

Tesis Doctoral

Mecanismos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la supresión de la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*

Toum Terrones, Laila

2015-12-21

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Toum Terrones, Laila. (2015-12-21). Mecanismos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la supresión de la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Toum Terrones, Laila. "Mecanismos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la supresión de la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-12-21.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Mecanismos de *Xanthomonas campestris*
pv.*campestris* en la supresión de la respuesta inmune
de *Arabidopsis thaliana***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Laila Toum Terrones

Directores de tesis: Dr Adrián A.Vojnov; Dr. Gustavo E. Gudesblat

Consejera de estudios: Dra. Nancy López

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fitopatología Molecular, Fundación Pablo Cassará-
Instituto César Milstein, CONICET.

Buenos Aires, 21 de diciembre de 2015

Mecanismos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la supresión de la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*

Resumen

En esta tesis, estudiamos algunos de los mecanismos a través de los cuales *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) suprime la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*.

Los microbios gatillan el cierre estomático en la planta a través de patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), sin embargo *Xcc* es capaz de colonizar *A. thaliana* a través de estos poros mediante un factor de virulencia (*Xcc* FV) capaz de inhibir su cierre.

En la primera parte de esta tesis estudiamos el mecanismo de acción del *Xcc* FV y de una toxina de efecto similar producida por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* denominada coronatina. Encontramos que ambos compuestos inhiben el cierre estomático inducido por MAMPs y por la hormona ácido abscísico a través de la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediada por NADPH oxidasas y de manera dependiente de la señalización de jasmonatos.

En la segunda parte de la tesis, estudiamos el rol del glucano cíclico β -(1,2) de *Xcc* en el proceso infeccioso. Hallamos que este compuesto inhibe la producción de ERO, disminuye la expresión de genes de defensa y suprime la deposición de calosa inducidas por flagelina. Asimismo, observamos que el efecto del glucano cíclico β -(1,2) requiere de dos receptores quinasa con dominios ricos en lisina, LYK3 y LYK4, y que se une específicamente a preparaciones de membranas de *A. thaliana*, lo cual sugiere que actúa a través de la unión a un receptor de membrana.

En la tercera parte de la tesis, estudiamos el mecanismo a través del cual el xantano, un exopolisacárido producido por *Xcc*, actúa como factor de virulencia. A través del uso de mutantes de *Xcc* afectadas en enzimas biosintéticas encargadas de modificar químicamente el xantano, descubrimos que la piruvilación sobre la manosa externa de la unidad repetitiva de este polisacárido son esenciales para su actividad de supresión de la respuesta inmune de *A. thaliana*.

Palabras clave: estomas, ABA, coronatina, NADPH oxidasas, especies reactivas de oxígeno, glucano cíclico β -(1,2), flg22, inmunidad vegetal, xantano, *Xanthomonas*, *Arabidopsis thaliana*.

Mechanisms of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the suppression of immune response in *Arabidopsis thaliana*

Abstract

In this thesis, we studied some of the mechanisms by which *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) suppresses *Arabidopsis thaliana* immune response.

Microbes trigger stomatal closure through microbe-associated molecular patterns (MAMPs). However, *Xcc* is able to colonize *A. thaliana* through stomatal pores by synthesizing a virulence factor (*Xcc* VF), which is capable of inhibiting stomatal closure induced by MAMPs.

In the first part of this thesis we studied the mechanism of action of the *Xcc* VF and of coronatine, a similar toxin produced by the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. We found that both compounds inhibit stomatal closure triggered by ABA and by MAMPs by preventing NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species (ROS) production and in a jasmonate signalling-dependent manner.

In the second part of this thesis, we studied the role of a cyclic β -(1,2)-glucan produced by *Xcc* during the infective process. We found that this compound prevents flagellin-induced ROS production, inhibits induction of defense genes and suppresses callose deposition elicited by this MAMP. We also demonstrated that the cyclic β -(1,2)-glucan effect requires two lysin motif receptor kinases, LYK3 and LYK4. Additionally, we observed that cyclic β -(1,2)-glucan binds specifically to *A. thaliana* membranes, which suggests that this compound might exert its suppressive effect via membrane-bound receptors.

In the third part of this thesis, we studied the mechanism by which xanthan, an exopolysaccharide produced by *Xcc*, acts as a virulence factor. By using mutants of *Xcc* affected in enzymes that modify xanthan chemically during its biosynthetic process, we found that pyruvilation and mannosylation of the polysaccharide are essential for its activity as a suppressor of *A. thaliana* immune response.

Keywords: stomata, ABA, *Xcc* VF, coronatine, NADPH oxidases, ROS, cyclic β -(1,2)-glucan, flg22, plant immunity, xanthan structure, *Xanthomonas*, *Arabidopsis thaliana*.

Agradecimientos

A mi mamá, por tanto amor, por darme siempre el ejemplo, por haberme enseñado los valores más enormes que llevo conmigo y por su apoyo total e incondicional.

