepa $\Delta speE$ restauró totalmente su crecimiento. Esto confirma la dependencia que tienen ambas cepas de las poliaminas mencionadas. Además, la complementación de la cepa doble mutante con un plásmido que expresa el gen *speA* o el *speC* restituyó completamente las concentraciones de poliaminas intracelulares y las tasas de crecimiento, lo que respalda la idea de que la presencia de cualquiera de las vías que producen PUT son suficientes mantener los niveles requeridos de esta poliamina (**Figura 3.7 A y B**). Por su parte, la mutante simple $\Delta speE$ complementada con un plásmido que expresa el gen *speE* demostró un contenido de poliaminas intracelulares similar al observado en la cepa *wt*, al mismo tiempo que restableció las diferencias observadas respecto al crecimiento. Considerando estos hallazgos en conjunto, concluimos que, si bien el crecimiento bacteriano parece depender en mayor medida de la concentración de PUT intracelular, ambas poliaminas serían necesarias para que este proceso se lleve a cabo. Es probable que PUT y ESPD realicen funciones específicas que no pueden ser totalmente reemplazadas entre sí.

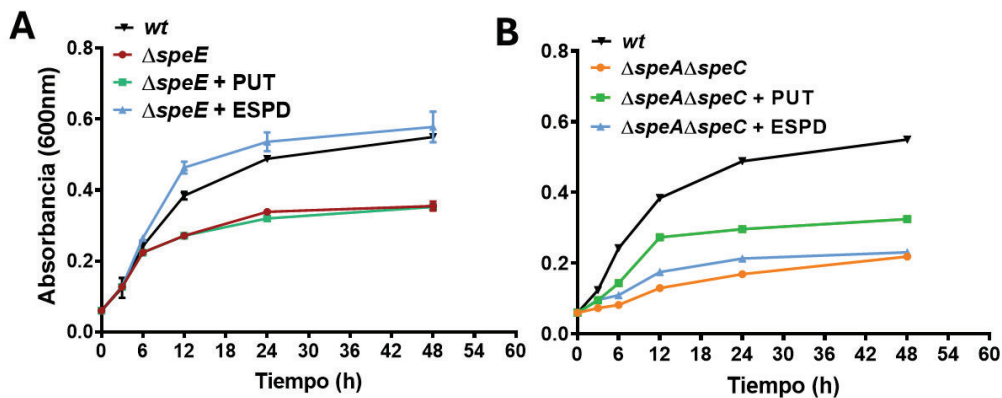


Figura 3.8. Efecto de la suplementación del medio de cultivo con poliaminas sobre el crecimiento de las cepas mutantes $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$. Se evaluó el crecimiento de *Pto wt* y las mutanes $\Delta speE$ (**A**) y $\Delta speA\Delta speC$ (**B**) en medio mínimo M9 y en medio mínimo suplementado con PUT o ESPD a una concentración final de 1mM. La cuantificación se realizó a diferentes tiempos midiendo la absorbancia óptica de los cultivos a 600 nm. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

Una vez evaluado el efecto de las mutaciones originadas en el crecimiento celular decidimos evaluar el fenotipo de las cepas mencionadas en cuanto a su tolerancia frente al estrés oxidativo. La doble delección en la cepa $\Delta speA\Delta speC$ confiere una alta sensibilidad al H_2O_2 , mostrando sólo un 20 % de supervivencia en los tratamientos con 2mM y prácticamente 0 % con 4mM de (**Figura 3.9**). Por su parte, la complementación de dicha cepa con los genes *speA* o *speC* restauró el

fenotipo *wt*, obteniéndose valores de supervivencia comparables. Sorprendentemente, la mutante Δ *speE* mostró un fenotipo donde se observa una mayor tolerancia al estrés oxidativo, obteniéndose valores de alrededor de 90 % de supervivencia para los tratamientos de 2mM y 4mM de H₂O₂ (**Figura 3.9**). De manera similar a lo observado en la cepa doble mutante, la complementación de esta cepa con un plásmido que expresa el gen *speE* demostró un fenotipo semejante al de la cepa *wt*.

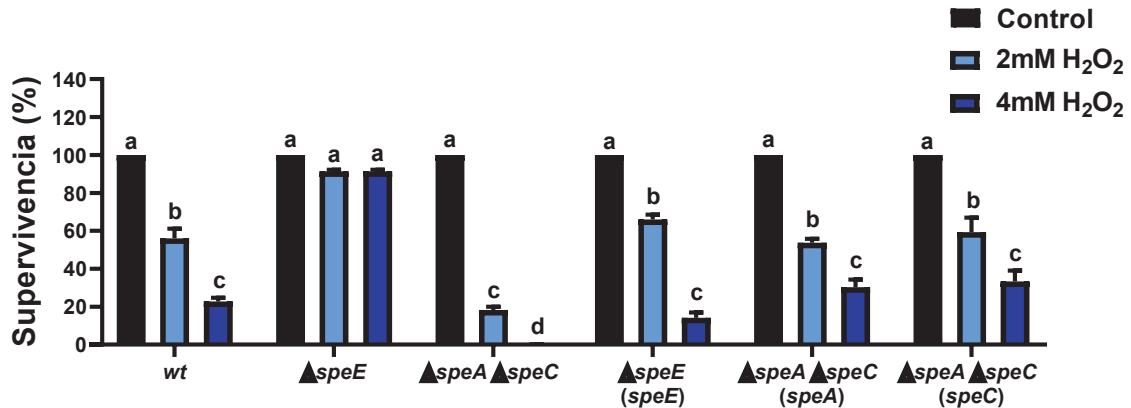


Figura 3.9. Tolerancia al estrés oxidativo de las cepas alteradas en la síntesis de PUT (Δ *speA* Δ *speC*) o ESPD (Δ *speE*). Las distintas cepas fueron cultivadas en medio M9 durante 18 h, luego de lo cual se lavaron las células 2 veces y se resuspendieron en PBS 1X hasta obtener una OD_{600nm} = 0,2. Las suspensiones celulares se incubaron durante 1 h en condiciones control o en presencia de H₂O₂ a una concentración final de 2 o 4mM. Después de este período, se determinaron las UFC y se expresaron como porcentaje de los valores obtenidos en los cultivos control. Los valores se analizaron estadísticamente mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por triplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas se indican con distintas letras (**p* < 0,05).

Para corroborar lo observado en los ensayos anteriores, llevamos a cabo el ensayo de inhibición del crecimiento y nuevamente observamos que la cepa Δ *speE* presenta una mayor resistencia al estrés oxidativo que la cepa *wt* y su versión complementada con el gen *speE* (**Figura 3.10 A**). Posteriormente, cuantificamos las poliaminas en esta cepa bajo condiciones de estrés oxidativo para verificar si el fenotipo observado se asocia a cambios en el contenido de estas. Es necesario señalar aquí que no incluimos la mutante Δ *speA* Δ *speC* dada su baja tasa de crecimiento en presencia de H₂O₂. Nuestros resultados demuestran que, tal como ocurre en la cepa *wt*, las fracciones intracelulares de PUT se mantienen en valores aproximadamente constantes en la mutante Δ *speE* en condiciones oxidativas, mientras que sus concentraciones extracelulares aumentan significativamente (**Figura 3.10 B**). Sin embargo, los contenidos extracelulares de PUT

fueron mayores en la cepa mutante con respecto a la *wt* tanto en condiciones control como en presencia de H₂O₂. Estos resultados sugieren que la interrupción en la síntesis de ESPD tendría un rol importante en la defensa contra el estrés oxidativo, ya sea como causa de la reducción intracelular del contenido de esta poliamina o bien por la consecuente acumulación de PUT en el espacio extracelular. En las próximas secciones evaluamos los posibles mecanismos implicados en este fenómeno.

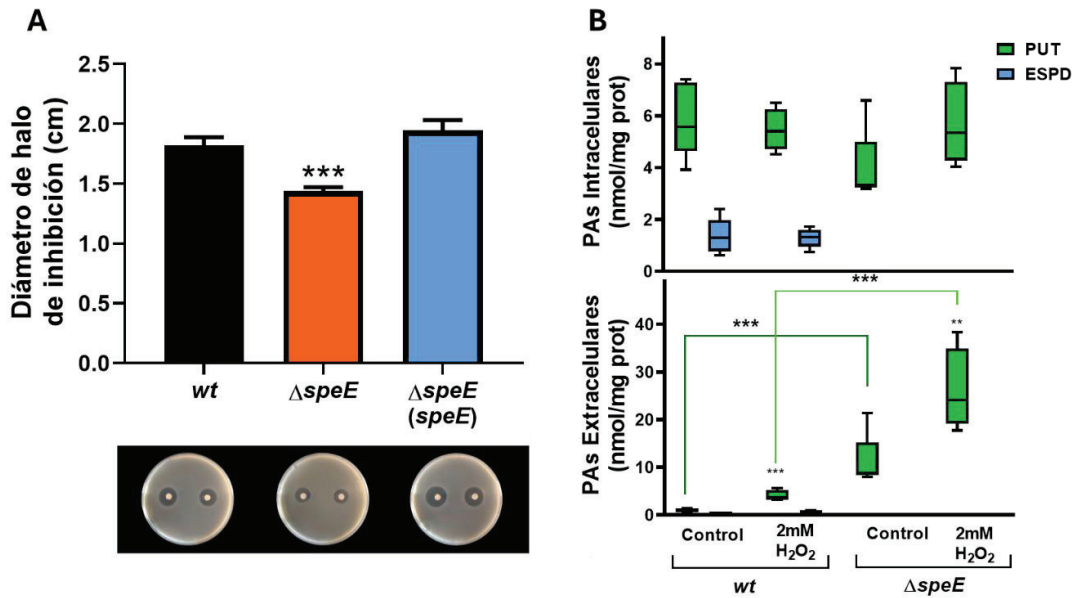


Figura 3.10. Respuesta al H₂O₂ por parte de la cepa deficiente en la síntesis de ESPD. **A)** Se determinó la tolerancia al estrés oxidativo de la cepa mutante $\Delta speE$ y su variante complementada con el gen *speE* en comparación a la cepa *wt* mediante la medición del diámetro de halo de inhibición generado por H₂O₂ sobre el crecimiento en placas de M9, luego de 48 h de cultivo. El panel **B)** muestra las variaciones en el contenido de poliaminas intra- y extracelulares en cultivos de *Pto wt* y $\Delta speE$ luego de 6 h de cultivo en M9 en ausencia o con el agregado de H₂O₂ a una concentración final de 2mM. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 (**A**) y 5 (**B**) réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas entre el control y los tratamientos con H₂O₂, o entre distintas cepas (indicadas entre corchetes), se presentan como: ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. PAs, poliaminas.

3.2.3 La mutante $\Delta speE$ presenta un aumento en la estabilidad de la membrana externa.

La permeabilidad y la integridad de la membrana celular son dos características que están estrechamente relacionadas. En relación a esto, se ha demostrado que las poliaminas pueden

sustituir los cationes Ca^{+2} y Mg^{+2} unidos a membranas, mejorando la estabilidad de la misma y modificando su permeabilidad, como también de protegerla del efecto de agentes oxidantes (Johnson *et al.*, 2012). Sobre esta base, planteamos la hipótesis de que el aumento del contenido extracelular de PUT podría ser responsable de la mejora de la tolerancia al estrés oxidativo observado en la mutante ΔspeE . Para corroborar esto, en primer lugar, comparamos los niveles de poliaminas adheridas a la membrana externa y la integridad de esta estructura en esta cepa con respecto a la cepa *wt*. Nuestro análisis mostró que las cantidades de PUT unida a la membrana externa de ΔspeE son similares a las observadas en la *wt*, mientras que, como es de esperar, no se registró la presencia de ESPD (**Figura 3.11 A**). Además de eso, la incubación de células *Pto wt* en presencia de PUT, ESPD o la combinación PUT + ESPD, no cambió la estabilidad de la membrana (**Figura 3.11 B**). Se obtuvieron los mismos resultados utilizando concentraciones de poliaminas más altas (hasta 5mM) o lavando las poliaminas unidas a la membrana con NaCl 1 M antes de su incubación en presencia de estos compuestos (**Figura 3.11 C-D**). Por lo tanto, es posible que la PUT en la superficie extracelular desempeñe un papel menor en relación a la estabilidad de la membrana externa y, en consecuencia, en la tolerancia al estrés.

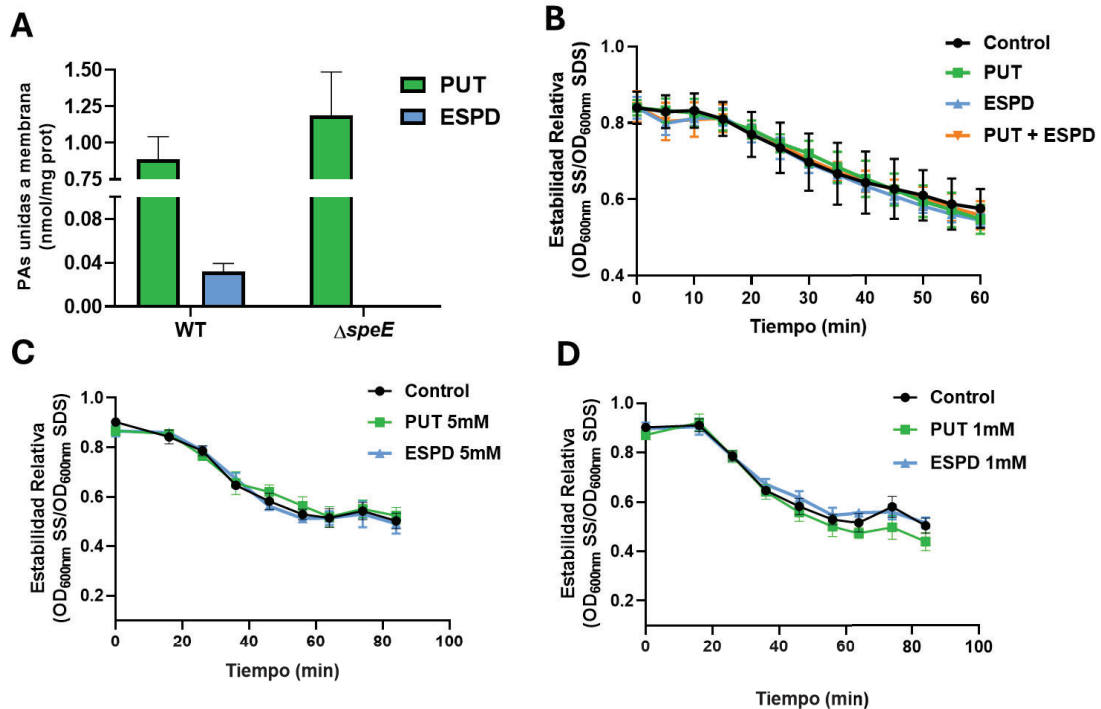


Figura 3.11. Efectos de las poliaminas sobre la estabilidad de la membrana externa. **A)** Las poliaminas unidas a membranas de *Pto wt* y ΔspeE se extrajeron lavando las células con una solución de HEPES 10mM y NaCl 1M (pH 7,4). La cuantificación de PAs se llevó a cabo tal como se describe en la sección 3.2.4. **B-C)**

Se cultivó *Pto* en medio M9 con PUT o ESPD, solas o combinadas, a una concentración final de 2mM (**B**) o 5mM (**C**) durante 1 h, y posteriormente se evaluó la estabilidad de las células en presencia de SDS. Para ello, finalizado el periodo de incubación, las células se lavaron y resuspendieron en solución de NaCl al 0,9 % o SDS al 0,1 % (p/v), y se registró la absorbancia óptica a 600 nm durante 60-80 min. La estabilidad de la membrana se expresa como la absorbancia de los cultivos en SDS en relación con la registrada en la solución salina. En **D** se siguió el mismo protocolo descrito en **B** y **C**, pero previamente las poliaminas unidas a la membrana externa fueron removidas utilizando la solución de lavado mencionada en **A**. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

Sin embargo, nuestros ensayos posteriores demostraron que la mutante $\Delta speE$ posee una mayor estabilidad de membrana en comparación a la cepa *wt* (**Figura 3.12**), mientras que la doble mutante $\Delta speA\Delta speC$ presentó un fenotipo de muy baja estabilidad. Este hallazgo, sumado a la descrito anteriormente, supone que la integridad de la membrana puede explicar, al menos parcialmente, la mayor tolerancia al estrés oxidativo observado en la mutante $\Delta speE$. A su vez, este mecanismo sería independiente de la PUT observada en el espacio exterior de las células. Por lo tanto, puede pensarse que la secreción de PUT consistiría en un mecanismo tendiente a modificar la concentración de esta amina en el espacio intracelular para favorecer la adaptabilidad a condiciones estresantes.

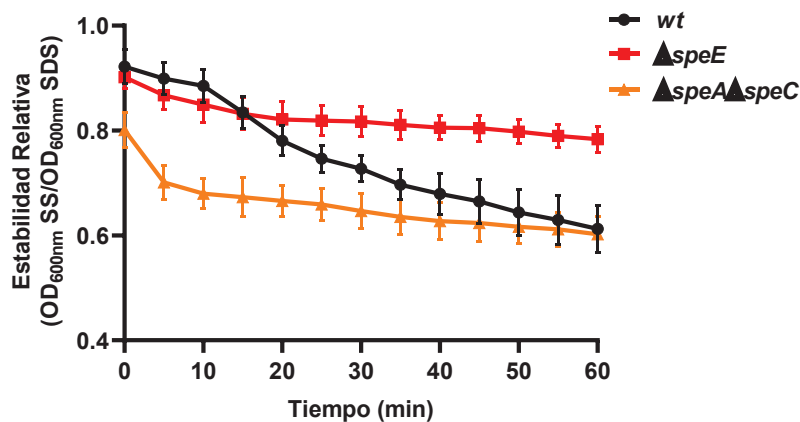


Figura 3.12. Efecto de la perturbación en la síntesis de poliaminas sobre la estabilidad de la membrana externa en *Pto*. El gráfico muestra el análisis de estabilidad de membrana en *Pto wt*, $\Delta speA\Delta speC$ y $\Delta speE$ siguiendo el protocolo utilizado en la **Figura 3.10B, C y D**. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

3.2.4 La perturbación de la síntesis de ESPD promueve un aumento en la actividad catalasa en *Pto*.

Se sabe que las células pueden evitar la citotoxicidad causada por las EROS mediante la producción de compuestos antioxidantes y enzimas degradativas. El tripéptido GSH es la principal molécula antioxidante en bacterias y es crucial para mantener el estado redox intracelular. Por lo tanto, si la inducción de un mecanismo dependiente de glutatión subyace a la mayor tolerancia al H_2O_2 en la mutante $\Delta speE$, esta cepa debería ser capaz de normalizar una modificación de su estado redox intracelular a una velocidad mayor que la cepa *wt*. Para probar esta posibilidad, exploramos las variaciones en el potencial redox citoplasmático en *Pto* expresando constitutivamente la variante roGFP sensible a redox, la cual cambia sus picos de excitación en función del estado de oxidación de dos residuos de cisteína específicos que dependen del potencial de la glutatión (Figura 3.13).

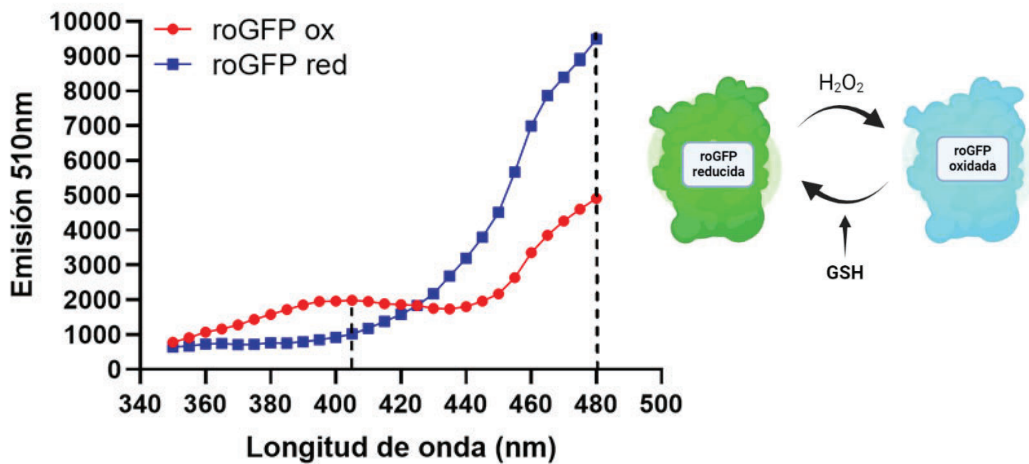


Figura 3.13. Uso de la fluorescencia relativa emitida por la proteína fluorescente roGFP para estimar el estado redox intracelular de *Pto*. Cultivos de células de *Pto* conteniendo el plásmido pDSK-roGFP fueron expuestos a 2mM de DDT (roGFP reducida) o 50mM de H_2O_2 (roGFP oxidada) y se cuantificaron los niveles de emisión de fluorescencia a 510 nm excitando con longitudes de onda de entre 350 a 480 nm. Las líneas de puntos indican las longitudes de onda seleccionadas para el monitoreo del estado redox *in vivo* (408 nm y 480 nm).