A mi hermana, porque no hay otra persona en el mundo que admire más, por su enorme generosidad y compañerismo, por su integridad y su amor por mí y los demás.

A Néstor y a Cristina, por haber transformado este hermoso país, por haber despertado a la juventud y habernos hecho vivir la experiencia política colectiva más importante y más intensa de la que se tenga memoria en democracia.

A Adrián, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su grupo, por su enorme generosidad, sensibilidad e integridad, por haber confiado en mí, por haber sido una guía potenciadora de los objetivos de todos los que tenemos la fortuna de trabajar con él.

A Gustavo, por haber sido siempre tan generoso conmigo poniendo a disposición su saber y experiencia para este doctorado, por sus consejos, sus enseñanzas permanentes, por haber sido una guía maravillosa de esta tesis, por su preocupación permanente.

A Viole, por tantos años de amistad compartidos, por su desbordante sensibilidad y amor.

A mis amigos de siempre, los pibes y las pibas, a quienes amo profundamente y con quienes me une un inextirpable vínculo de amistad y amor.

A Vale, a Flor Malamud y a Eleo por haberme abierto las puertas del laboratorio desde el comienzo y haberme incluido entre “las chicas”.

A mis amigos del laboratorio de Fitopatología Molecular y del grupo Chagas, por tantas mañanas, tardes y noches compartidas en el mejor clima de trabajo, por el compañerismo, por la solidaridad y la risa de todos estos años.

A Isa, por tanta calidez, por compartir conmigo parte de este trabajo de tesis, por su siempre tan buena disposición.

A Naty, a Pablito, a Vero por su aporte a este trabajo de tesis siempre desde el mejor lugar.

A Romina Piccinali, del Laboratorio de Eco-epidemiología de la FCEyN, quien me ayudó mucho con la aproximación evolutiva, con la mejor de las predisposiciones y una enorme calidez.

A Patricia y a Susana, del laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA por haber colaborado en esta tesis y por su enorme disposición.

A todos los integrantes del Instituto César Milstein (Fundación y Empresa Pablo Cassara) porque todos estos años de trabajo fueron muy especiales gracias a la sonrisa y gran disposición de todos siempre.

A Ceci Rodríguez, por habernos cruzado tan temprano en esta vida, por su amistad, por el camino recorrido juntas en estos pasillos y fuera de ellos.

A Agus Rimondi, por sus consejos, por las charlas, por la amistad, por estar muy presente.

A mis amigas de la facultad, porque aun hoy nos seguimos riendo mucho de los años que vivimos estudiando en esta facultad, por las fiestas, por las anécdotas y por la vigencia de esa amistad que tiene muchos años ya.

ÍNDICE

1.1. Marco general	11
1.2 El género <i>Xanthomonas</i>	11
1.2.a. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	13
1.3 La inmunidad vegetal	14
1.3.a. MAMPs y su reconocimiento.....	14
1.4. Señalización y diálogo hormonal en la defensa vegetal.....	19
1.5. Estrategias de evasión de las respuestas de defensa vegetal por parte de los patógenos ..	22
1.5.a Efectores proteicos y fitocromos con roles durante el proceso infectivo.....	22
1.5.b. Polisacáridos producidos por <i>Xcc</i>	24
1.6. Los estomas como parte de la respuesta inmunitaria de la planta.....	30
1.6.a. Señalización durante la apertura y cierre estomático	32
1.6.b. Toxinas que modulan la apertura estomática	35
1.7. Variación natural en <i>A. thaliana</i>	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	40
2.2. Compuestos químicos utilizados	41
2.3. Cepas bacterianas utilizadas	42
2.4. Ensayos de producción de xantano y determinación de viscosidad.....	44
2.5. Ensayo de adhesión de bacterias.....	44
2.6. Análisis <i>in vitro</i> de la formación de <i>biofilm</i> por Microscopía Confocal.....	44
2.7. Extracción y purificación de glucanos cíclicos periplasmáticos	45
2.7.a. Extracción de glucanos cíclicos periplasmáticos	45
2.7.b. Técnicas cromatográficas para purificar glucanos cíclicos periplasmáticos.....	45