Nuestros experimentos demuestran que tanto la cepa *wt* como la mutante $\Delta speE$ fueron capaces de restaurar el equilibrio redox intracelular con la misma velocidad luego del tratamiento con H_2O_2 (Figura 3.14 A-B). Así, para las concentraciones 2,5mM, 5mM y 10mM de H_2O_2 , los tiempos transcurridos hasta alcanzar valores semejantes a los observados en las células sin tratar fueron 15, 18 y 25 min, respectivamente. Además, los valores de emisión más altos para cada tratamiento

de peróxido tampoco se diferenciaron entre cepas. Por lo tanto, concluimos que una modificación del potencial del glutatión no explica la mayor tolerancia al estrés en la cepa $\Delta speE$.

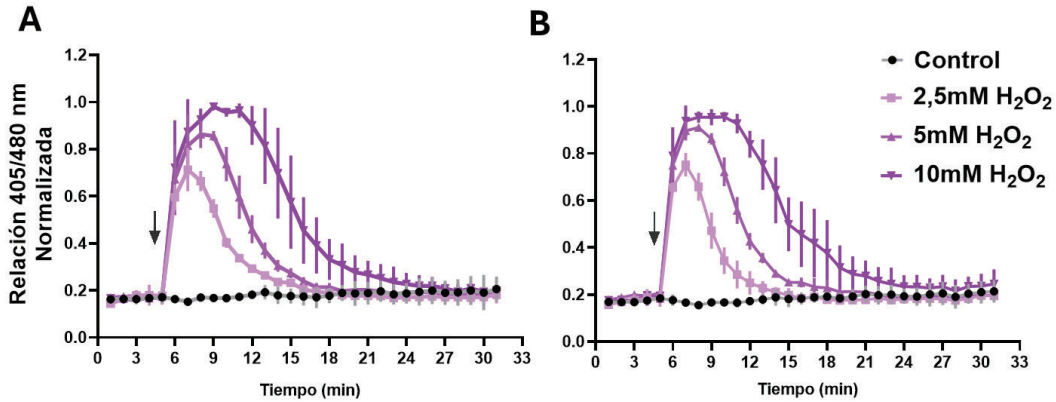


Figura 3.14. Monitoreo del estado redox intracelular de *Pto* en tiempo real durante la exposición a H_2O_2 . Cultivos de la cepa *wt* (A) y de $\Delta speE$ (B) que expresan la proteína roGFP se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 (las flechas indican el momento de adición de este compuesto) y se determinó la fluorescencia emitida a 510 nm utilizando 405 y 480 nm como longitudes de excitación. El estado redox intracelular se expresa como el cociente de los valores de fluorescencia obtenidos utilizando ambas longitudes. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

Por su parte, las catalasas promueven la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno, y constituyen el principal sistema enzimático antioxidante que participa en la protección de las células bacterianas contra el H_2O_2 . Para verificar la existencia de un mecanismo de regulación mediado por poliaminas que opera sobre estas enzimas, evaluamos la actividad catalasa en las cepas *wt* y mutante $\Delta speE$. Como se muestra en la **Figura 3.15**, ambas cepas responden al H_2O_2 con la inducción de actividad catalasa, aunque la mutante $\Delta speE$ exhibe niveles notablemente más altos, aún en condiciones basales. Estos resultados muestran que la reducción en la síntesis de ESPD da lugar a la inducción de la actividad catalasa.

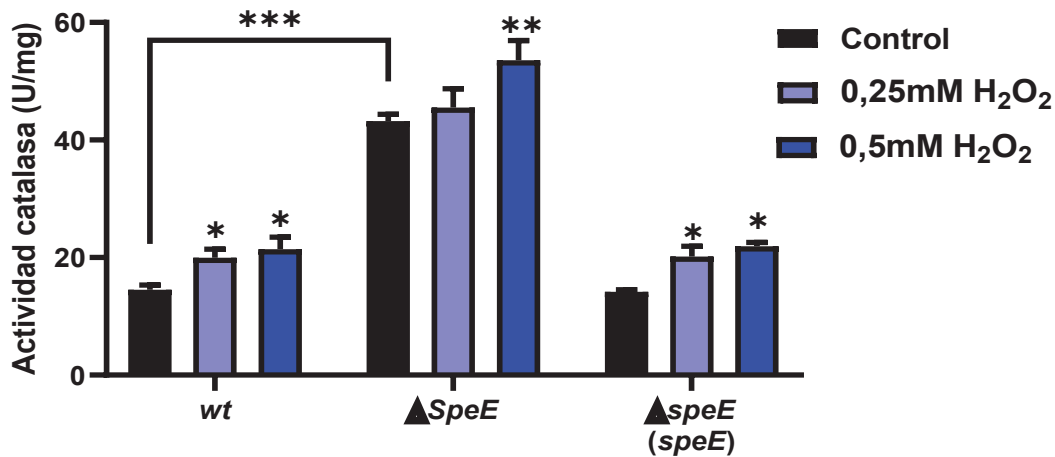


Figura 3.15. La interrupción de la vía de síntesis de ESPD en *Pto* modifica la actividad catalasa. Las células de la cepa *wt*, mutante $\Delta speE$ y la variante complementada con el gen *speE* fueron cultivadas en medio mínimo M9 y luego se expusieron a diferentes concentraciones de H₂O₂ por 1 h. La actividad catalasa se determinó en extractos celulares mediante la descomposición de H₂O₂ siguiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 4 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas entre el control y los tratamientos con H₂O₂, o entre distintas cepas (indicadas entre corchetes), se presentan como: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

Se han identificado tres catalasas en *Pto*, siendo los productos de los genes *katG* y *katB* las principales enzimas necesarias para hacer frente al estrés oxidativo. Para evaluar si la expresión de estos genes responde a poliaminas utilizamos fusiones transcripcionales que expresan la variante altamente fluorescente GFPuv bajo el control de los promotores de *katG* o *katB*. Nuestras investigaciones revelaron que tanto las actividades promotoras de *katB* como *katG* se inducen en la cepa *wt* en respuesta al H₂O₂, lo que respalda la idea de que estas enzimas participan en la degradación de este compuesto (**Figura 3.16 A**). Notablemente, la fluorescencia derivada de las construcciones *katB*::GFPuv o *katG*::GFPuv fue mayor en la mutante $\Delta speE$ en comparación con la cepa *wt* en todas las condiciones. Además, la incubación de las células mutantes en H₂O₂ no promovió una inducción adicional de la actividad del promotor *katG*, aunque si se observó una inducción de *katB*. Estos resultados indican que la expresión basal de estas enzimas es mayor cuando se interrumpe la síntesis de ESPD, lo que concuerda con el fenotipo observado.

A continuación, evaluamos si la suplementación con poliaminas ejerce un efecto sobre la emisión de fluorescencia derivada de estas construcciones con la finalidad de evidenciar si existe un

mecanismo regulador por parte de estas moléculas que opera sobre la expresión de catalasas. Este experimento muestra que la fluorescencia proveniente de *katB*::GFPuv y *katG*::GFPuv se reduce en la mutante Δ *speE* en presencia de ESPD, mientras que la adición de PUT no tuvo ningún efecto sobre las actividades de las construcciones reporteras (**Figura 3.16 B**). Además, la adición de poliaminas a la cepa *wt* no cambió la fluorescencia emitida. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la ESPD afecta negativamente la expresión de catalasas y explicaría, junto con la mayor estabilidad de membrana, el fenotipo tolerante observado en la cepa Δ *speE*.

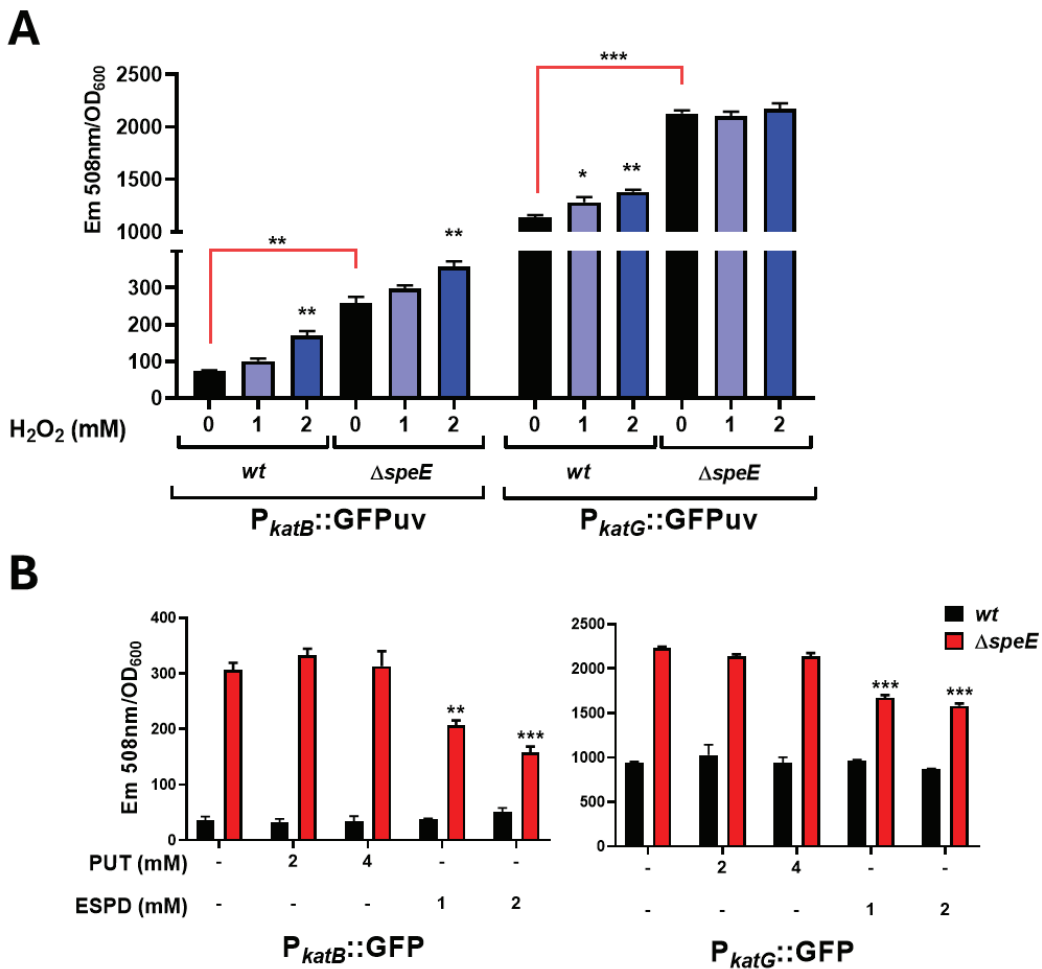


Figura 3.16. Actividad de los promotores de las catalasas *katG* y *katB* en *Pto* en respuesta a H₂O₂ y poliaminas. A) Las células de *Pto* *wt* y Δ *speE* expresando la proteína GFPuv bajo el control de los promotores *PkatG* o *PkatB* se expusieron a diferentes concentraciones de H₂O₂ y se determinó la emisión de fluorescencia luego de 2 h (excitación a 410 nm, emisión a 508 nm). Se utilizó el mismo enfoque en **B)**, pero las células fueron cultivadas en este caso en presencia de poliaminas a las concentraciones indicadas. El análisis

estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares. Las diferencias significativas entre el control y los tratamientos con H₂O₂, o entre distintas cepas (indicadas entre corchetes), se presentan como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3 DISCUSIÓN.

Numerosos estudios demuestran una estrecha conexión entre los cambios en las concentraciones celulares de poliaminas y diferentes mecanismos que regulan la fisiología celular en respuesta a estímulos internos y externos (Michael, 2016). En bacterias, el conocimiento actual indica que tanto las poliaminas intracelulares como las extracelulares contribuye a la activación de este tipo de respuestas, aunque la funcionalidad de cada una de estas fracciones puede ser diferente. Así, trabajos utilizando *E. coli* como modelo de estudio han demostrado que las poliaminas intracelulares participan de la síntesis proteica facilitando el ensamblaje de las subunidades ribosómicas 30S, promueven a nivel transcripcional la expresión de diferentes proteínas implicadas en el crecimiento y contribuyen a los ajustes de la pH citoplasmático (Igarashi & Kashiwagi, 2018; Michael, 2018; Souzu, 1986). A su vez, las poliaminas extracelulares participan en procesos como la comunicación entre células en *D. zea* (Shi *et al.*, 2019) y la estabilización de membranas celulares en varias especies bacterianas (Dela Vega & Delcour, 1996; Johnson *et al.*, 2012; Katsu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2020; van der Heijden *et al.*, 2016). Por lo tanto, se requiere una modulación precisa tanto de las concentraciones intra como de las extracelulares de poliaminas para asegurar la adaptación de las bacterias a la amplia variedad de condiciones ambientales que encuentran a lo largo de su ciclo de vida. En relación a esto, los resultados de co-expresión en *P. syringae* presentados en el **Capítulo II** de este trabajo de tesis demuestran un gran número de relaciones, tanto positivas como negativas, entre genes del metabolismo de poliaminas y genes que participan en una amplia variedad de funciones relevantes para la fisiología bacteriana y su virulencia. Asimismo, observamos que bacterias expuestas a estrés oxidativo modificaban la expresión de varios genes relacionadas a la homeostasis de estas aminas, particularmente los genes involucrados de su síntesis. En vista de estos hechos, en este capítulo nos hemos centrado en evaluar en profundidad la ruta biosintética de poliaminas en *Pto* y su relación con la respuesta al estrés oxidativo.

En una primera instancia, estudiamos la resistencia de *Pto* al H₂O₂ utilizando cultivos *in vitro* en medio mínimo M9. Las concentraciones de H₂O₂ utilizadas en este experimento retrasaron el inicio de la fase de crecimiento exponencial de la bacteria en función de una reducción de la supervivencia celular, aunque no tuvieron ningún impacto perceptible en la tasa de crecimiento luego de superar ese punto. Esto demuestra el gran potencial que posee *Pto* en desplegar mecanismos de tolerancia con el fin de evitar los efectos negativos provocados por el H₂O₂. Esta característica es sumamente importante para la patogenicidad de *Pto*, dado que cepas mutantes afectadas en la metabolización

del H₂O₂ muestran una menor capacidad de crecer y causar enfermedad en *A. thaliana* (Guo *et al.*, 2012; Ishiga & Ichinose, 2016). De hecho, esta cepa bacteriana comparte una tolerancia similar al H₂O₂ a la observada en *E. coli* y *Pa* (Jung *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2020), las que pueden soportar concentraciones relativamente más altas de este compuesto en comparación con otras especies bacterianas tales como *Salmonella enterica* (X. Liu *et al.*, 2020) y *P. putida* (Bojanovic *et al.*, 2017).

Las principales poliaminas encontradas en cultivos de *Pto* en medio mínimo M9 fueron PUT y ESPD, y al igual que lo reportado para *E. coli*, la triamina PUT es más abundante (Cohen, 1998). Por su parte, la detección de otras poliaminas como CAD o DAP no fue consistente a través de las muestras analizadas y, cuando se encontraron, estuvieron presentes en muy bajas concentraciones (datos no mostrados). Por otro lado, no se encontró ESPM en ninguna de las muestras, indicando que esta poliamina no es sintetizada por *Pto* al igual que la mayoría de las bacterias (Shah & Swiatlo, 2008). Las concentraciones internas de PUT y ESPD se redujeron después de 6 h de cultivo en medio M9, mientras que se detectaron pequeñas cantidades de la primera en el medio extracelular. Curiosamente, aunque las cantidades intracelulares de poliaminas no se modifican en respuesta al H₂O₂, se observó un incremento notable en la PUT extracelular, indicando que existe una inducción de su síntesis y/o de sus mecanismos de secreción. La ocurrencia de este fenómeno ha sido reportada anteriormente en cultivos de *E. coli* en respuesta al estrés oxidativo (Tkachenko *et al.*, 1999), si bien no se exploró su contribución a la tolerancia al estrés.

Sobre esta base, hipotetizamos que la homeostasis de poliaminas en *Pto* es necesaria para hacer frente a los efectos perjudiciales causados por el estrés oxidativo. Para corroborar esto, exploramos el fenotipo de cepas perturbadas en la síntesis de PUT ($\Delta speA$, $\Delta speC$ y $\Delta speA\Delta speC$) y ESPD ($\Delta speE$). La eliminación de los genes *speA* o *speC* de forma individual no tuvo un impacto significativo sobre la proliferación celular o en los niveles de poliaminas, lo que demuestra que la bacteria puede suplir los requerimientos de esta poliamina mediante una u otra vía. Esto también fue observado para *E. coli* y *Pa* donde ambas vías operan simultáneamente contribuyendo a la producción de PUT (Hafner *et al.*, 1979; Nakada & Itoh, 2003). Asimismo, las cepas $\Delta speA$ y $\Delta speC$ mostraron una tolerancia similar al H₂O₂ que la exhibida por la cepa *wt*. Sin embargo, la eliminación combinada de ambos genes en una misma cepa resultó en una disminución significativa de la concentración de PUT intracelular y de la tasa de crecimiento. El crecimiento de la cepa $\Delta speA\Delta speC$ se restableció completamente mediante la expresión de los genes *speA* o *speC*, y parcialmente con la suplementación de PUT en el medio de cultivo, no obstante, el agregado de ESPD al medio no tuvo efecto sobre el crecimiento. Por su parte, la ausencia del gen *speE* dio lugar

a contenidos notablemente más bajos de ESPD intracelular, acompañados de concentraciones de PUT que no se diferenciaron de los observados en la cepa *wt*. Al mismo tiempo, esta mutación tuvo un impacto relativamente menor en el crecimiento en comparación a la cepa *wt*. En este caso, el crecimiento se recuperó completamente con el agregado de ESPD al medio o bien expresando el gen *speE*, pero la suplementación de PUT no tuvo ningún efecto sobre este parámetro. En función de lo descrito concluimos que, aunque ambas poliaminas ayudan a sostener el desarrollo bacteriano, cada una de ellas podría desempeñar funciones importantes y particulares que no pueden ser reemplazadas por la otra. Las diferencias observadas en cuanto a la respuesta de $\Delta speA\Delta speC$ y $\Delta speE$ a la suplementación externa con poliaminas podrían deberse a dos motivos principales: diferencias en los requerimientos nutricionales de estas poliaminas y/o la capacidad de incorporación de estas. Así, es posible que los requerimientos de PUT sean altos para sostener una tasa de crecimiento óptima y, por lo tanto, no puedan ser satisfechos solo mediante su incorporación. La otra explicación debería contemplar los transportadores de membrana, pudiendo ser estos más eficientes en la incorporación de ESPD en comparación a la PUT. Esta última hipótesis se sustentaría en la observación realizada en el **Capítulo II**, donde se mencionó que en *Pto* probablemente la incorporación de ESPD puede ser llevada a cabo por los transportadores PotABCD y SpuEDFGH y que, en cambio, la PUT solo podría ser incorporada por este último.

Resulta interesante la mayor tolerancia al H_2O_2 demostrada por la cepa $\Delta speE$, lo que contrasta con la susceptibilidad exhibida por la doble mutante $\Delta speA\Delta speC$. Este hallazgo tiene un peso importante como herramienta para entender la relación entre poliaminas y estrés oxidativo, ya que es la primera mutante en un gen relevante para la síntesis de poliaminas que presenta un fenotipo de mayor resistencia al estrés en comparación a la cepa *wt*. Un examen adicional de los cambios en el contenido de poliaminas en respuesta al estrés oxidativo en esta mutante indicó que las concentraciones intracelulares de PUT no se modificaron, tal como se observó en la cepa *wt*. En cambio, se encontraron niveles más altos de esta poliamina en el espacio extracelular tanto en condiciones de crecimiento control como bajo estrés oxidativo. La PUT observada en el sobrenadante de cultivos de $\Delta speE$ en condiciones control podría deberse a un proceso inducido por la bacteria para evitar su acumulación intracelular debido a la ausencia de la ruta que permite su metabolización a ESPD. Es posible, entonces, que tanto la perturbación de la síntesis de ESPD como la secreción de PUT facilitarían los mecanismos asociados a la respuesta antioxidante.

El aumento en la estabilidad o permeabilidad de las membranas en bacterias gram-negativas es un mecanismo importante para soportar distintas condiciones de estrés. Por ejemplo, bacterias como

S. typhimurium modulan la permeabilidad de la membrana externa para superar las condiciones oxidativas impuestas por el H₂O₂ (Chautrand *et al.*, 2022; van der Heijden *et al.*, 2016). Esto ha llevado a posicionar distintos fármacos que afectan la integridad de membrana como posible blanco terapéutico (Dam *et al.*, 2018; Rosas & Lithgow, 2022). Por otro lado, Johnson *et al.* (2012) demostraron que la PUT y la ESPD refuerzan la membrana externa de *P. aeruginosa* al desplazar iones divalentes, y que la ESPD en particular tiene la capacidad de proteger esta estructura contra péptidos antimicrobianos y peroxidación lipídica. Para discernir si las fracciones externas de poliaminas cumplen funciones similares en *Pto*, examinamos el efecto de la suplementación de poliaminas a los medios de cultivo sobre la estabilidad de la membrana. Nuestros resultados demuestran que el agregado de PUT, ESPD o la combinación de ambas a cultivos de la cepa *wt* en M9 no modifican la estabilidad de membrana. Incluso las células previamente lavadas con NaCl 1 M (con el fin de separar las poliaminas unidas a membranas) no mostraron alteración en cuanto a este parámetro. De manera interesante, la mutante $\Delta speE$ mostró una mayor estabilidad en comparación con la cepa *wt*. Este fenotipo no puede explicarse sobre la base de un incremento en los niveles de PUT adherida a las membranas, dado que se encontraron niveles idénticos de la fracción unida a esta estructura entre $\Delta speE$ y la cepa *wt*. Por lo tanto, concluimos que el efecto provocado por la delección del gen *speE* sobre la integridad de la membrana no depende de los mayores contenidos de PUT encontrados extracelularmente, sino que es una consecuencia de la reducción en los niveles intracelulares de ESPD que podrían afectar la expresión de diversos genes que participan en su estabilización.

Estas conclusiones parecen contradecir nuestro hallazgo de que la suplementación con PUT favorece la supervivencia celular en presencia de H₂O₂. Sin embargo, se debe considerar la posibilidad de que los efectos observados por la adición de poliaminas a los medios de cultivo no se deban a sus funciones extracelulares sino a su incorporación y los efectos internos que pueden tener sobre la fisiología celular. Esta hipótesis debería corroborarse mediante el uso de cepas afectadas en el transporte de poliaminas o bien analizando si la suplementación de poliaminas modifica de forma significativa la expresión de los genes relacionados a la respuesta al estrés oxidativo. También demostramos que las poliaminas no tienen la capacidad de atenuar directamente los efectos oxidantes del H₂O₂, lo que sugiere que los niveles externos de PUT desempeñan un papel menor en la defensa directa contra el estrés oxidativo. El rol de las poliaminas como *scavengers* de radicales libres ha sido reportado anteriormente por lo que consideramos que futuras investigaciones en torno a esta temática serán necesarias para establecer un modelo

unificado (Ha *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 1992a; Khan, *et al.*, 1992b; Liu *et al.*, 2023; Stewart *et al.*, 2018).

Otro mecanismo importante asociado con la tolerancia al estrés oxidativo, es la capacidad de metabolizar o reducir la toxicidad de las EROS. Esto implica la producción de sustancias que contienen tioles como el GSH y enzimas antioxidantes que normalmente trabajan de forma cooperativa para mantener el equilibrio redox interno de la célula (Fones & Preston, 2012; Ku & Gan, 2021). En concordancia, se ha reportado que la PUT estimula en *E. coli* la expresión de los genes de la cisteína-glutamato ligasa (*gshA*) y de la catalasa *katG*, enzimas claves implicadas en el anabolismo del GSH y la degradación de H₂O₂, respectivamente (Sakamoto *et al.*, 2015; A. G. Tkachenko & Nesterova, 2003). Debido a esto, planteamos la hipótesis de que la eliminación de *speE*, con la consiguiente reducción de las concentraciones intracelulares de ESPD, podría implicar la inducción de alguno de estos componentes del sistema antioxidante en *Pto*. Nuestros experimentos descartaron que la mayor tolerancia al estrés oxidativo observada en Δ *speE* se encuentre mediada por la participación de GSH en el sistema antioxidante. Así, utilizando una construcción que expresa como biosensor la proteína fluorescente roGFP (cuyas fracciones reducidas/oxidadas dependen de la relación de GSH/GSSG), observamos que las cepas *wt* y mutante fueron igualmente capaces de mitigar los efectos del H₂O₂ sobre el estado redox interno. Investigaciones subsiguientes demostraron que la cepa Δ *speE* posee niveles basales más altos de actividad catalasa en comparación con la cepa *wt*, lo que sugiere que la tolerancia al estrés oxidativo estaría relacionada con un aumento en la desintoxicación de H₂O₂ a través de su conversión en H₂O y O₂. En el genoma de *Pto* se encuentran tres genes codificantes para enzimas catalasas, pero sólo los productos de *katB* y *katG* son cruciales para la descomposición del H₂O₂ (Guo *et al.*, 2012). El gen *katG* codifica para una enzima catalasa monofuncional (cuyo único sustrato es H₂O₂), se encuentra principalmente en el citoplasma y su función fisiológica central es metabolizar el peróxido generado de forma endógena por la bacteria. En cambio, el gen *katB* origina una catalasa bifuncional, también conocida como hidroperoxidasa, que exhibe actividad tanto catalasa como peroxidasa. Guo *et al.* (2012) demostraron que la exposición de *Pto* a H₂O₂ exógeno induce principalmente la expresión de *katB*, promoviendo su acumulación en el citoplasma y periplasma. Según nuestra investigación, la actividad de los promotores *katB* y *katG* se encuentra altamente inducida en la cepa Δ *speE* en condiciones basales, en coincidencia a lo observado sobre la actividad catalasa. La actividad del promotor *katB* demostró dependencia de H₂O₂ en ambas cepas, pero el aumento en la cepa *wt* fue más significativo que lo observado en la cepa Δ *speE*. A su vez, la actividad del promotor *katG* solo se vio modificada en la cepa *wt*. Es interesante observar

que la suplementación con PUT o ESPD no tuvo un impacto significativo sobre la actividad promotora de *katB* o *katG* en la cepa *wt*, indicando que el agregado de las mismas no contribuye a modular el equilibrio redox de la célula bacteriana en condiciones donde el requerimiento de poliaminas se satisface completamente mediante su síntesis. En cambio, la actividad de estos promotores disminuyó en la cepa mutante Δ *speE* cuando se agregó ESPD al medio de cultivo. Por lo tanto, es probable que exista un mecanismo regulador donde la ESPD funciona como un modulador negativo de la expresión de catalasas en *Pto*, lo que podría explicar la razón detrás del fenotipo tolerante al estrés oxidativo observado en esta cepa. En esta tendencia, en el **Capítulo II** se demostró que *speE* está regulada negativamente en *Pss* B728A y *Pa* en respuesta al H₂O₂, así como también en *E. coli* y *S. enterica* (Liu *et al.*, 2020; Lovelace *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2005; Jozefczuk *et al.*, 2010). Esta observación sugiere la existencia de mecanismos reguladores ampliamente distribuidos que vinculan la reducción de la síntesis de ESPD y la inducción de actividad catalasa.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la exposición al estrés oxidativo produce un aumento en la concentración de PUT extracelular en *Pto*. Además, demostramos que la perturbación en la síntesis de ESPD promueve la tolerancia al estrés oxidativo, lo que se correlaciona con los resultados presentados en el **Capítulo II**, donde se presenta la regulación negativa de la síntesis de ESPD como respuesta al H₂O₂ en varias especies bacterianas. Esto está asociado a una mayor estabilización de la membrana externa y a la inducción de catalasas. Concluimos entonces que estos cambios en la homeostasis de poliaminas pueden participar en un mecanismo que controla el equilibrio redox de la célula y asegura la viabilidad bacteriana en condiciones oxidativas. Sin embargo, se debe considerar que el modelo representado aquí podría diferir en el entorno de la planta, dado que las poliaminas tienen efectos sobre la bacteria, pero también sobre el metabolismo vegetal. En este sentido, debe recordarse que la PUT se acumula en los tejidos de las plantas durante las infecciones bacterianas, donde tanto el patógeno como las células huésped contribuyen a este fenómeno (Lowe-Power *et al.*, 2018; Vilas *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). Este efecto durante la interacción *Xanthomonas campestris*-*Capsicum annuum* se debe al reconocimiento del efector bacteriano *AvrBsT* por parte de las células vegetales, lo que lleva a un aumento en la producción de PUT como mecanismo de defensa, que, en última instancia, reduce la proliferación del patógeno (N. H. Kim *et al.*, 2013). En cambio, para algunas especies bacterianas como *R. solanacearum*, el incremento de la actividad arginina descarboxilasa vegetal y la consecuente acumulación de PUT favorece su crecimiento en relación a otros microorganismos competidores (Wu *et al.*, 2019). Se ha descrito también que la generación de la toxina fevamina A

por parte de *P. syringae* inhibe la producción de EROS mediada por poliaminas en *Arabidopsis*, favoreciendo su patogenicidad (O'Neill *et al.*, 2018). En conjunto, estos hallazgos implican que las bacterias modulan sus niveles de poliaminas para protegerse del estrés oxidativo, pero estos cambios también pueden tener impactos adversos al fortalecer los mecanismos defensivos de las plantas. El objetivo del próximo capítulo es comprender en mayor profundidad de qué manera las bacterias manejan el delicado equilibrio entre los roles beneficiosos y deletéreos que pueden desempeñar las poliaminas en el proceso patogénico.

4. CAPITULO IV: Síntesis de poliaminas en *Pto*, su rol en la activación de mecanismos de virulencia y patogenicidad en *A. thaliana*.

Tal como se expone en **Capítulo I** de esta tesis, nuestra comprensión sobre la importancia de las poliaminas en la virulencia de bacterias fitopatógenas es todavía bastante incompleta, aunque algunos estudios han revelado que son esenciales para la concreción de mecanismos asociados a la patogénesis (Gerlin *et al.*, 2021). A partir de estos estudios, contemplando además aquellos llevados a cabo con bacterias patógenas de humanos, esperamos que las poliaminas no solo influyan en la virulencia bacteriana, sino que también afecten la interacción entre el patógeno y la planta huésped. Este conocimiento es fundamental para identificar nuevos puntos de intervención que podrían ser explotados para desarrollar estrategias destinadas a prevenir infecciones o limitar su impacto.

En este capítulo, nuestro objetivo fue el de identificar el papel de las poliaminas, específicamente la PUT y ESPD, en el desarrollo de distintos procesos de virulencia de *Pto* mediante estudios *in vitro*, para posteriormente, corroborar su funcionalidad en la invasión de *A. thaliana*.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas de *Pto* (**Tabla 3.1**) fueron cultivada rutinariamente en placas de LB agarizado suplementadas, según la necesidad, con rifampicina (50 µg/µL) o gentamicina (30 µg/mL) a 28 °C por 48/72 h. Para cultivos líquidos, las bacterias se cultivaron en medio LB o M9, con o sin suplementación con rifampicina según se especifica, a 28 °C con agitación a 160 rpm o de forma estática. Además de ellos, se utilizó el medio inductor HIM (fosfato de potasio 50mM, manitol 10mM, (NH₄)₂SO₄ 7,6mM, MgCl₂ 1,7mM, NaCl 1,7mM, pH 5,7). Cuando fue necesario, los medios líquidos se suplementaron con rifampicina (50 µg/mL) o gentamicina (30 µg/mL).

4.1.2 Material vegetal y condiciones de cultivo.

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0), las cuales fueron cultivadas en dos condiciones distintas dependiendo del ensayo, dado que fueron evaluadas en la etapa de plántula, así como de planta adulta.

Para la obtención de plántulas *A. thaliana*, las semillas se desinfectaron siguiendo el siguiente protocolo:

- 3 min en solución de etanol 70 % (v/v) + tritón X-100 0,05 % (v/v).
- 1 min en solución de etanol 96 % (v/v).
- 3 lavados con agua destilada estéril.

Entre 7 y 8 semillas desinfectadas se sembraron en placas de Petri con medio MS (Murashige y Skoog, Sigma-Aldrich) suplementado con glucosa al 5 % (p/v). Las placas se aislaron utilizando film transparente y se almacenaron a 4 °C por 48 h para sincronizar su germinación. Posteriormente se cultivaron en una cámara de cultivo (*Percival Scientific Inc.*) a 22 ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con una densidad de flujo de fotones de 120 µmol m⁻² s⁻¹ y humedad relativa de 65 ± 5 % por 15 días. En ensayos donde se utilizaron plantas adultas, las semillas fueron sembradas en macetas de 75 cm³ utilizando como sustrato una mezcla de turba:arena:perlita en proporciones 1:1:1. Las macetas se almacenaron a 4 °C durante 48 h en bandejas de plástico con solución de Hoagland 0,5X y aisladas con film. Luego, se les retiró el film y fueron trasladadas a la cámara de

cultivo a 22 ± 2 °C por 4 semanas. EL ciclo de luz/oscuridad utilizado fue de 12/12 h con una densidad de flujo de fotones de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 65 ± 5 %.

Por otro lado, se utilizaron plantas adultas de *Nicotiana benthamiana*. Para su cultivo se usaron macetas de 250 cm^3 con una mezcla de sustrato turba:arena:perlita en proporciones 1:1:1 y regadas periódicamente con solución de Hoagland 0,5X durante 6 semanas. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las empleadas para el caso de plantas adultas de *A. thaliana*.

4.1.3 Cuantificación de la secreción de pioverdina (PVD).

La determinación de la concentración de PVD extracelular se realizó según lo descrito por Barrientos-Moreno *et al.* (2019) con modificaciones menores. Se cultivaron las cepas de *Pto wt*, mutantes y sus versiones complementadas en medio M9 durante 18 h y se midió el crecimiento celular mediante $\text{OD}_{600\text{nm}}$. Desde su inicio, los cultivos fueron suplementados con $50 \mu\text{M}$ de FeCl_3 , 2mM de PUT o 2mM de ESPD según se indica en cada tratamiento. Luego, se tomaron $800 \mu\text{L}$ de cada cultivo y se centrifugaron a $8.000 \times g$ por 5 min para obtener el sobrenadante libre de células. La fluorescencia derivada de la PVD en esta fracción se cuantificó utilizando el lector de microplacas híbrido multimodo *Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc.)* registrando la emisión a 455 nm con una longitud de onda de emisión de 398 nm . Las lecturas de fluorescencia se corrigieron en función de la absorbancia a 600 nm .

4.1.4 Cuantificación de la producción de biofilms.

La cuantificación del *biofilms* se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Shao *et al.* (2019) con modificaciones. Las células se cultivaron durante toda la noche a 28 °C con agitación constante en medio LB suplementado con rifampicina y gentamicina a las concentraciones apropiadas. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con buffer PSB 1X, se determinó la absorbancia óptica a 600 nm de las suspensiones finales, y se inocularon $200 \mu\text{L}$ de medio LB o M9 en pocillos de placas multipocillo X96 a una OD_{600} final de $0,1$ (aproximadamente 1×10^8 células/mL) y la placa se incubó a 28 °C durante 24 h de forma estática. Una vez finalizado el periodo de incubación, se cuantificó el crecimiento bacteriano según la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas híbrido multimodo *Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc.)*. Luego se retiraron

las células invirtiendo la placa sobre un colector de desechos y los pocillos se lavaron 2 veces con 200 μ L de buffer PBS 1X. Se agregaron 200 μ L de solución de cristal violeta al 0,1 % y la placa multipocillo se dejó 20 min de forma estática a temperatura ambiente para permitir la tinción del *biofilm* bacteriano formado. Finalmente, cada pocillo se lavó 3 veces con 200 μ L de buffer PSB 1X y el *biofilm* teñido se solubilizó agregando 200 μ L de etanol al 96 % (v/v). Nuevamente se utilizó el lector de microplacas para medir la absorbancia específica del cristal violeta (590 nm) disuelto en la solución etanólica y los valores se relativizaron al crecimiento bacteriano.

4.1.5 Determinación de la formación de exopolisacáridos (EPS) mediante el ensayo de rojo Congo.

Las cepas de *Pto* se cultivaron durante la noche en medio líquido LB, se lavaron dos veces con medio LB fresco, y luego se resuspendieron en mismo medio a una OD_{600nm} igual a 0,3. Se tomaron 5 μ L de la suspensión celular y se colocaron en placas de agar LB conteniendo 40 μ g de rojo Congo por mililitro de medio. Las placas se incubaron a 28 °C por 3 días de forma estática, tiempo donde fueron fotografiadas para analizar la producción de EPS. La formación de EPS se evidencia por la coloración blanquecina que adoptan las colonias.

4.1.6 Ensayo de movilidad celular.

Para evaluar la movilidad celular en *Pto* se adaptó la metodología descrita originalmente por Adler, (1973). Las cepas de *Pto* fueron cultivadas a 28 °C en medio LB suplementado con rifampicina a concentraciones adecuadas durante toda la noche en agitación constante. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con buffer PBS 1X, luego de lo cual se cuantificó la concentración de células mediante la absorbancia óptica a 600 nm y se inocularon tubos de ensayo de vidrio con 2 mL de medio M9 a una concentración final de 1×10^8 células/mL. De forma paralela, se colocaron 40 μ L de medio M9 sin inocular dentro de capilares de vidrio (1,40 – 1,60mm de diámetro) y se sellaron en la parte superior. Los capilares fueron ubicados dentro de los tubos de ensayo que contenían los cultivos celulares y se incubaron a 22 °C durante 4 h de forma estática. Finalizado el tiempo de incubación, se retiraron los capilares y se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias a partir de una muestra de 20 μ L de su contenido.

4.1.7 Preparación del inóculo para los ensayos de apertura estomática e infección.

Para la preparación de inóculos bacterianos, las cepas correspondientes fueron cultivadas en medio LB suplementado con rifampicina durante toda la noche. Se recolectaron las células por centrifugación (8.000 x g por 5 min), se lavaron 3 veces con MgCl₂ 10mM, se determinó la OD_{600nm} y se diluyeron en MgCl₂ 10mM hasta alcanzar la concentración final deseada de células/mL.

4.1.8 Ensayo de apertura estomática.

La capacidad de inhibir el cierre estomático de *A. thaliana* por parte de *Pto* se estudió utilizando el método adaptado de Chitrakar & Melotto (2010), con algunas modificaciones. Se utilizaron plantas adultas de *A. thaliana* las cuales estuvieron al menos 4 horas antes de realizar el ensayo en bandejas con abundante hidratación, tapadas con film y expuestas a la luz a los fines de inducir la apertura estomática. Se cortaron hojas completamente expandidas de cada planta y se colocaron en placas de Petri de 90mm de diámetro que contenían 20 mL de MgCl₂ 10mM sin inocular (control) o con una concentración final de 1x10⁸ células/mL de *Pto wt* o mutantes. Las placas se incubaron a 25 °C en presencia de luz durante 4 h. Finalizado este periodo, se retiraron las hojas, se secaron completamente utilizando papel absorbente y se extrajo la capa epidérmica abaxial utilizando una pinza quirúrgica. Las células epidérmicas se tiñeron con una solución de yoduro de propidio 20 µM por 10 min, luego se lavaron 3 veces con MgCl₂ 10mM y se montaron en portaobjetos utilizando una solución de glicerol al 40 % (v/v). Finalmente, las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (ZEISS Axio Observer, Carl Zeiss Inc.) utilizando un objetivo 40x, con una longitud de onda de excitación de 453 nm y un filtro de emisión de 579-694 nm. Se calculó el índice de apertura estomática (µm de ancho/µm de largo) observando al menos 30 estomas por hoja por planta.

4.1.9 Infección de *N. benthamiana*.

Se utilizaron plantas adultas de *N. benthamiana*, seleccionando 2 hojas completamente desarrolladas por planta. Cada hoja se inoculó con aproximadamente 200 µL de 3 suspensiones celulares distintas (1x10⁶, 1x10⁷ y 1x10⁸ células/mL), utilizando una jeringa estéril de 1 mL sin aguja, y el área de infiltración se registró utilizando un marcador permanente. Las hojas inoculadas se cultivaron durante 24 h en las condiciones de crecimiento de las plantas y luego se estimó el grado de lesión en las áreas infiltradas (Kong *et al.*, 2012).

4.1.10 Determinación de la acumulación de H₂O₂.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior se inocularon hojas *N. benthamiana* con las cepas *Pto wt* y mutantes a una concentración final de 1×10^7 células/mL o bien con MgCl₂ 10mM estéril como control. Se delimitó el área inoculada con un marcador y las plantas se cultivaron durante 18 h en las mismas condiciones de crecimiento. Para evaluar la acumulación de H₂O₂ se adaptó el protocolo descrito por Bach-Pages & Preston (2018). Brevemente, las hojas se cortaron, se colocaron en tubos Falcon de 50 mL (1 hoja por tubo) y se sumergieron en una solución de DAB-HCl al 0,1 % (p/v) (3,3-diaminobenzidina-HCl, pH 3,8). Luego de incubar los tubos a temperatura ambiente por 8 h, se retiró la solución de DAB, y las hojas se lavaron 3 veces con MgCl₂ 10mM y se agregaron 40 mL de etanol 96 % (v/v). Los tubos se calentaron a 65 °C en baño María por 2 h, se reemplazó la solución con etanol 75 % (v/v) y se incubaron a temperatura ambiente hasta que las hojas se decoloraron completamente. Finalmente, la solución de etanol se reemplazó con etanol 50 % (v/v) y las hojas se visualizaron y fotografiaron utilizando un transiluminador de luz blanca.

4.1.11 Inoculación de plántulas de *A. thaliana*.

Las plántulas de *A. thaliana* fueron inoculadas mediante el método de inundación. Para ello fueron cultivadas durante 1 semana en placas de Petri de 90mm de diámetro en medio MS-glucosa. Posteriormente las placas se inundaron con 40 mL de MgCl₂ 10mM + 0,025 % Silwet L-77 con o sin células bacterianas (5×10^6 células/mL), y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente (Ishiga *et al.*, 2011). Las soluciones se retiraron cuidadosamente, las placas se dejaron secar en flujo laminar durante 10 min, y se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento. A las 24 y 48 h post inoculación (hpi), se recolectaron los vástagos (3 correspondieron a una muestra biológica) y fueron dispuestos en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Cada muestra biológica se pesó, se lavó con MgCl₂ 10mM y se desinfectó superficialmente con H₂O₂ al 5 % (p/v) durante 3 min. Después de tres lavados con MgCl₂ 10mM estéril, se homogeneizó el tejido vegetal en 500 µL de esta misma solución mediante el uso de un disruptor y perlas de acero de 0,5mm de diámetro. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3.000 x g durante 3 min y se realizaron diluciones seriadas del

sobrenadante para cuantificar las unidades formadoras de colonias bacterianas. Los valores obtenidos se relativizaron al peso fresco inicial de cada muestra (UFC/mg).

4.1.12 Inoculación de plantas adultas *A. thaliana* por el método de infiltración.

Se seleccionaron dos hojas por cada planta adulta, las cuales fueron previamente incubadas en bandejas de plástico al menos dos horas con abundante hidratación y tapadas con film para facilitar la infiltración del inóculo mediante la utilización de una jeringa sin aguja. Diferentes soluciones de MgCl₂ 10mM estéril (control) o de suspensiones bacterianas (concentración final de 2x10⁶ células/mL) se utilizaron para infiltrar hojas de forma completa utilizando jeringas de 1 mL. Posteriormente, las plantas se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento por 24, 48, 72 y 96 hpi. Se tomaron muestras biológicas a cada tiempo utilizando un sacabocados de 0,5 cm de diámetro. Cada muestra biológica consistió de 4 discos provenientes de 2 hojas. Los discos se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se homogeneizaron en 250 µL de MgCl₂ 10mM estéril usando un disruptor de tejidos. Se realizaron diluciones seriadas de los homogenatos luego de su centrifugación a baja velocidad, se sembraron en medio LB suplementado con rifampicina y se incubaron por 48 h para contabilizar las unidades formadoras de colonias (UFC).

4.1.13 Extracción de fluido apoplástico de *A. thaliana*.

La obtención de fluido intercelular fue llevada a cabo según el método de O'Leary *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Para ello, plantas adultas fueron cortadas a nivel de la base de la roseta, lavadas dos veces con agua destilada, secadas y dispuestas en vasos de precipitado cubiertas totalmente con agua destilada. Se sometieron al vacío utilizando una bomba (a una presión de 500mM de Hg) hasta que las plantas se observaron completamente infiltradas. Posteriormente, se retiraron del agua, se secaron para remover completamente el líquido exterior y se colocaron de forma invertida en tubos Falcon de 50 mL atando la base de la roseta a la parte superior del tubo. Para extraer el fluido enriquecido en apoplasto, las muestras se centrifugaron a 1.500 x g durante 15 min a 4 °C. El líquido resultante se conservó a 4 °C hasta su utilización. La contaminación con componentes citoplasmáticos fue evaluada cuantificando el contenido de clorofila en el fluido apoplástico sobre el contenido de clorofila en el total del material vegetal y se utilizó la siguiente fórmula para su cálculo:

$$\text{Contaminación (\%)} = \frac{\text{Clorofila a + b en apoplasto (C/mg de tejido vegetal fresco)}}{\text{Clorofila a + b total (C/mg de tejido vegetal fresco)}}$$

4.1.14 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y cuantificación de niveles de expresión génica mediante qPCR.

4.1.14.1 Cultivos celulares y extracción de ARN.

Las cepas de *Pto* fueron cultivadas durante toda la noche en medio LB suplementado con rifampicina a una concentración final de 50 µg/mL. Los cultivos se centrifugaron a 8.000 x g durante 4 min y se realizaron dos lavados con MgCl₂ 10mM. Posteriormente, se inocularon 4 mL de LB o HIM a una concentración final de 5 x 10⁷ células/mL y se cultivaron durante 6 h a 28 °C en agitación constante a 160 rpm. Una vez transcurrido el periodo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 min a 4 °C, se lavaron los pellets una vez con MgCl₂ 10mM y se congelaron utilizando nitrógeno líquido para luego ser almacenadas a – 20 °C hasta su procesamiento.

La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo TRANSZOL (TRANS®) siguiendo el protocolo descrito por Toni *et al.* (2018), donde se agrega un paso adicional de extracción con cloroformo y dos pasos de lavado con etanol 75 %. La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa 1,2 % (p/v) y la concentración de ácidos nucleicos se cuantificó por absorbancia a 230 nm utilizando una placa *Take3* (BioTeck®).

4.1.14.2 Síntesis de ADNc.

Las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa I TURBO (*Invitrogen*™) siguiendo las recomendaciones del fabricante con el fin de degradar posibles contaminaciones con ADN genómico. Posteriormente, el ADNc fue generado agregando 1,2 µg ARN a la siguiente mezcla: 1 µL de hexámeros aleatorios (dN₆), 1 µL de dNTPs 10mM, 1 µL de retrotranscriptasamMLV (200 U/µL), 5 µL de buffer de reacción 5X (Tris-HCl 250mM, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM y DTT 50mM, pH 8,3) y agua destilada hasta un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C.

4.1.14.3 Cuantificación de los niveles de expresión génica por qPCR.

Para el análisis de niveles de expresión génica, 1 µL ADNc (dilución 1:5) se diluyó junto a los cebadores correspondientes (ver **Tabla 4.1**) en agua hasta un volumen final de 5 µL, y luego se agregó el mismo volumen de *FastStart Universal SYBR Green Master* (con ROX) para completar un volumen final de 10 µL. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador *StepOnePlus™ System* (*Applied Biosystems*) con la ayuda del programa informático de análisis *StepOne Software v2.2.2* (*Applied Biosystems*). La cuantificación relativa se realizó por el método comparativo de Ct (*Cycle threshold*) usando como normalizador la expresión del gen *gyrA*. Para calcular cambios relativos en la expresión génica se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), asignando como control la condición LB de la cepa *wt*. Se utilizó el programa Infostat para realizar la comparación entre los valores de expresión relativa de genes (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Tabla 4.1. Cebadores utilizados en este capítulo.

Cebadores	Secuencia	Origen o referencia
HopA1 F	ATGCGAAACCCGTCTCGAAT	Este trabajo
HopA1 R	TGTGCAGGAACTTCTTGCTG	Este trabajo
GyrA F	GGCAAGGTCACCCGCTTCAAGGAAT	Vilas <i>et al.</i> (2018)
GyrA R	GACCGCCACGCTTGACTCAGGGAAC	Vilas <i>et al.</i> (2018)

4.2 RESULTADOS.

4.2.1 Varios procesos asociados a la patogénesis de *Pto* se vieron afectadas por la interrupción en la síntesis de poliaminas.

La virulencia bacteriana depende de un conjunto de mecanismos moleculares finamente regulados que tienen como objetivos inhibir la respuesta inmune y favorecer la proliferación celular dentro de su hospedador (Xin *et al.*, 2018). En función de esto, y para estudiar el rol que cumplen las poliaminas en la virulencia de *Pto*, evaluamos en ensayos *in vitro* diferentes características asociadas a la virulencia en las cepas mutantes y *wt* de esta especie.

En primer lugar, se cuantificó la producción de *biofilms* en diferentes medios de cultivos. Esta estructura es una matriz extracelular formada principalmente por EPS que presentan un rol importante, tanto en la interacción directa con las células del hospedador como confiriendo resistencia al estrés oxidativo (G. M. Preston, 2000). Utilizando LB y M9 como medios de cultivo, observamos que la cepa *wt* produce más *biofilm* en condiciones donde los nutrientes se encuentran limitados (**Figura 4.1 A**). Por su parte, la cepa $\Delta speE$ produce mayores niveles de *biofilms* que la cepa *wt* en medio M9, pero niveles similares cuando se cultivaron en medio LB. En cambio, la doble mutante $\Delta speA\Delta speC$ mostró una menor capacidad de producir *biofilms*, independientemente del medio de cultivo utilizado. La menor capacidad de producir *biofilms* se correlaciona con la menor producción de EPS en la doble mutante (**Figura 4.1 B**), mientras que no se observaron diferencias en la producción de EPS entre la cepa *wt* y la mutante $\Delta speE$. Cabe destacar que la complementación de dichas mutantes expresando los genes *speE* (en $\Delta speE$), *speA* o *speC* (en $\Delta speA\Delta speC$) restableció los fenotipos observados, comportándose de manera similar a la cepa *wt*.

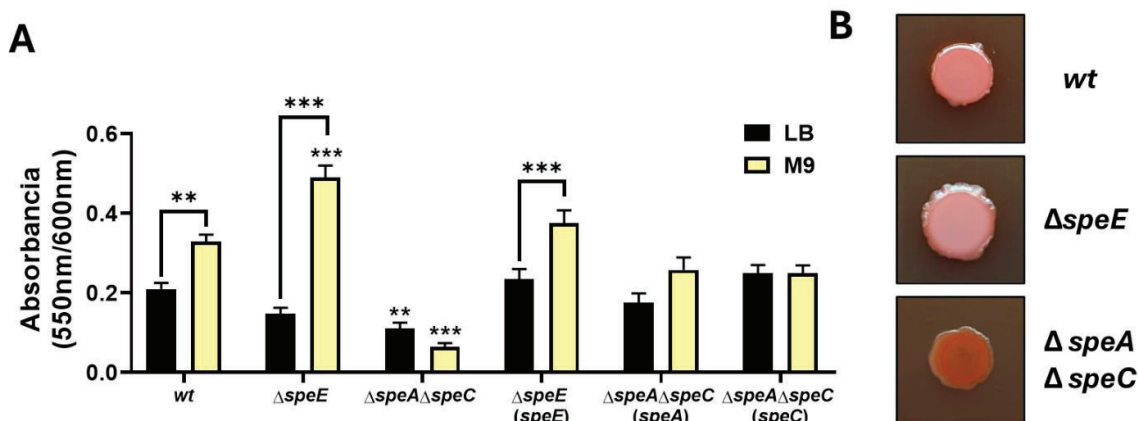


Figura 4.1. Efecto de la deficiencia en la síntesis de poliaminas en *Pto* en la producción de *biofilms*. **A)**

La producción de *biofilm* en las cepas indicadas se cuantificó mediante el método de tinción con cristal violeta. Para ello, las células se cultivaron en medio LB o M9 durante 24 h a 28° C de forma estática en pocillos de placas multi pocillo. Posteriormente se procedió a lavar cada pocillo y se realizó la tinción con cristal violeta tal como se describe en Materiales y Métodos, para luego determinar la absorbancia (550 nm) para estimar la producción de *biofilms*. Los valores se relativizaron al crecimiento celular determinado por OD_{600nm}. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas entre cepas para un mismo medio de cultivo, o entre distintos medios de cultivo para una misma cepa (indicadas entre corchetes), se presentan como: ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. **B)** Visualización de la producción de exopolisacaridos (EPS). En este caso, las cepas se cultivaron en placas de LB-agar suplementadas con 40 µg de Rojo Congo durante 72 h a 28° C, previo a ser fotografiadas. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples (**p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001). Se utilizaron 8 (**A**) y 3 (**B**) réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por triplicado, con resultados similares.

El hierro es un elemento de gran importancia para el crecimiento de las bacterias, pero debido a su baja solubilidad a pH natural no se encuentra disponible en la mayoría de los ambientes (Owen & Ackerley, 2011). Varias especies de *Pseudomonas* tienen la capacidad de sintetizar y secretar sideróforos con el objetivo de formar complejos con iones de este elemento y favorecer su incorporación. En particular, *Pto* produce una molécula quelante denominada pioverdina (PVD), que entre sus características bioquímicas se destaca la emisión de fluorescencia cuando se encuentra libre, la cual se pierde cuando se une a iones hierro (Barrientos-Moreno *et al.*, 2019). Así, para evaluar la secreción de PVD por parte de la cepa *wt* y cepas mutantes, analizamos la emisión de fluorescencia en sobrenadantes libres de células de cultivos de *Pto* en medio mínimo M9. Este medio definido no posee hierro en su composición por lo que genera una condición de deficiencia para este mineral, induciendo la síntesis y secreción de PVD. Observamos mayores niveles de emisión en el sobrenadante de la cepa *wt* respecto al obtenido de cultivos de las cepas mutantes

$\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$ (Figura 4.2 A y C). A su vez, la complementación de las cepas mutantes restituyó la capacidad de secretar este sideróforo. Para corroborar que la fluorescencia observada se debía a PVD y no a otra molécula fluorescente, se suplementaron los cultivos de *Pto* con $FeCl_3$. Efectivamente, la adición de hierro generó una caída significativa en la fluorescencia de los sobrenadantes. La adición de poliaminas al medio de cultivo no tuvo ningún impacto sobre la secreción de PVD por parte de la cepa *wt* (Figura 4.2 B). En cambio, la suplementación de ESPD generó una gran inducción de la secreción de PVD en la cepa $\Delta speE$, obteniendo niveles de fluorescencia incluso mayores a los observados en cultivos de la cepa *wt*. Por su parte, la deficiencia en la secreción de PDV mostrada por la doble mutante $\Delta speA\Delta speC$ no se revirtió ante la adición de PUT al medio de cultivo. Por lo tanto, los resultados obtenidos nos llevan a concluir que, si bien la síntesis de PUT y ESPD sería necesaria para la secreción de PVD en *Pto*, los requerimientos de ESPD pueden ser compensados mediante su suplementación, fenómeno que no se observa con respecto a la PUT.

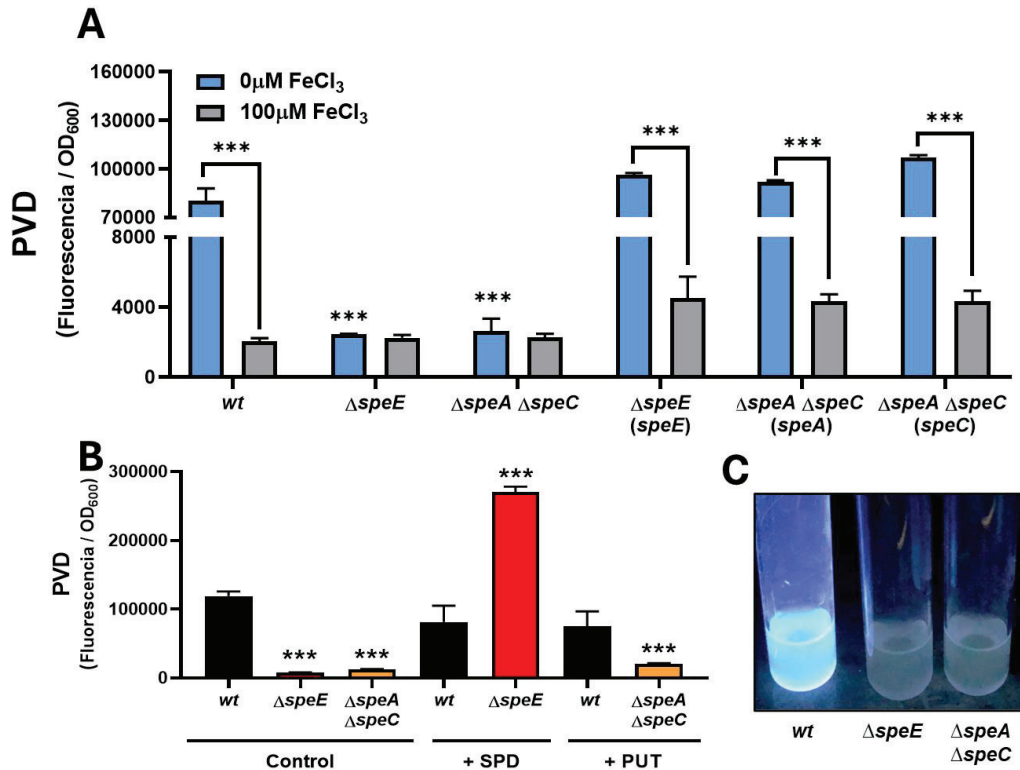


Figura 4.2. Determinación de la fluorescencia derivada de la pioverdina en los medios de cultivo de *Pto* *wt* y mutantes alteradas en la síntesis de PUT y ESPD. El panel A) muestra la cuantificación de

fluorescencia derivada de PVD en sobrenadantes libres de células (excitación 398 nm/emisión 455 nm) de las cepas mencionadas, cultivadas durante 16 h en medio mínimo M9 con y sin el agregado de 100 μ M de FeCl₃. Los sobrenadantes se recolectaron mediante centrifugación y los niveles de fluorescencia obtenidos se relativizaron a la concentración celular estimada mediante la OD_{600nm}. **B)** Se utilizó el mismo proceso mencionado en **(A)**, pero los cultivos celulares fueron suplementados durante su cultivo con poliaminas (PUT o ESPD) a una concentración final de 2mM o sin suplementar (Control). En **A** y **B** los datos se analizaron mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas entre cepas, se presentan como: *** $p < 0,001$. La foto en **C** muestra cultivos de *Pto wt*, Δ *speE* y Δ *speA Δ *speC* en medio mínimo M9 sin la suplementación con FeCl₃ expuestos a luz UV. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por triplicado, con resultados similares.*

La capacidad de desplazarse en medios líquidos o semi sólidos es una característica muy estudiada en bacterias patógenas en relación a su patogénesis (Josenhans & Suerbaum, 2002). Si bien las infecciones causadas por *P. syringae* se restringe a los órganos infectados y no suele diseminarse al resto del hospedador, la movilidad juega un rol muy importante en la entrada de este patógeno a los tejidos vegetales dado que resulta necesaria para establecerse en el espacio apoplástico (Xin & He, 2013). Los ensayos macroscópicos, donde se analiza el desplazamiento de células en placas de Petri utilizando diferentes medios de cultivo (sólido, semisólido o semilíquido) y diferentes métodos de inoculación, son los más utilizados para estudiar la movilidad bacteriana (Palma *et al.*, 2020). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de estos ensayos son influenciados por la tasa de crecimiento y no son recomendados para analizar y comparar cepas que muestran diferencias en esta variable. Debido a que las mutantes en la síntesis de poliaminas difieren en la velocidad de crecimiento respecto a la cepa *wt*, decidimos adaptar la metodología descrita originalmente por Adler (1973) donde se evalúa en un tiempo acotado la invasión del medio de cultivo contenido en un capilar. En estos ensayos no se observaron diferencias en la movilidad entre las cepas Δ *speE* y Δ *speA Δ *speC* respecto a la cepa *wt* cuando utilizamos medio LB (**Figura 4.3 A**). En cambio, cuando las bacterias fueron cultivadas en medio mínimo M9 observamos que las mutantes mostraron menor movilidad respecto a la cepa *wt*, siendo este efecto más significativo en la doble mutante.*

Por otro lado, se conoce que la población bacteriana disminuye drásticamente en las primeras 48 h si *Pto* es afectada en la capacidad de invadir el interior de los tejidos del hospedante (Xin & He, 2013), lo que se explica por su baja aptitud para el crecimiento epifítico. Las aberturas estomáticas han sido reconocidas como una de las rutas principales de entrada de bacterias a las hojas (Huang, 1986), y en efecto, el cierre de los estomas tiene un rol activo en la limitación de las infecciones bacterianas (Melotto *et al.*, 2006). Es por esto que la síntesis de la toxina coronatina producida por *Pto* juega un papel esencial, ya que tiene la capacidad de promover la reapertura de los estomas y

así facilitar la entrada de la bacteria al espacio apoplástico. Así, decidimos analizar la capacidad de inducción de la apertura estomática por parte de las cepas de *Pto*. Luego de exponer hojas adultas de *A. thaliana* a una suspensión de 1×10^8 células/mL por 4 h, observamos que las cepas mutantes $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$ exhibieron una menor capacidad de promover la apertura estomática que la cepa *wt* (Figura 4.3 B-C). En estos ensayos se incluyó un tratamiento control (MgCl₂ sin inocular) que obtuvo un índice de apertura estomática similar al de la cepa *wt*, evidenciando el gran potencial de *Pto* en inhibir la respuesta inmune vegetal e inducir la reapertura de las estomas.

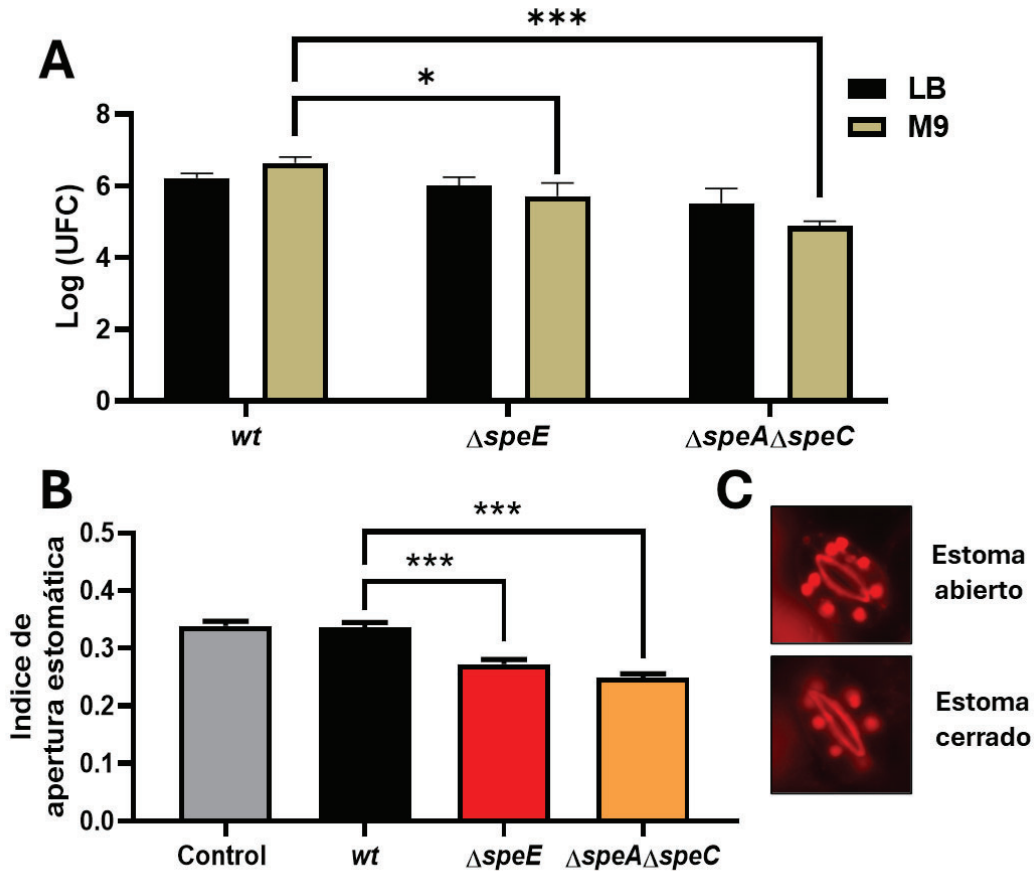


Figura 4.3. Movilidad celular e inducción de la apertura estomática en *Pto*. **A)** Evaluación de la movilidad celular de las cepas *wt*, $\Delta speA\Delta speC$ y $\Delta speE$ mediante el desplazamiento de células desde el medio de cultivo líquido (LB o M9) hacia el interior de capilares de vidrio tras 4 h de incubación a 22° C. Los valores representan el recuento de UFC encontradas dentro del capilar luego del periodo de incubación. **B)** Capacidad de las bacterias de inducir la reapertura estomática en hojas de *A. thaliana*. Las plantas se expusieron durante 4 h a una suspensión celular de *Pto*, $\Delta speA\Delta speC$ y $\Delta speE$. Luego se retiró la capa epidérmica abaxial de las hojas, se tiñó con ioduro de propidio 10 μ M y se cuantificó el índice de apertura estomática en microscopio de fluorescencia. Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguido de la prueba

post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas se presentan como: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. **C)** Fotografía representativa de un estoma abierto y uno cerrado, visualizado en microscopio, con un aumento óptico de 40X. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

4.2.2 Activación de la respuesta hipersensible en *N. benthamiana* durante las infecciones con las cepas mutantes $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$.

Una vez que *Pto* ingresa al espacio apoplástico, se multiplica de manera agresiva, aumentando notablemente su población en las primeras etapas de la infección (Xin & He, 2013). En plantas susceptibles a este patógeno, el T3SS y las proteínas efectoras translocadas por éste, juegan un rol primordial al suprimir la respuesta inmune y modificar el metabolismo de las células vegetales favoreciendo la adquisición de nutrientes por parte de la bacteria (O'malley & Anderson, 2021). Por otro lado, distintas proteínas efectoras son reconocidas por proteínas R en plantas que demuestran resistencia, lo que conduce a la activación de una respuesta localizada temprana denominada HR. Con el objetivo de restringir la proliferación del patógeno, la HR provoca la generación repentina y continua de EROS que terminan en la muerte celular del tejido infectado (Großkinsky *et al.*, 2012). La interacción de bacterias patógenas con plantas resistentes (denominadas interacciones no compatibles) han sido de gran utilidad para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la interacción planta-patógeno (Wei *et al.*, 2007). Por este motivo, analizamos la capacidad de inducir la HR por parte de las cepas *wt* y mutantes de poliaminas en hojas adultas de *N. benthamiana*, una especie vegetal resistente a *Pto*. Utilizando jeringas de 1 mL estériles realizamos tres inoculaciones por hoja con diferentes concentraciones bacterianas (1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 células/mL), incubamos las mismas durante 24 h en condiciones óptimas de crecimiento y evaluamos la aparición de necrosis en la zona de inoculación. Cuando utilizamos una alta concentración de células (1×10^8) todas las cepas mostraron la misma capacidad de inducir HR (**Figura 4.4 A**). Sin embargo, observamos una disminución en el grado de necrosis cuando infiltramos con 1×10^7 y 1×10^6 células/mL en las cepas mutantes respecto a la cepa *wt* transcurridas 24 h post inoculación. Estos niveles de lesión, sin embargo, se igualaron a las 48 h post inoculación. Para corroborar lo observado, hojas inoculadas con 1×10^7 células/mL se incubaron por 18 h y se realizó una tinción con nitroazul de tetrazolio (NTB) para observar la acumulación de H_2O_2 asociada a la inducción de HR. Nuevamente, se observó una menor acumulación de esta molécula reactiva en las regiones inoculadas con las cepas mutantes $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$ respecto a la cepa *wt* (**Figura 4.4 B**). Para extender estos resultados, decidimos

estudiar la participación del metabolismo de poliaminas en la expresión de efectores. *Pto* presenta alrededor de 40 genes que codifican proteínas efectoras y gran parte de ellas son esenciales para mostrar una virulencia total en plantas susceptibles, como *A. thaliana* (Alfano & Collmer, 2004; Wang *et al.*, 2024). En nuestro caso decidimos cuantificar la expresión del gen que codifica para el efector HopA1 como medida de esto, tanto en el medio rico LB como en un medio mínimo inductor de la virulencia como lo es HIM (*hrp-induced medium*) (Huynh *et al.*, 1989). HopA1 reprime la activación de defensa dependiente de PAMP (PTI) mediante inhibiciones postranscripcionales y traduccionales de proteínas relacionadas con el sistema inmune vegetal (Dahale *et al.*, 2021). Luego de 6 h de incubación en los respectivos medios, observamos una inducción significativa de la expresión de *hopA1* en medio inductor respecto a LB en las cepas *wt* y $\Delta speE$ (Figura 4.5 A). Sin embargo, dicha inducción no se encontró en la doble mutante $\Delta speA\Delta speC$, a pesar de mostrar mayores niveles de expresión de *hopA1* que la cepa *wt* en medio LB.

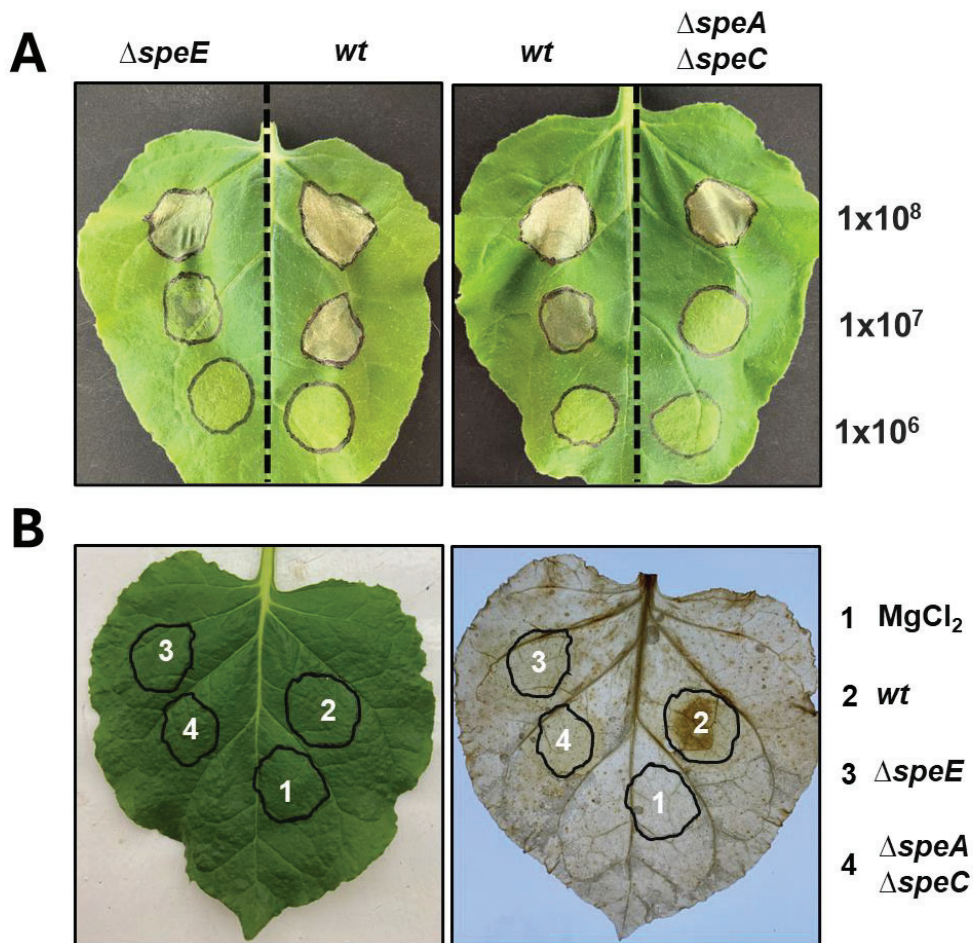


Figura 4.4. Efecto de la perturbación de la síntesis de poliaminas en la bacteria durante la interacción no compatible *Pto-N. benthamiana*. **A)** Hojas completamente expandidas de plantas de *N. benthamiana* fueron inoculadas utilizando jeringas estériles con suspensiones celulares de *Pto wt*, $\Delta speA\Delta speC$ o $\Delta speE$ a diferentes concentraciones (1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 células/mL). Se utilizó $MgCl_2$ 10mM sin inóculo bacteriano como control. Las plantas se cultivaron por 24 h en las mismas condiciones luego del tratamiento, para luego ser fotografiadas. En **B)** Se realizó el mismo proceso que en **A)** utilizando una suspensión de 1×10^7 células/mL. Las plantas se cultivaron por 18 h y se realizó la tinción con nitroazul tetrazolio (NBT) para observar la acumulación de H_2O_2 , tal como se detalla en materiales y métodos. Se utilizaron 5 (**A)** y 2 (**B)** réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

4.2.3 La síntesis de PUT por parte de *Pto* es indispensable durante la infección de *A. thaliana*.

Con el fin de evaluar el potencial de las cepas *Pto wt*, $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$ de infectar *A. thaliana* se probaron dos métodos distintos de inoculación y se cuantificó la proliferación bacteriana dentro de los tejidos vegetales. Por un lado, se realizó la inoculación de plantas adultas mediante infiltración utilizando jeringas estériles. También se inocularon plántulas de *A. thaliana* mediante inundación con una solución bacteriana para estudiar tanto la capacidad de ingreso a la planta como la tasa de proliferación en el espacio apoplástico. Independientemente del método de inoculación utilizado, la cepa doble mutante (incapaz de sintetizar PUT) mostró una significativa reducción en la virulencia en todos los tiempos estudiados respecto a la cepa *wt* (**Figura 4.5 B-C**). Por su parte, sólo se observó un menor recuento de colonias de la mutante $\Delta speE$ respecto a la cepa *wt* luego de un día post inoculación cuando se utilizó el método de inoculación por inundación (**Figura 4.5 B-C**). Estos resultados indicarían que la perturbación de la síntesis de PUT en *Pto* afectaría mecanismos necesarios para infectar *A. thaliana*. A su vez, la interrupción en la síntesis de ESPD afectaría principalmente procesos asociados al ingreso a la planta (lo que concuerda con lo observado en secciones previas en cuanto a la movilidad y apertura estomática) pero no tendría ningún efecto una vez que las células se encuentran dentro del espacio apoplástico. Esto nos lleva a pensar que la biodisponibilidad de ESPD en el apoplasto y la capacidad de incorporarla por parte de la bacteria sería suficiente para cumplir con sus requerimientos fisiológicos.

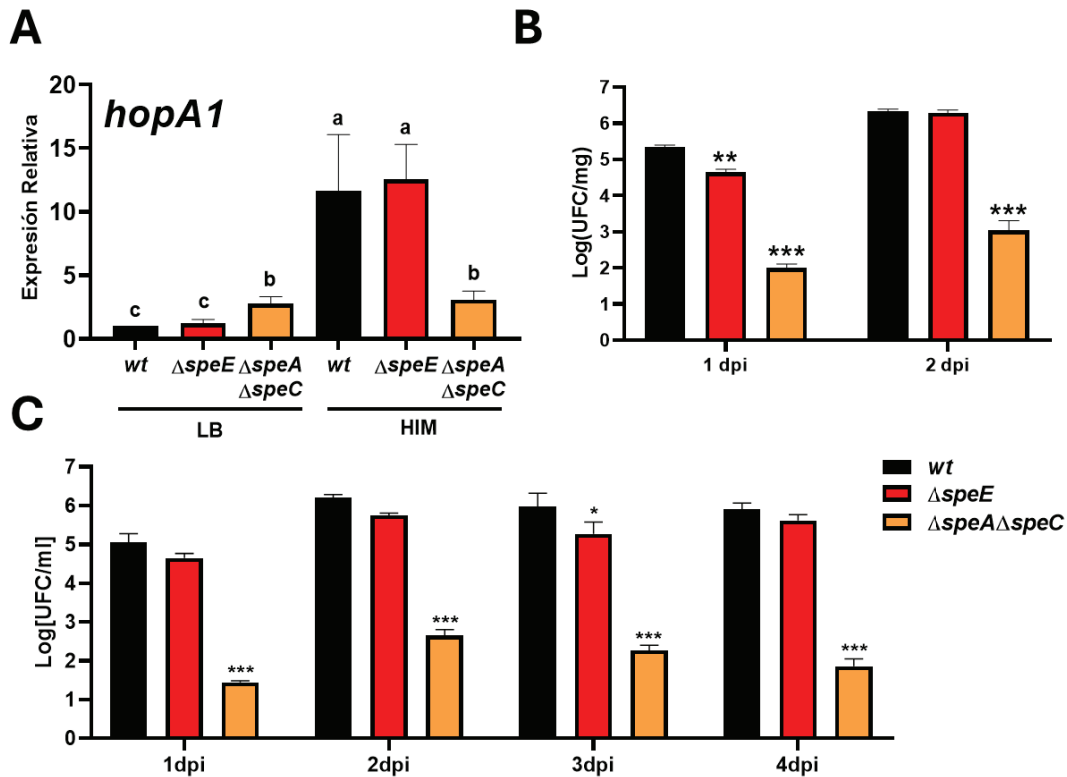


Figura 4.5. Efecto de la interrupción de la síntesis de PUT y ESPD en la virulencia de *Pto*. **A)** Expresión relativa cuantificada mediante RT-qPCR en células de *Pto* cultivadas en medio LB o HIM por 6 h. Los niveles de expresión génica se normalizaron a los de los ARNm que codifican a la proteína GyrA, y el análisis estadístico de los datos fue realizado con el software InfoStat. La cuantificación génica se realizó en dos ensayos independientes, obteniendo resultados similares. *A. thaliana* fue inoculada mediante el método de inundación (**B**) o infiltración (**C**). Se representa el recuento de UFC dentro de la planta a diferentes tiempos. Los valores presentados en (**B**) se referenciaron al peso fresco vegetal utilizado para realizar los extractos, mientras que en (**C**) se expresa en relación al volumen del extracto, ya que se utilizó la misma cantidad de material vegetal para cada muestra. Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas entre las cepas mutantes y la wt se presentan como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Se utilizaron 4 (**A**) y 6 (**B-C**) réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado (**A**) y triplicado (**B-C**), con resultados similares.

4.2.4 La biodisponibilidad de ESPD en el apoplasto de *A. thaliana* compensa la perturbación en su síntesis en la cepa $\Delta speE$.

La concentración de nutrientes en el espacio apoplástico es suficiente para promover un rápido crecimiento de *P. syringae in vitro* y se ha sugerido que esta bacteria está metabólicamente especializada para hacer un uso eficiente de las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en el apoplasto de sus plantas hospedantes (Melotto & Underwood, 2008; Mithani *et al.*, 2011; Rico &

Preston, 2008). Si bien la composición del líquido apoplástico se encuentra pobremente caracterizada, se sabe que responde al cambio de las condiciones ambientales, incluida la nutrición, el estrés abiótico y biótico, y los ciclos diurnos (Lopez-Millan *et al.*, 2000; O'Leary *et al.*, 2016; Sattelmacher, 2001). Durante la interacción *A. thaliana*-*Pto* hay un gran aumento de la concentración de PUT en el apoplasto y, tanto el metabolismo vegetal como el bacteriano contribuyen a este fenómeno (Vilas *et al.*, 2018). Es por esto que nos propusimos estudiar el potencial nutricional que posee el apoplasto de *A. thaliana* sobre el crecimiento de *Pto wt* y mutantes deficientes en la síntesis de poliaminas. Para ello, realizamos la extracción de fluido apoplástico (FA) de hojas adultas de *A. thaliana* (O'Leary *et al.*, 2014), el cual se utilizó para suplementar medio mínimo M9 y evaluar el crecimiento de *Pto*. En las primeras horas de crecimiento (2, 4 y 8 h) todas las cepas respondieron a la suplementación con FA mostrando una mayor tasa de crecimiento (**Figura 4.6 A**). Luego de 24 h de cultivo, los niveles de crecimiento mostrados por la *wt* no difirieron en presencia de FA, demostrando que este fluido no aporta beneficios nutricionales para esta cepa. Sin embargo, un efecto benéfico pudo observarse en el crecimiento de la mutante $\Delta speE$, la que a este tiempo y con un 20 % de FA alcanza valores de absorbancias comparables a los obtenidos para la cepa *wt*. Por su parte, la tasa de crecimiento de la cepa doble mutante resultó baja y no fue modificado mediante la suplementación con FA. Finalmente, se cuantificó el contenido de poliaminas presentes en el FA extraído y observamos que tanto PUT como ESPD se encontraban presentes en el mismo, siendo la primera amina la de mayor concentración (**Figura 4.6 B**). Estos resultados concuerdan con los presentados en la **Figura 3.5 B (Capítulo III)**, donde la suplementación de M9 con poliaminas mostró un mayor efecto en el crecimiento de la mutante $\Delta speE$, pero sólo restableció parcialmente el crecimiento de la doble mutante.

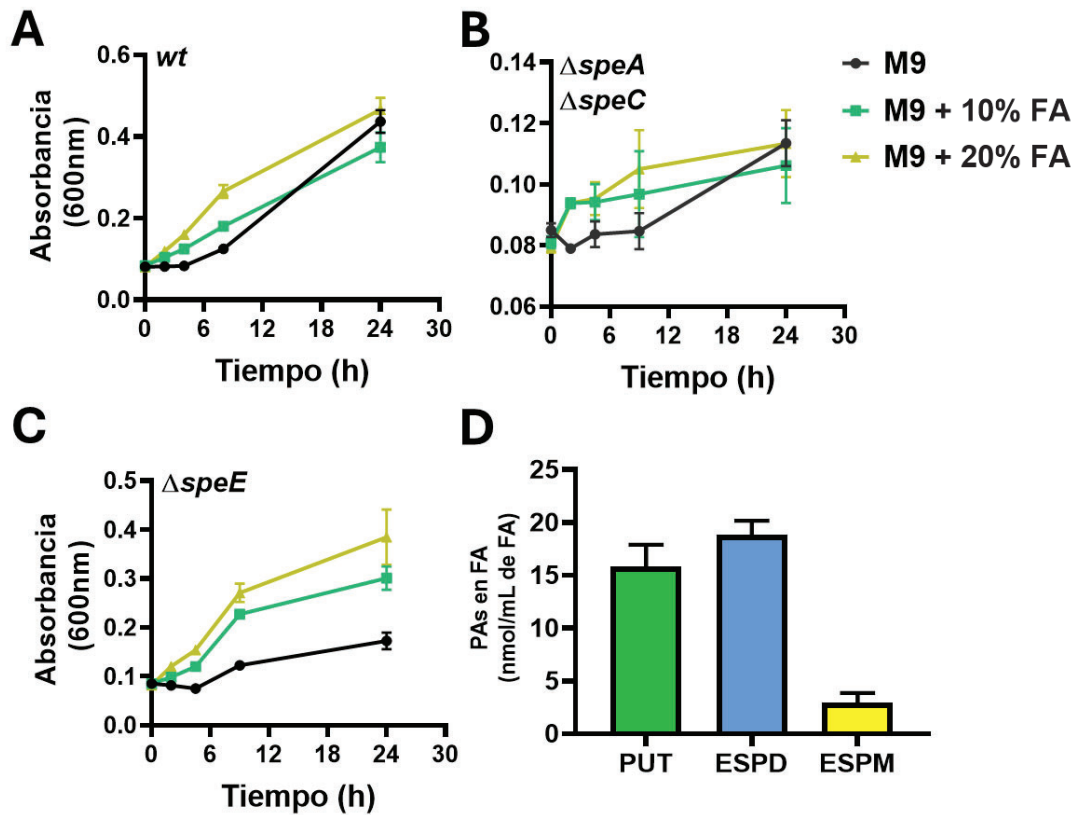


Figura 4.6 Efecto de la suplementación con fluido apoplástico en el crecimiento de *Pto*. A-C) Se evaluó el crecimiento de las cepas *Pto* (A), $\Delta speA\Delta speC$ (B) y $\Delta speE$ (C) en medio M9 suplementado con distintas concentraciones de fluido apoplástico extraído de *A. thaliana*. Para ello, el crecimiento se monitoreó a los tiempos indicados midiendo la absorbancia óptica de los cultivos a 600 nm. D) Cuantificación del contenido de poliaminas en los fluidos apoplásticos utilizados según la metodología descrita en materiales y métodos. Se utilizaron 4 réplicas biológicas por ensayo y los mismos se realizaron por duplicado, con resultados similares.

4.3 DISCUSIÓN.

Utilizando principalmente patógenos humanos, en los últimos años se han publicado un número creciente de estudios sobre la función que cumplen las poliaminas en la inducción de mecanismos de virulencia bacteriana, aportando nuevos conocimientos sobre la funcionalidad de estas moléculas durante las diferentes etapas de la infección. En relación con esto, se ha demostrado que la homeostasis de poliaminas está asociada a la inducción de genes de virulencia, movilidad, resistencia al estrés oxidativo, producción de *biofilms* y modulación de la respuesta inmune del hospedador (Di Martino *et al.*, 2013). Debido a que estas moléculas pueden ser producidas tanto por el patógeno, así como también por el hospedante, comprender su rol en sistemas *in vivo* suele ser un desafío sumamente complejo (Gerlin *et al.*, 2021). Durante el desarrollo del **Capítulo II y III** de la presente tesis, demostramos que la expresión de los genes de metabolismo de poliaminas se modifica a medida que avanza el proceso infeccioso y que la perturbación de la síntesis de ESPD, al mismo tiempo que la secreción de PUT, contribuyen en la respuesta al estrés oxidativo en *Pto*. Debido a todo lo mencionado, nos propusimos evaluar la participación de las poliaminas en el desarrollo de mecanismos asociados a la virulencia en esta bacteria y comprender su rol en la patogénesis utilizando la planta modelo *A. thaliana*.

El primer proceso evaluado fue la formación de *biofilms*, una estructura que además de contribuir a la patogénesis también desempeña un papel importante en la resistencia a antibióticos en distintas especies bacterianas (Donlan *et al.*, 2002). Se ha reportado la formación de *biofilms* por *P. syringae* en tejidos vegetales, sugiriendo que esta estructura sería relevante durante la colonización de la planta (Fakhr *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 1986; Preston *et al.*, 2001). En particular, esta estructura presentaría una mayor relevancia durante el crecimiento epifítico de la bacteria donde otorgaría una mayor tolerancia a la desecación (Chang *et al.*, 2007). Sin embargo, es notorio que algunos patovares tal como *Pto* presentan un desarrollo epifítico pobre, mientras que sí se destacan en su aptitud endofítica (Boureau *et al.*, 2002). En el interior de los tejidos vegetales, la formación de *biofilms* se encuentra asociada principalmente a una mayor resistencia a la miríada de moléculas con actividad antagonista que se producen durante la activación de la inmunidad vegetal (Engl *et al.*, 2014; Preston *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2024). Nuestros resultados indican que, en condiciones de cultivo definidas y libres de poliaminas, la deficiencia de la síntesis de PUT lleva a una menor capacidad de producción de *biofilms*. En cambio, bajo las mismas condiciones, la

interrupción de la vía de síntesis de ESPD condujo a un aumento en la formación de esta estructura. Este fenotipo se revirtió por la complementación de la cepa mutante con el gen *speE* o cultivando las células en medio LB, el cual contiene poliaminas en su composición (Vilas *et al.*, 2018). Notablemente, si bien la complementación de la cepa $\Delta speA\Delta speC$ con los genes *speA* o *speC* aumentó su capacidad de producir biofilms en un medio carente de poliaminas, la utilización de LB como medio de cultivo no logró revertir el fenotipo de la cepa doble mutante. Trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, demostraron que la suplementación del medio de cultivo con PUT no afecta la formación del *biofilms* en *Pto* (Vilas *et al.*, 2018), lo que indica que este mecanismo no estaría regulado por las concentraciones externas de esta poliamina. En conjunto, podemos concluir que la síntesis de PUT mediante las vías catalizadas por SpeA y SpeC, más allá de su disponibilidad en el medio, sería importante para la producción de *biofilms* en *Pto*.

Otra de las estrategias que contribuyen a la virulencia bacteriana es la de asegurar el suministro de hierro mediante la producción y secreción de sideróforos capaces de quelar el mismo con una alta afinidad (Braun & Hantke, 2011). Los sideróforos desempeñan un papel destacado en la biología de bacterias del género *Pseudomonas*, lo cual le permite ocupar una amplia gama de nichos ambientales. Las *Pseudomonas* fluorescentes sintetizan principalmente el sideróforo PVD junto con otros secundarios que tienen menor afinidad por este mineral (Cornelis & Matthijs, 2002). Como la restricción de hierro es un mecanismo clave de defensa por parte del huésped, los sideróforos suelen ser considerados como un importante factor de virulencia (Meyer *et al.*, 1996; Visca *et al.*, 2007). Así, se ha demostrado que poseen un rol relevante durante las infecciones de *Dickeya dadantii* (Franza *et al.*, 2005) y que contribuyen a la aptitud epífita de *Pss* (Wensing *et al.*, 2010), aunque su ausencia no afecta la capacidad de generar lesiones en *Phaseolus vulgaris* por parte de esta última (Owen & Ackerley, 2011). Recientemente, Barrientos-Moreno *et al.* (2019) demostraron que la síntesis de pioverdina en *P. putida* se ve afectada si la síntesis de arginina es interrumpida, un metabolito que participa en la síntesis de PUT a través de la vía de la arginina descarboxilasa. Es por ello que en este trabajo nos planteamos estudiar la capacidad de síntesis y secreción de PVD por parte de *Pto* en condiciones donde la síntesis de poliaminas es interrumpida. Así, cuando se cultivaron las bacterias mutantes $\Delta speE$ o $\Delta speA\Delta speC$ en condiciones deficientes de hierro no observamos cantidades significativas de PVD en los sobrenadantes, aunque sí fueron observadas en sobrenadantes provenientes de cultivos de la cepa *wt*. La complementación de las mutantes con los genes respectivos mostró una reversión completa del fenotipo. Cabe destacar que la suplementación con ESPD restableció la capacidad de sintetizar PVD por parte de $\Delta speE$.

Este efecto mediado por ESPD había sido reportado previamente por Barrientos-Moreno *et al.* (2019) en *Pp*, por lo que este podría ser, en principio, un mecanismo conservado en el género *Pseudomonas*. Futuros estudios llevados a cabo en otras especies de este género serán de suma importancia para entender el alcance del rol regulador de la ESPD sobre el metabolismo del hierro. Por su parte, la suplementación con PUT en el medio de cultivo de la cepa $\Delta speA\Delta speC$ no generó una respuesta significativa sobre la secreción de PVD, indicando que esta cepa podría no incorporar PUT de forma eficiente tal como se dedujo del estudio de su crecimiento en estas mismas condiciones (**Figura 3.7, Capítulo III**).

La capacidad de moverse en busca de un ambiente más favorable o bien con la finalidad de ingresar al interior de los tejidos vegetales también define la aptitud de una bacteria fitopatógena (Río-Álvarez *et al.*, 2014). Las bacterias ingresan al espacio apoplástico de las plantas a través de heridas o de aperturas naturales como los estomas (Ichinose *et al.*, 2013). La capacidad de inhibir el cierre estomático a través de la síntesis de la fitotóxica coronatina por parte de *Pto* (Melotto *et al.* 2006), hace que estas estructuras constituyan una de las principales rutas de ingreso a la planta (Huang *et al.*, 1986). Por consiguiente, mutaciones en genes relacionados a la funcionalidad del flagelo o en la síntesis de coronatina disminuyen notablemente la virulencia de *P. syringae* (Haefele & Lindow, 1987; Hattermann & Ries, 1988; Ichinose *et al.*, 2003; Nomura *et al.*, 2005; Panopoulos & Schroth, 1974; Xin & He, 2013). Si bien existen evidencias que relacionan el metabolismo de poliaminas con la movilidad bacteriana (Chattopadhyay *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2024; Nesse *et al.*, 2015), hasta el momento esto no fue abordado en *Pto*, así como tampoco se ha investigado si estas moléculas tienen algún efecto sobre la capacidad de inhibir el cierre estomático. Nuestro análisis del desplazamiento de *wt* y cepas mutantes en cultivos líquidos en ausencia de poliaminas nos permitió observar que las mutantes presentaron una menor movilidad respecto a la cepa *wt*, siendo la cepa doble mutante $\Delta speA\Delta speC$ la que mostró una mayor alteración en esta característica. A su vez, ambas mutantes presentaron una movilidad similar a la cepa *wt* cuando se utilizó el LB como medio de cultivo, por lo que la síntesis de poliaminas no sería necesaria para el desplazamiento en un contexto de alta disponibilidad nutricional. De este modo, dependiendo de las condiciones de crecimiento y la posibilidad incorporar poliaminas del ambiente, la síntesis de poliaminas puede resultar prescindible para la movilidad de *Pto*. Por otro lado, la capacidad de inhibir el cierre estomático en plantas de *A. thaliana*, tanto por parte de la cepa $\Delta speE$ como de la $\Delta speA\Delta speC$ se vio significativamente alterada respecto a la cepa *wt*. Si bien resta por investigar si las mutantes estudiadas en este trabajo poseen una deficiencia en la síntesis de coronatina, recientemente se ha informado que las poliaminas pueden inhibir directamente el cierre estomático (Liu *et al.*, 2023), por

lo que este mecanismo podría ser una explicación alternativa al fenotipo observado. Por lo tanto, el ingreso a la planta en estas cepas se encontraría afectado, en mayor o menor medida, por la abundancia de poliaminas sobre la superficie de las hojas y la posibilidad de promover la reapertura de los estomas por parte de las bacterias.

El T3SS transloca moléculas efectoras desde la bacteria hacia las células vegetales, contribuyendo significativamente a la capacidad del patógeno de suprimir las respuestas de defensa y de multiplicarse dentro de la planta (Alfano & Collmer, 2004). Sin embargo, en una interacción no compatible tal como la interacción de *Pto* con *N. benthamiana*, el reconocimiento de uno o varios efectores del T3SS por parte del sistema inmune de la planta (mediado por las proteínas R) da como resultado la inducción de la HR con la finalidad de restringir la multiplicación bacteriana (Dangl & Jones, 2001; Lamb & Dixon, 1997). Así, las cepas de *Pto* que no pueden o tengan afectado el *delivery* de efectores, suelen mostrar alteraciones en la inducción de HR en plantas de esta especie vegetal. En relación con la temática que se aborda en esta tesis, existen reportes que relacionan el metabolismo de poliaminas y la expresión de genes del T3SS utilizando como modelos de estudio especies tales como *S. typhimurium*, *Pa* y la bacteria fitopatógena *D. zea* (Jelsbak *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2007). Nuestros estudios demostraron una alteración temporal en la aparición de síntomas asociados a la HR en las interacciones de *N. benthamiana* con las cepas $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$. Estos resultados se acompañaron de una disminución de procesos íntimamente relacionados con la activación de HR, como una menor acumulación de H_2O_2 en las zonas inoculadas y, al menos para la cepa $\Delta speA\Delta speC$, con una menor capacidad de inducir la expresión del gen codificante para la proteína efectora HopA1. Existen otras cepas mutantes cuyo fenotipo ha sido asociado a un retraso o menor inducción de la HR, entre las que podemos encontrar mutantes en componentes del T3SS, en distintas proteínas efectoras, sistema de dos componentes GacS/GacA o en la proteína de control de la represión de catabolitos Crc (Chakravarthy *et al.*, 2017; Chatterjee *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2007). Por lo tanto, las poliaminas podrían estar modulando la expresión de genes del T3SS de forma directa, o bien indirectamente a través de proteínas que regulan la expresión del mismo.

Existen varios métodos reportados para la inoculación de *A. thaliana* con *P. syringae* (Katagiri *et al.*, 2002), y cada uno ofrece la posibilidad de evaluar diferentes etapas del proceso patogénico. Por ejemplo, la infiltración con jeringa es el método de inoculación más utilizado, donde las bacterias se introducen forzosamente dentro del apoplasto de las hojas. Por el contrario, Ishiga *et al.* (2012) describieron un método alternativo donde plántulas son inundadas con una solución bacteriana por

un breve momento con el fin de evaluar también la capacidad de entrar a los tejidos vegetales. En este trabajo de tesis decidimos evaluar ambos métodos de inoculación con el fin de sopesar la importancia de las alteraciones que observamos en los diferentes mecanismos de virulencia. Así, la cepa doble mutante presentó un fenotipo hipovirulento independientemente del método de inoculación empleado, coincidentemente con su menor capacidad de secretar PVD, formar *biofilms*, movilizarse en medio líquido y modular el cierre estomático. Por su parte, la mutante $\Delta speE$ mostró una menor capacidad de multiplicarse en los tejidos vegetales cuando el método de inundación fue utilizado, pero mostró una virulencia similar a la cepa *wt* con el método de infiltración. Esto estaría explicado por su menor capacidad de desplazamiento y de inhibir el cierre estomático, lo que se asocia principalmente a la capacidad de invadir el tejido vegetal desde la superficie, lo que no tendría un peso significativo en el desarrollo de la enfermedad una vez que la bacteria se encuentra en el interior de los tejidos vegetales. En efecto, esta mutante mostró un fenotipo con mayor producción de *biofilms* y tolerancia al estrés oxidativo, mecanismos que podrían otorgarle un mejor *fitness* en comparación a la cepa *wt*.

El apoplasto es rico en una gran variedad de moléculas y juega un rol importante en la defensa de la planta contra patógenos, al mismo tiempo que es una fuente nutricional fundamental para la proliferación de microorganismos virulentos (Rico & Preston, 2009). El fluido apoplástico extraído de las plantas puede ser utilizado para el cultivo bacteriano *in vitro*, lo que permite examinar el crecimiento en condiciones nutricionales similares a las encontradas por la bacteria en tejidos vegetales. Con esto en mente, realizamos la extracción de fluido apoplástico de *A. thaliana* y evaluamos su efecto en el crecimiento de $\Delta speE$ y $\Delta speA\Delta speC$ en comparación con la cepa *wt*, comprobando que es capaz de restaurar el crecimiento de la primera pero que no tiene efecto en la segunda. Si bien este líquido contiene cantidades significativas de PUT y ESPD, el efecto observado podría ser explicado en parte por diferencias en la capacidad de incorporar estas poliaminas. *P. syringae* no posee los genes para los transportadores PuuP y PlaP, por lo que la incorporación de PUT estaría a cargo exclusivamente del sistema SpuDEFGH. Por otro lado, ESPD podría ser incorporada por este sistema y, además, por el transportador PotABCD. Otro factor importante a mencionar es que las concentraciones de PUT encontradas dentro de las células de *Pto* son significativamente mayores que las de ESPD, por lo que sus requerimientos nutricionales tampoco serían comparables. Por lo tanto, independientemente de que PUT se encuentre disponible en el ambiente, la síntesis de esta amina resultaría indispensable para la virulencia de *Pto*.

5.CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO.

Para que un proceso de patogénesis se lleve a cabo de forma exitosa, es necesaria la combinación de tres factores fundamentales: un hospedador sensible, condiciones ambientales favorables y un organismo patogénico capaz de causar la enfermedad. La capacidad de un microorganismo fitopatógeno de poder colonizar efectivamente a su huésped, dependerá de la activación coordinada de un gran número de procesos moleculares. El déficit o ausencia de uno de estos mecanismos puede llevar a comprometer parcial o completamente la capacidad de virulencia, por lo que es importante evaluarlos de forma individual para comprender su preponderancia en el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral constituyen un avance crucial para desentrañar parcialmente el papel de las poliaminas en la virulencia y la respuesta al estrés oxidativo de *P. syringae*, una bacteria fitopatógena de gran importancia agrícola.

De forma general, las conclusiones más relevantes generadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral se listan a continuación:

- Los niveles de expresión de los genes que participan del metabolismo de poliaminas en *P. syringae* son modulados a medida que avanza el proceso infeccioso y en respuesta a condiciones de crecimiento hostiles.
- La expresión de los genes del metabolismo de poliaminas correlaciona con la expresión de un conjunto de genes relevantes para la fisiología bacteriana, enfatizando el rol de estas moléculas en el correcto funcionamiento de las células.
- *Pto* induce la acumulación significativa de PUT en el espacio extracelular, como respuesta al estrés oxidativo.
- Existen dos vías independientes para la síntesis de PUT en *Pto*, en donde la interrupción de una de ellas es compensada por la actividad de la otra.
- La interrupción simultánea de ambas vías de síntesis de PUT en *Pto*, conduce a una disminución en la tasa de crecimiento, un menor tolerancia al estrés oxidativo y activación de diferentes mecanismos asociados a la virulencia, lo que conlleva en una alteración significativa en su capacidad de infectar *A. thaliana*.
- La deficiencia en la síntesis de ESPD por parte de *Pto* da lugar a una caída en la tasa de crecimiento acompañada de un aumento en la tolerancia al estrés oxidativo, debido a un

incremento en la estabilidad de la membrana externa y en la expresión de las catalasa KatB y KatG.

- La síntesis de ESPD afecta varios mecanismos asociados a la virulencia en *Pto*, pero la biodisponibilidad de esta amina en el apoplasto, conduce a que su síntesis de vuelva indispensable para lograr un proceso infeccioso de forma exitosa.

Estos descubrimientos no solo arrojan luz sobre cómo estas moléculas afectan la capacidad del patógeno para infectar y sobrevivir en las plantas, sino que también establecen una base sólida para aplicar estos conocimientos a otras bacterias que amenazan la seguridad alimentaria global. Sin embargo, el campo temático aún enfrenta importantes desafíos. Una de las áreas menos comprendidas en lo que respecta al metabolismo de poliaminas, es la contribución de las rutas de degradación y el transporte en bacterias. La elucidación de estas vías metabólicas no sólo profundizará nuestra comprensión fundamental de la biología de este patógeno en particular, sino que también podría revelar nuevos puntos de intervención para el desarrollo de estrategias de control de enfermedades vegetales más efectivas.

Además, otro punto crítico que merece una atención más detallada es la elucidación de los mecanismos regulatorios que operan sobre los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas. Este aspecto, hasta ahora poco explorado, promete ser un área de investigación fructífera para el equipo de trabajo. Comprender cómo se controla la expresión de los genes asociados al metabolismo de las poliaminas permitirá avanzar aún más en nuestra comprensión de la virulencia bacteriana. En resumen, si bien esta investigación representa un paso importante hacia adelante, destaca la necesidad urgente de continuar investigando para abordar los desafíos que aún persisten en el campo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Adler, J. (1973). A Method for Measuring Chemotaxis and Use of the Method to Determine Optimum Conditions for Chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 74, 77–91.
- Akhova, A. V., & Tkachenko, A. G. (2020). Multifaceted role of polyamines in bacterial adaptation to antibiotic-mediated oxidative stress. *Korean Journal of Microbiology*, 56(2), 103–110. <https://doi.org/10.7845/kjm.2020.0013>
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aslam, S. N., Newman, M. A., Erbs, G., Morrissey, K. L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T. T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R. W., Knight, M. R., & Cooper, R. M. (2008). Bacterial Polysaccharides Suppress Induced Innate Immunity by Calcium Chelation. *Current Biology*, 18(14), 1078–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.061>
- Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol - Disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6161–6165. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6161>
- Bach-Pages, M., & Preston, G. M. (2018). *Methods to Quantify Biotic-Induced Stress in Plants*. 1734, 241–255.
- Baltrus, D. A., McCann, H. C., & Guttman, D. S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 152–168. <https://doi.org/10.1111/mpp.12506>
- Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M. A., Pastor-García, M., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2019). Arginine biosynthesis modulates pyoverdine production and release in *pseudomonas putida* as part of the mechanism of adaptation to oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 201(22), 1–15. <https://doi.org/10.1128/JB.00454-19>
- Bender, C. L., Alarco, F., & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* Phytotoxins : Mode of Action , Regulation , and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 266–292.
- Blair, I. A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15545–15549. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700051200>
- Bojanovic, K., D'Arrigo, I., & Long, K. S. (2017). Global Transcriptional Responses to Osmotic, Oxidative, and Imipenem Stress Conditions in *Pseudomonas putida*. *American Society for Microbiology*, 83(7), 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03236-16>
- Boureau, T., Routtu, J., Roine, E., Taira, S., & Romantschuk, M. (2002). Localization of hrpA -induced *Pseudomonas syringae* pv . *tomato* DC3000 in infected tomato leaves. *Molecular Plant Pathology*, 3(6), 451–460. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00139.x>

- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytic Biochemistry*, 1(72), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braun, V., & Hantke, K. (2011). Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.01.005>
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., ... Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10181–10186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731982100>
- Caldas, J., Gehlenborg, N., Kettunen, E., Faisal, A., Rönty, M., Nicholson, A. G., Knuutila, S., Brazma, A., & Kaski, S. (2012). Data-driven information retrieval in heterogeneous collections of transcriptomics data links SIM2s to malignant pleural mesothelioma. *Bioinformatics*, 28(2), 246–253. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr634>
- Caldas, J., & Vinga, S. (2014). Global meta-analysis of transcriptomics studies. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089318>
- Caldelari, I., Mann, S., Crooks, C., & Palmer, T. (2006). The Tat pathway of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is required for optimal virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(2), 200–212. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0200>
- Chakravarthy, S., Butcher, B. G., Liu, Y., D'Amico, K., Coster, M., & Filiatrault, M. J. (2017). Virulence of *pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 is influenced by the catabolite repression control protein Crc. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(4), 283–294. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-16-0196-R>
- Chan, Y. Y., & Chua, K. L. (2010). Growth-related changes in intracellular spermidine and its effect on efflux pump expression and quorum sensing in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology*, 156(4), 1144–1154. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032888-0>
- Chang, W., Mortel, M. Van De, Nielsen, L., Guzman, G. N. De, Li, X., & Halverson, L. J. (2007). Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8290–8299. <https://doi.org/10.1128/JB.00727-07>
- Chatnaparat, T., Prathuangwong, S., & Lindow, S. E. (2016). Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(6), 508–522. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0007-R>
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R., & Chatterjee, A. K. (2003). GacA, the Response Regulator of a Two-Component System, Acts as a Master Regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by Controlling Regulatory RNA, Transcriptional Activators, and Alternate Sigma Factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1106–1117. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.12.1106>
- Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., & Tabor, H. (2003). Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2261–2265. <https://doi.org/10.1073/pnas.2627990100>

- Chautrand, T., Souak, D., Chevalier, S., & Duclairoir-Poc, C. (2022). Gram-Negative Bacterial Envelope Homeostasis under Oxidative and Nitrosative Stress. *Microorganisms*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050924>
- Chitrakar, R., & Melotto, M. (2010). Assessing Stomatal Response to Live Bacterial Cells using Whole Leaf Imaging. *J. Vis. Exp*, 44(10), 2–5. <https://doi.org/10.3791/2185>
- Cohen, S. S. (1998). *A Guide to Polyamines*. Oxford University Press.
- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1247–1256. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.37>
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., Van Dijk, K., & Alfano, J. R. (2000). Pseudomonas syringae Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8770–8777. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8770>
- Cornelis, P., & Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: Not only pyoverdines. *Environmental Microbiology*, 4(12), 787–798. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00369.x>
- Cuppels, D. A. (1986). Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in Pseudomonas syringae pv. tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 323–327. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.323-327.1986>
- Dahale, S. K., Ghosh, D., Ingole, K. D., Chugani, A., Kim, S. H., & Bhattacharjee, S. (2021). HopA1 effector from pseudomonas syringae pv syringae strain 61 affects nmd processes and elicits effector-triggered immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms22147440>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., & Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(2), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.11.002>
- Dam, S., Pagès, J. M., & Masi, M. (2018). Stress responses, outer membrane permeability control and antimicrobial resistance in enterobacteriaceae. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(3), 260–267. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000613>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. 411(June).
- Dasu, V. V., Nakada, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Kimura, K., & Itoh, Y. (2006). Characterization and a role of Pseudomonas aeruginosa spermidine dehydrogenase in polyamine catabolism. *Microbiology*, 152(8), 2265–2272. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28920-0>
- Dela Vega, A. L., & Delcour, A. H. (1996). Polyamines decrease Escherichia coli outer membrane permeability. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3715–3721. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3715-3721.1996>
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J., & Finlay, B. B. (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>

- Di Martino, M. L., Campilongo, R., Casalino, M., Micheli, G., Colonna, B., & Prosseda, G. (2013). Polyamines: Emerging players in bacteria-host interactions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.06.008>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *InfoStat: Software Estadístico* (No. 2020). Universidad Nacional de Cordoba.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W., Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. 15(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>
- El-Halfawy, O. M., & Valvano, M. A. (2014). Putrescine reduces antibiotic-induced oxidative stress as a mechanism of modulation of antibiotic resistance in *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 4162–4171. <https://doi.org/10.1128/AAC.02649-14>
- Engl, C., Waite, C. J., Mckenna, J. F., Bennett, M. H., & Hamann, T. (2014). Chp8, a Diguanylate Cyclase from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000, Suppresses the Pathogen-Associated Molecular Pattern Flagellin, Increases Extracellular Polysaccharides, and Promotes Plant Immune Evasion. *American Society for Microbiology. Mbio*, 5(3), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.01168-14>
- Fakhr, M. K., Peñaloza-Vazquez, A., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L. (1999). Regulation of Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *American Society for Microbiology*, 181(11), 3478–3485.
- Farvardin, A., González-hernández, A. I., Llorens, E., García-agustín, P., Scalschi, L., & Vicedo, B. (2020). The apoplast: A key player in plant survival. *Antioxidants*, 9(7), 1–26. <https://doi.org/10.3390/antiox9070604>
- Felix, J., Siebert, C., Ducassou, J. N., Nigou, J., Garcia, P. S., Fraudeau, A., Huard, K., Mas, C., Brochier-Armanet, C., Couté, Y., Gutsche, I., & Renesto, P. (2021). Structural and functional analysis of the *Francisella* lysine decarboxylase as a key actor in oxidative stress resistance. *Scientific Reports*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79611-5>
- Fones, H., & Preston, G. M. (2012). Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 327(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02449.x>
- Forman, H. J., Fukuto, J. M., & Torres, M. (2004). Signal transduction: Thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set*, 287, 246–256. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00516.2003>.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28(8), 1056–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
- Franza, T., Mahé, B., & Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55(1), 261–275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04383.x>
- Fröhlich, K. S., & Gottesman, S. (2018). Small Regulatory RNAs in the Enterobacterial Response to

- Envelope Damage and Oxidative Stress. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.rwr-0022-2018>
- Furuchi, T., Kashiwagi, K., Kobayashi, H., & Igarashi, K. (1991). Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the Escherichia coli chromosome. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20928–20933. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54799-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54799-2)
- Gerlin, L., Baroukh, C., & Genin, S. (2021). Polyamines: double agents in disease and plant immunity. *Trends in Plant Science*, 26(10), 1061–1071. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.05.007>
- Gevrekci, A. Ö. (2017). The roles of polyamines in microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2370-y>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2021). The ever-expanding pseudomonas genus: Description of 43 new species and partition of the pseudomonas putida group. *Microorganisms*, 9(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Großkinsky, D. K., Graaff, E. Van Der, & Roitsch, T. (2012). Plant Science Phytoalexin transgenics in crop protection — Fairy tale with a happy end? *Plant Science*, 195, 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.06.008>
- Guo, M., Block, A., Bryan, C. D., Becker, D. F., & Alfano, J. R. (2012). Pseudomonas syringae catalases are collectively required for plant pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 5054–5064. <https://doi.org/10.1128/JB.00999-12>
- Guttman, D. S., & Greenberg, J. T. (2001). Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of Pseudomonas syringae with the use of a single-copy genomic integration system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(2), 145–155. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.2.145>
- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., & Casero, R. A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), 11140–11145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140>
- Haefele, D. M., & Lindow, S. E. (1987). Flagellar Motility Confers Epiphytic Fitness Advantages Pseudomonas syringae. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 53(23), 2528–2533.
- Hafner, E. W., Tabor, C. W., & Tabor, H. (1979). Mutants of Escherichia coli that do not contain 1,4-diaminobutane (putrescine) or spermidine. *Journal of Biological Chemistry*, 254(24), 12419–12426. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)86331-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)86331-7)
- Hammond-Kosack, K. E., & Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 177–193. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00035-1)
- Han, T. C., Kwon, D. H., Hegazy, M., & Lu, C. D. (2008). Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Journal of Bacteriology*, 190(6),

- 1966–1975. <https://doi.org/10.1128/JB.01804-07>
- Hasan, C. M., Pottenger, S., Green, A. E., Cox, A. A., White, J. S., Jones, T., Winstanley, C., Kadioglu, A., Wright, M. H., Neill, D. R., & Fothergill, J. L. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* utilizes the host-derived polyamine spermidine to facilitate antimicrobial tolerance. *JCI Insight*, *7*(22). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.158879>
- Hattermann, D. R., & Ries, S. M. (1988). Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its Role in Infection. *Ecology and Epidemiology*, *79*, 284–286.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, *44*(3), 321–334. <https://doi.org/10.1023/A:1026592509060>
- Heo, Y. J., Chung, I. Y., Cho, W. J., Lee, B. Y., Kim, J. H., Choi, K. H., Lee, J. W., Hassett, D. J., & Cho, Y. H. (2010). The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 381–390. <https://doi.org/10.1128/JB.00980-09>
- Hesse, C., Schulz, F., Bull, C. T., Shaffer, B. T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K. A., Varghese, N., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I. T., Kyrpides, N., Woyke, T., & Loper, J. E. (2018). Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, *20*(6), 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>
- Higashi, K., Kashiwagi, K., Taniguchi, S., Terui, Y., Yamamoto, K., Ishihama, A., & Igarashi, K. (2006). Enhancement of +1 frameshift by polyamines during translation of polypeptide release factor 2 in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(14), 9527–9537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513752200>
- Hisano, T., Murata, K., Kimura, A., Matsushita, K., Toyama, H., & Adachi, O. (1992). Characterization of Membrane-bound Spermidine Dehydrogenase of *Citrobacter freundii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *56*(12), 1916–1920. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1916>
- Hu, L. I., Filippova, E. V., Dang, J., Pshenychnyi, S., Ruan, J., Kiryukhina, O., Anderson, W. F., Kuhn, M. L., & Wolfe, A. J. (2018). The spermidine acetyltransferase SpeG regulates transcription of the small RNA *rprA*. *PLoS ONE*, *13*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207563>
- Huang, H., Liu, C. C., & Zhou, X. J. (2010). Bayesian approach to transforming public gene expression repositories into disease diagnosis databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(15), 6823–6828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912043107>
- Huang, J. (1986). Ultrastructure of Bacterial Penetration in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, *24*(1), 141–157. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.001041>
- Ichinose, Y., Shimizu, R., Ikeda, Y., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaihara, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., & Shiraishi, T. (2003). Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: genetic analysis with flagella-defective mutants *D fliC* and *D fliD* in host tobacco plants. *Gen Plant Pathol*, *69*, 244–249.
- Ichinose, Y., Taguchi, F., & Mukaihara, T. (2013). Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. *Journal of General Plant Pathology*, *79*(5), 285–296. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0452-8>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(7), 506–512.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.017>

- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2018). Effects of polyamines on protein synthesis and growth of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18702–18709. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003465>
- Ishiga, Y., & Ichinose, Y. (2016). *Pseudomonas syringae* pv. tomato Oxyr is required for virulence in tomato and arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(2), 119–131. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0204-R>
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S. R., & Mysore, K. S. (2011). *Arabidopsis seedling flood-inoculation technique : a rapid and reliable assay for studying plant- bacterial interactions Arabidopsis seedling flood-inoculation technique : a rapid and reliable assay for studying plant- bacterial interactions*. 32(October).
- Iyer, R., & Delcour, A. H. (1997). Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18595–18601. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18595>
- Iyer, R., Wu, Z., Woster, P. M., & Delcour, A. H. (2000). Molecular basis for the polyamine-OmpF porin interactions: Inhibitor and mutant studies. *Journal of Molecular Biology*, 297(4), 933–945. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3599>
- Jackson, A. O., & Taylor, C. B. (1996). Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell*, 8(10), 1651–1668. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1651>
- Jelsbak, L., Thomsen, L. E., Wallrodt, I., Jensen, P. R., & Olsen, J. E. (2012). Polyamines are required for virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS ONE*, 7(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036149>
- Johnson, L., Mulcahy, H., Kanevets, U., Shi, Y., & Lewenza, S. (2012). Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa*: Outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 194(4), 813–826. <https://doi.org/10.1128/JB.05230-11>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>
- Jung, I. L., & Kim, I. G. (2003). Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: Polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4), 915–922. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00064-0)
- Jung, I. L., Oh, T. J., & Kim, I. G. (2003). Abnormal growth of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress-induced damage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 418(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.003>
- Karatan, E., Duncan, T. R., & Watnick, P. I. (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7434–7443. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7434-7443.2005>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae*

- Interaction. *The Arabidopsis Book*, 1(Appendix I), e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Katsu, T., Nakagawa, H., & Yasuda, K. (2002). Interaction between polyamines and bacterial outer membranes as investigated with ion-selective electrodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(4), 1073–1079. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1073-1079.2002>
- Khan, A. U., Mascio, P. D. I., Medeiros, M. H. G., & Wilson, T. (1992). Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(23), 11428–11430. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.23.11428>
- Khan, A. U., Mei, Y. H., & Wilson, T. (1992). A proposed function for spermine and spermidine: Protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(23), 11426–11427. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.23.11426>
- Killcoyne, S., Carter, G. W., Smith, J., & Boyle, J. (2009). Cytoscape: a community-based framework for network modeling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 563(February), 219–239. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-175-2_12
- Kim, J. S., Choi, S. H., & Lee, J. K. (2006). Lysine decarboxylase expression by *Vibrio vulnificus* is induced by SoxR in response to superoxide stress. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8586–8592. <https://doi.org/10.1128/JB.01084-06>
- Kim, N. H., Kim, B. S., & Hwang, B. K. (2013). Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and γ -aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiology*, 162(4), 2067–2083. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217372>
- Koski, P., & Vaara, M. (1991). Polyamines as constituents of the outer membranes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173(12), 3695–3699. <https://doi.org/10.1128/jb.173.12.3695-3699.1991>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred>
- Krishna, P. S., Woodcock, S. D., Pfeilmeier, S., Bornemann, S., Zipfel, C., & Malone, J. G. (2022). *Pseudomonas syringae* addresses distinct environmental challenges during plant infection through the coordinated deployment of polysaccharides. *Journal of Experimental Botany*, 73(7), 2206–2221. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab550>
- Ku, J. W. K., & Gan, Y. H. (2021). New roles for glutathione: Modulators of bacterial virulence and pathogenesis. *Redox Biology*, 44(May), 102012. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102012>
- Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2000). Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 429–433.
- Kupersmidt, I., Su, Q. J., Grewal, A., Sundaresh, S., Halperin, I., Flynn, J., Shekar, M., Wang, H., Park, J., Cui, W., Wall, G. D., Wisotzkey, R., Alag, S., Akhtari, S., & Ronaghi, M. (2010). Ontology-based meta-analysis of global collections of high-throughput public data. *PLoS ONE*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013066>
- Kurihara, S., Oda, S., Tsuboi, Y., Hyeon, G. K., Oshida, M., Kumagai, H., & Suzuki, H. (2008). γ -

- glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 19981–19990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800133200>
- Kvitko, B. H., & Collmer, A. (2011). Construction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Mutant and Polymutant Strains. *Plant Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 712, 109–128. <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-998-7>
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 251–275.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Lee, J., Sperandio, V., Frantz, D. E., Longgood, J., Camilli, A., Phillips, M. A., & Michael, A. J. (2009). An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9899–9907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900110200>
- Lee, S. E., Gupta, R., Jayaramaiah, R. H., Lee, S. H., Wang, Y., Park, S. R., & Kim, S. T. (2017). Global transcriptome profiling of *xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* under in planta growth and in vitro culture conditions. *Plant Pathology Journal*, 33(5), 458–466. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0076>
- Lee, T. H., & Kang, T. H. (2019). DNA oxidation and excision repair pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20236092>
- Li, J., Beuerman, R., & Verma, C. S. (2020). Mechanism of polyamine induced colistin resistance through electrostatic networks on bacterial outer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(9), 183297. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183297>
- Lindow, S. E., Arny, D. C., & Upper, C. D. (1982). Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants. *Plant Physiology*, 70(4), 1084–1089. <https://doi.org/10.1104/pp.70.4.1084>
- Liu, X. D., Zeng, Y. Y., Zhang, X. Y., Tian, X. Q., Hasan, M. M., Yao, G. Q., & Fang, X. W. (2023). Polyamines inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by scavenging hydrogen peroxide. *Physiologia Plantarum*, 175(2). <https://doi.org/10.1111/ppl.13903>
- Liu, X., Omar, M., Abrahante, J. E., Nagaraja, K. V., & Vidovic, S. (2020). Insights into the oxidative stress response of salmonella enterica serovar enteritidis revealed by the next generation sequencing approach. *Antioxidants*, 9(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9090849>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lolle, S., Stevens, D., & Coaker, G. (2020). Plant NLR triggered immunity: From receptor activation to downstream signaling. *Curr Opin Immunol.*, 62(5), 99–105. <https://doi.org/doi:10.1016/j.coi.2019.12.007>
- Lopez-Millan, A. F., Morales, F., Abadia, A., & Abadia, J. (2000). Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology*, 124(2), 873–884. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.873>
- Lovelace, A. H., Smith, A., & Kvitko, B. H. (2018). Pattern-triggered immunity alters the

- transcriptional regulation of virulence-associated genes and induces the sulfur starvation response in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(7), 750–765. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-18-0008-R>
- Lowe-Power, T. M., Hendrich, C. G., von Roepenack-Lahaye, E., Li, B., Wu, D., Mitra, R., Dalsing, B. L., Ricca, P., Naidoo, J., Cook, D., Jancewicz, A., Masson, P., Thomma, B., Lahaye, T., Michael, A. J., & Allen, C. (2018). Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1330–1349. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14020>
- Lu, C. D., Itoh, Y., Nakada, Y., & Jiang, Y. (2002). Functional analysis and regulation of the divergent spuABCDEFHG-spul operons for polyamine uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3765–3773. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3765-3773.2002>
- Luengo, J. M., & Olivera, E. R. (2020). Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1174–1192. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14912>
- Macho, A. P. (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: Beyond suppression of immunity. *New Phytologist*, 210(1), 51–57. <https://doi.org/10.1111/nph.13605>
- McAtee, P. A., Brian, L., Curran, B., Van Der Linden, O., Nieuwenhuizen, N. J., Chen, X., Henry-Kirk, R. A., Stroud, E. A., Nardoza, S., Jayaraman, J., Rikkerink, E. H. A., Print, C. G., Allan, A. C., & Templeton, M. D. (2018). Re-programming of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* gene expression during early stages of infection of kiwifruit. *BMC Genomics*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5197-5>
- Melnyk, R. A., Beskrovnaya, P., Liu, Z., Song, Y., & Haney, C. H. (2019). Bacterially produced spermidine induces plant systemic susceptibility to pathogens. *BioRxiv*, 31. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1101/517870>. The
- Melotto, M., & Underwood, W. (2008). *Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). *Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion*. 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 64(2), 518–523. <https://doi.org/10.1128/iai.64.2.518-523.1996>
- Michael, A. J. (2016). Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 14896–14903. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.734780>
- Michael, A. J. (2018). Polyamine function in archaea and bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18693–18701. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.005670>
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Mithani, A., Hein, J., & Preston, G. M. (2011). *Comparative Analysis of Metabolic Networks Provides*

- Insight into the Evolution of Plant Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in Pseudomonas*. 28(1), 483–499. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq213>
- Miyamoto, S., Kashiwagi, K., Ito, K., Watanabe, S., & Igarashi, K. (1993). Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1), 63–69.
- Mohamed, F. A., Shaker, G. H., & Askoura, M. M. (2020). Oxidative Stress Influences *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility to Antibiotics and Reduces Its Pathogenesis in Host. *Current Microbiology*, 77(3), 479–490. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01858-7>
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME Journal*, 2(3), 321–334. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.113>
- Nair, V. A., Singh, A., Rajmani, R. S., & Chakravorty, D. (2024). Redox Biology *Salmonella Typhimurium* employs spermidine to exert protection against ROS-mediated cytotoxicity and rewires host polyamine metabolism to ameliorate its survival in macrophages. *Redox Biology*, 72(March), 103151. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103151>
- Nakada, Y., Jiang, Y., Nishijyo, T., Itoh, Y., & Lu, C. D. (2001). Molecular characterization and regulation of the *aguBA* operon, responsible for agmatine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6517–6524. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6517-6524.2001>
- Nakada, Yuji, & Itoh, Y. (2003). Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology*, 149(3), 707–714. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26009-0>
- Nesse, L. L., Berg, K., & Vestby, L. K. (2015). *Effects of Norspermidine and Spermidine on Biofilm Formation by Potentially Pathogenic Escherichia coli and Salmonella enterica Wild-Type Strains*. 81(6), 2226–2232. <https://doi.org/10.1128/AEM.03518-14>
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01298>
- Nobori, T., Velásquez, A. C., Wu, J., Kvitko, B. H., Kremer, J. M., Wang, Y., He, S. Y., & Tsuda, K. (2018). Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(13), E3055–E3064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800529115>
- Nobori, T., Wang, Y., Wu, J., Stolze, S. C., Tsuda, Y., Finkemeier, I., Nakagami, H., & Tsuda, K. (2020). Multidimensional gene regulatory landscape of a bacterial pathogen in plants. *Nature Plants*, 6(7), 883–896. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0690-7>

- Nomura, K., Melotto, M., & He, S. Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.005>
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287–1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)
- Nordmann, A. J., Kasenda, B., & Briel, M. (2012). Meta-analyses: What they can and cannot do. *Swiss Medical Weekly*, 142(MARCH), 1–11. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13518>
- O'Brien, H. E., Thakur, S., & Guttman, D. S. (2011). Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A genomics perspective. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095242>
- O'Leary, B. M., Neale, H. C., Geilfus, C. M., Jackson, R. W., Arnold, D. L., & Preston, G. M. (2016). Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola*. *Plant Cell and Environment*, 39(10), 2172–2184. <https://doi.org/10.1111/pce.12770>
- O'Leary, B. M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H. N., & Preston, G. M. (2014). The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example. *Journal of Visualized Experiments*, 94, 1–8. <https://doi.org/10.3791/52113>
- O'malley, M. R., & Anderson, J. C. (2021). Regulation of the *Pseudomonas syringae* type iii secretion system by host environment signals. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061227>
- O'Neill, E. M., Mucyn, T. S., Patteson, J. B., Finkel, O. M., Chung, E. H., Baccile, J. A., Massolo, E., Schroeder, F. C., Dangl, J. L., & Li, B. (2018). Phevamine A, a small molecule that suppresses plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), E9514–E9522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803779115>
- Osman, S. F., Fett, W. F., Regional, E., Gross, M., Fett, W. F., Bacteria, P. P., & Green, H. (1986). *Exopolysaccharides of the Phytopathogen Pseudomonas syringae pv. glycinea*. 166(1), 66–71.
- Owen, J. G., & Ackerley, D. F. (2011). Characterization of pyoverdine and achromobactin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-218>
- Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012). Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, 63(2), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8>
- Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R., & Navarrete, P. (2022). Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms*, 10(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030563>
- Panopoulos, N. J., & Schroth, M. N. (1974). Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves by *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology*, 64, 1389–1397.
- Pastré, D., Piètrement, O., Landousy, F., Hamon, L., Sorel, I., David, M. O., Delain, E., Zozime, A., &

- Le Cam, E. (2006). A new approach to DNA bending by polyamines and its implication in DNA condensation. *European Biophysics Journal*, 35(3), 214–223. <https://doi.org/10.1007/s00249-005-0025-7>
- Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D., & Oliveira, M. A. (2006). Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2355–2363. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2355-2363.2006>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132–1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato : the right pathogen, of the right plant, at the right time . *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263–275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Preston, L. A., Bender, C. L., & Schiller, N. L. (2001). Analysis and expression of algL, which encodes alginate lyase in *pseudomonas syringae* Pv. *syringae*. *Mitochondrial DNA*, 12(5–6), 455–461. <https://doi.org/10.3109/10425170109084474>
- Rico, A., & Preston, G. M. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), 269–282. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0269>
- Río-Álvarez, I., Rodríguez-Herva, J. J., Martínez, P. M., González-Melendi, P., García-Casado, G., Rodríguez-Palenzuela, P., & López-Solanilla, E. (2014). Light regulates motility, attachment and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2072–2085. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12240>
- Rosas, N. C., & Lithgow, T. (2022). Targeting bacterial outer-membrane remodelling to impact antimicrobial drug resistance. *Trends in Microbiology*, 30(6), 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.11.002>
- Sakamoto, A., Terui, Y., Yoshida, T., Yamamoto, T., Suzuki, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2015). Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: Two transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA). *PLoS ONE*, 10(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124883>
- Santamaría-Hernando, S., Cerna-Vargas, J. P., Martínez-García, P. M., de Francisco-de Polanco, S., Nebreda, S., Rodríguez-Palenzuela, P., Rodríguez-Herva, J. J., & López-Solanilla, E. (2020). Blue-light perception by epiphytic *Pseudomonas syringae* drives chemoreceptor expression, enabling efficient plant infection. *Molecular Plant Pathology*, 21(12), 1606–1619. <https://doi.org/10.1111/mpp.13001>
- Sattelmacher, B. (2001). *The apoplast and its significance for plant mineral nutrition*. 22, 167–192.
- Scalschi, L., Llorens, E., González-Hernández, A. I., Valcárcel, M., Gamir, J., García-Agustín, P., Vicedo, B., & Camañes, G. (2018). 1-methyltryptophan modifies apoplast content in tomato plants improving resistance against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02056>
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the. *Gene*, 145, 69–73.

- Schenk, A., Weingart, H., & Ulrich, M. S. (2008). The alternative sigma factor AlgT, but not alginate synthesis, promotes in planta multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Microbiology*, *154*(2), 413–421. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012864-0>
- Schneider, J., & Wendisch, V. F. (2011). Biotechnological production of polyamines by Bacteria: Recent achievements and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3252-0>
- Segal, E., Friedman, N., Koller, D., & Regev, A. (2004). A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. *Nature Genetics*, *36*(10), 1090–1098. <https://doi.org/10.1038/ng1434>
- Shah, P., Nanduri, B., Swiatlo, E., Ma, Y., & Pendarvis, K. (2011). Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, *157*(2), 504–515. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042564-0>
- Shah, P., & Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*, *68*(1), 4–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x>
- Sharma, R., Singh, G., Bhattacharya, S., & Singh, A. (2018). Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203266>
- Shi, Z., Wang, Q., Li, Y., Liang, Z., Xu, L., Zhou, J., Cui, Z., & Zhang, L. H. (2019). Putrescine is an intraspecies and interkingdom cell-cell communication signal modulating the virulence of *dickeya zeae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01950>
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Simms, C. L., & Zaher, H. S. (2016). Quality control of chemically damaged RNA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(19), 3639–3653. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2261-7>
- Simon, R., Prierer, U., & Puhler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature*, *1*(1), 417–435.
- Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Jha, V., Switala, J., & Loewen, P. C. (2008). Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *471*(2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.12.008>
- Sirota, M., Doudley, J. T., Kim, J., Chiang, A. P., Morgan, A. A., Sweet-Cordero, A., Sage, J., & Buttle, A. J. (2011). Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data. *Sci Transl Med.*, *3*(96), 22. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001318>. Discovery
- Solmi, L., Rosli, H. G., Pombo, M. A., Stalder, S., Rossi, F. R., Romero, F. M., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2022). Inferring the Significance of the Polyamine Metabolism in the Phytopathogenic Bacteria *Pseudomonas syringae*: A Meta-Analysis Approach. *Frontiers in Microbiology*, *13*(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.893626>
- Solmi, L., Rossi, F. R., Romero, F. M., Bach-Pages, M., Preston, G. M., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2023). Polyamine-mediated mechanisms contribute to oxidative stress tolerance in *Pseudomonas*

- syringae. *Scientific Reports*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31239-x>
- Souzu, H. (1986). Fluorescence polarization studies on Escherichia coli membrane stability and its relation to the resistance of the cell to freeze-thawing. II. Stabilization of the membranes by polyamines. *BBA - Biomembranes*, 861(C), 361–367. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90439-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90439-6)
- Steenken, S., & Jovanovic, S. V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 119(3), 617–618. <https://doi.org/10.1021/ja962255b>
- Stewart, T. M., Dunston, T. T., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2018). Polyamine catabolism and oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18736–18745. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003337>
- Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sugiyama, Y., Nakamura, A., Matsumoto, M., Kanbe, A., Sakanaka, M., Higashi, K., Igarashi, K., Katayama, T., Suzuki, H., & Kurihara, S. (2016). A novel putrescine exporter SapBCDF of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 291(51), 26343–26351. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762450>
- Sugiyama, Y., Nara, M., Sakanaka, M., Gotoh, A., Kitakata, A., Okuda, S., & Kurihara, S. (2017). Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: Potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 93(October), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.10.015>
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49(1), 81–99. <https://doi.org/10.1128/membr.49.1.81-99.1985>
- Tkachenko, A. G., & Nesterova, L. Y. (2003). Polyamines as Modulators of Gene Expression under Oxidative Stress in Escherichia coli. *Biochemistry (Moscow)*, 68(8), 850–856. <https://doi.org/10.1023/A:1025790729797>
- Tkachenko, A. G., Nesterova, L. Y., & Pshenichnov, M. P. (2001). Role of putrescine in the regulation of the expression of the oxidative stress defense genes of Escherichia coli. *Microbiology*, 70(2), 133–137. <https://doi.org/10.1023/A:1010365110538>
- Tkachenko, Alexander G., Akhova, A. V., Shumkov, M. S., & Nesterova, L. Y. (2012). Polyamines reduce oxidative stress in Escherichia coli cells exposed to bactericidal antibiotics. *Research in Microbiology*, 163(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.10.009>
- Tondo, M. L., Delprato, M. L., Kraiselburd, I., Zenoff, M. V. F., Farías, M. E., & Orellano, E. G. (2016). KatG, the bifunctional catalase of xanthomonas citri subsp. Citri, responds to hydrogen peroxide and contributes to epiphytic survival on citrus leaves. *PLoS ONE*, 11(3), 1–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151657>

- Toni, L. S., Garcia, A. M., Jeffrey, D. A., Jiang, X., Stauffer, B. L., Miyamoto, S. D., & Sucharov, C. C. (2018). MethodsX Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*, 5, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
- van der Heijden, J., & Finlay, B. (2015). In vitro Real-time Measurement of the Intra-bacterial Redox Potential. *Bio-Protocol*, 5(17), 1–9. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1579>
- van der Heijden, J., Vogt, S. L., Reynolds, L. A., Peña-Díaz, J., Tupin, A., Aussel, L., & Finlay, B. B. (2016). Analysis of bacterial survival after exposure to reactive oxygen species or antibiotics. *Data in Brief*, 7, 894–899. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.03.060>
- Van Hellemond, E. W., Van Dijk, M., Heuts, D. P. H. M., Janssen, D. B., & Fraaije, M. W. (2008). Discovery and characterization of a putrescine oxidase from *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(3), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1310-4>
- Vandelle, E., Colombo, T., Regaiolo, A., Maurizio, V., Libardi, T., Puttilli, M. R., Danzi, D., & Polverari, A. (2021). Transcriptional profiling of three *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovars reveals different responses to apoplast-like conditions related to strain virulence on the host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(4), 376–396. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-20-0248-R>
- Vidovic, S., Liu, X., An, R., Mendoza, K. M., Abrahante, J. E., Johny, A. K., & Reed, K. M. (2019). Transcriptional profiling and molecular characterization of the *yccT* mutant link: A novel STY1099 protein with the peroxide stress response and cell division of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Biology*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/biology8040086>
- Vilas, J. M., Romero, F. M., Rossi, F. R., Marina, M., Maiale, S. J., Calzadilla, P. I., Pieckenstain, F. L., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2018). Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Physiology*, 231(January), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.014>
- Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
- Wang, K., Kang, L., Anand, A., Lazarovits, G., & Mysore, K. S. (2007). Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv: Methods. *New Phytologist*, 174(1), 212–223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01999.x>
- Wang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Zhang, L., Fu, M., & Zhang, L. (2024). Comparative genomic analyses provide insight into the pathogenicity of three *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Anhui Province, China. *BMC Genomics*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10384-1>
- Warawan Eiamphungporn. (2012). Development of bacterial cell-based system for intracellular antioxidant activity screening assay using green fluorescence protein (GFP) reporter. *African Journal of Biotechnology*, 11(27), 6934–6945. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3790>
- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: A review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10),

- 8147–8155. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3163-x>
- Wei, C. F., Kvitko, B. H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J. R., Lin, N. C., Martin, G. B., Huang, H. C., & Collmer, A. (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, *51*(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03126.x>
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, *97*(2), 250–256. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>
- Welsch, C. W. (1987). Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, *45*(1 Suppl), 192–202. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.1.192>
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F., & Staskawicz, B. J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell*, *3*(1), 49–59. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.1.49>
- Williams, K. P., Gillespie, J. J., Sobral, B. W. S., Nordberg, E. K., Snyder, E. E., Shallom, J. M., & Dickerman, A. W. (2010). Phylogeny of gammaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*, *192*(9), 2305–2314. <https://doi.org/10.1128/JB.01480-09>
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. L. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>
- Winther, K. S., Sørensen, M. A., & Svenningsen, S. Lo. (2021). Polyamines are Required for tRNA Anticodon Modification in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *433*(15), 167073. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167073>
- Winyard, P. G., Moody, C. J., & Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in Biochemical Sciences*, *30*(8), 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.06.001>
- Wortham, B. W., Oliveira, M. A., Fetherston, J. D., & Perry, R. D. (2010). Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for *Yersinia pestis* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, *12*(7), 2034–2047. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02219.x>
- Wu, Donghui, Lim, S. C., Dong, Y., Wu, J., Tao, F., Zhou, L., Zhang, L. H., & Song, H. (2012). Structural basis of substrate binding specificity revealed by the crystal structures of polyamine receptors SpuD and SpuE from *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, *416*(5), 697–712. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.010>
- Wu, Dousheng, von Roepenack-Lahaye, E., Buntru, M., de Lange, O., Schandry, N., Pérez-Quintero, A. L., Weinberg, Z., Lowe-Power, T. M., Szurek, B., Michael, A. J., Allen, C., Schillberg, S., & Lahaye, T. (2019). A Plant Pathogen Type III Effector Protein Subverts Translational Regulation to Boost Host Polyamine Levels. *Cell Host and Microbe*, *26*(5), 638–649.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.014>
- Xiao, W. N., Nunn, G. M., Fufeng, A. B., Belu, N., Brookman, R. K., Halim, A., Krysmanski, E. C., & Cameron, R. K. (2024). Exploring *Pseudomonas syringae* pv. tomato biofilm-like aggregate formation in susceptible and PTI-responding *Arabidopsis thaliana*. *October 2023*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/mpp.13403>

- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, *51*, 473–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Yang, P., Zhao, L., & Gao, Y. G. (2023). *Bacterial Plant Pathogen Pseudomonas syringae*. 1–27.
- Yang, S. K., Yusoff, K., Ajat, M., Wee, C. Y., Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., & Lai, K. S. (2021). Combinatorial Antimicrobial Efficacy and Mechanism of Linalool Against Clinically Relevant *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *12*(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635016>
- Yao, X., He, W., & Lu, C. D. (2011). Functional characterization of seven γ -glutamylpolyamine synthetase genes and the bauRABCD locus for polyamine and β -alanine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, *193*(15), 3923–3930. <https://doi.org/10.1128/JB.05105-11>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, *111*(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A., & Igarashi, K. (2004). A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(44), 46008–46013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404393200>
- Yoshioka, H., Bouteau, F., & Kawano, T. (2008). Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: Looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signaling and Behavior*, *3*(3), 153–155. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5537>
- Yu, J., Penalzoza-Vázquez, A., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L. (1999). Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Microbiology*, *33*(4), 712–720. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01516.x>
- Yu, X., Lund, S. P., Scott, R. A., Greenwald, J. W., Records, A. H., Nettleton, D., Lindow, S. E., Gross, D. C., & Beattie, G. A. (2013). Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1221892110>
- Zhang, W., Xiao, S., & Ahn, D. U. (2013). Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(11), 1191–1201. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.577540>
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., & Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, *183*(15), 4562–4570. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4562-4570.2001>
- Zhou, L., Wang, J., & Zhang, L. H. (2007). Modulation of bacterial type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS ONE*, *2*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001291>

El presente documento es la versión final de la tesis, la cual incluye los cambio/correcciones sugeridos por los jurados.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'L' followed by a smaller 'S'.

Leandro Solmi

A handwritten signature in blue ink, written in a cursive style that includes the name 'Andrés Gárriz'.

Andrés Gárriz

A handwritten signature in blue ink, written in a cursive style that includes the name 'Franco Rubén Rossi'.

Franco Rubén Rossi