2.7.c. Cuantificación de hidratos de carbono.....	46
2.8. Síntesis <i>in vitro</i> de [¹⁴ C] glucano β-(1,2) cíclico.....	46
2.9. Ensayos de infección con bacterias	47
2.10. Ensayos de medición de ERO.....	48
2.10.a. Ensayos de ERO en discos de hoja	48
2.10.b. Ensayos de ERO en células de la guarda	48
2.10.c. Medición de capacidad antioxidante de la coronatina.....	49
2.11. Ensayos de deposición de calosa.....	49
2.12. Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real	50
2.13. Ensayos de unión ligando-receptor	52
2.14. Medición de aperturas estomáticas.....	53
2.15. Preparación de extractos para purificar el <i>Xcc</i> FV	54
2.16. Mediciones de largo de raíz.....	55
2.17. Análisis de la variación natural en <i>A. thaliana</i>	56
OBJETIVOS DE ESTA TESIS.....	57
3. RESULTADOS.....	58
3.1. PARTE I. Mecanismo de inhibición del cierre estomático por <i>Xcc</i> y <i>Pst</i> DC 3000	58
3.1.a. Purificación preliminar del factor de virulencia de <i>Xcc</i> a partir de sobrenadantes de cultivo.....	58
3.1.b. Efecto del <i>Xcc</i> FV y de la coronatina en la producción de ERO en células de la guarda	63
3.1.c. El efecto inhibitorio de <i>Xcc</i> VF y de la coronatina en los estomas requiere NADPH oxidasas.....	66
3.1.d. La coronatina revela una posible regulación de ERO sobre componentes de la vía de señalización de ABA en estomas.....	69
3.1.e. El MeJA y la coronatina inhiben el cierre de estomas inducido por flg22 a través de mecanismos diferentes.....	73
3.1.f. El bacteriofitocromo de <i>Xcc</i> , <i>XccBphP</i> , modula la respuesta inmune de las plantas... 75	
3.1.g. Sensibilidad diferencial a coronatina en variantes naturales de <i>A. thaliana</i>	78
3.2. PARTE II Estudio de los mecanismos de acción del glucano β-(1,2) cíclico como supresor de la respuesta inmune vegetal.....	85

3.2.a. El glucano β -(1,2)-cíclico interfiere en la respuesta inmune inducida por flg22.....	85
3.2.b. El glucano β -(1,2)-cíclico suprime la deposición de calosa inducida por flg22 y disminuye la expresión de PR1 estimulada por flg22 y SA	87
3.2.c. El glucano β -(1,2)-cíclico modula la expresión de genes de respuesta temprana y la producción de ERO inducida por flg22.....	89
3.2.d. La virulencia de <i>Xcc</i> mediada por el glucano β -(1,2)-cíclico requiere dos proteínas quinasas con dominio LysM en <i>A. thaliana</i> , LYK3 y LYK4	90
3.2.e. Las membranas de <i>A. thaliana</i> poseen sitios de unión específicos a glucano β -(1,2)-cíclico.....	93
3.3. PARTE III Rol de los componentes estructurales del xantano en la virulencia de <i>Xcc</i>	94
3.3.a. Caracterización preliminar de cepas de <i>Xcc</i> productoras de distintas variantes estructurales de xantano	94
3.3.b. Adhesión bacteriana de las distintas variantes de EPS	96
3.3.c. Formación de <i>biofilm</i> de las distintas cepas.....	98
3.3. d. La composición del xantano y la virulencia de <i>Xcc</i>	101
3.3.e. Los grupos cetil piruvato y la manosa externa de la unidad repetitiva del xantano son necesarios para la deposición de calosa mediada por xantano	104
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	105
4.1. PARTE I. Mecanismo de inhibición del cierre estomático por <i>Xcc</i> y <i>Pst</i> DC 3000	105
4.1.a. Purificación del factor de virulencia estomático <i>Xcc</i> FV.....	105
4.1. b. Efecto de <i>Xcc</i> FV y coronatina en la producción de ERO en células de la guarda	106
4.1.c. Efecto de la coronatina en la regulación de componentes de la señalización de ABA en estomas a través de ERO.....	108
4.1.d. MeJA y coronatina: diferentes mecanismos de inhibición del cierre estomático inducido por flg22.....	111
4.1.e. Variantes naturales de <i>A. thaliana</i> con sensibilidad diferencial a coronatina.....	112
4.2. PARTE II. Estudios de los mecanismos de acción del glucano β -(1,2) cíclico como supresor de la respuesta inmune vegetal.....	113
4.2.a. El glucano β -(1,2) cíclico interfiere con la respuesta inmune inducida por flg22	113
4.2.b. La acción del glucano β -(1,2) cíclico requiere dos proteínas con dominios LysM en plantas de <i>A. thaliana</i>	115

4.2.c. El glucano β -(1,2) cíclico es capaz de unirse con relativa afinidad a membranas de <i>A. thaliana</i>	117
4.3. PARTE III Estudios de los dominios estructurales activos del xantano	118
4.3.a. Efecto de los sustituyentes y alteraciones en la unidad repetitiva del xantano en la adhesión y formación de <i>biofilm</i> de <i>Xcc</i>	118
4.3.b. Efecto de la estructura de EPS en la virulencia de <i>Xcc</i>	119
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	121
7. BIBLIOGRAFÍA.....	135

ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

EPS: exopolisacárido

MAMPs: microbe-associated molecular patterns

PTI: pathogen-triggered immunity

Flg22: péptido sintético de 22 aminoácidos que es parte de la proteína flagelina

ERO: especies reactivas de oxígeno

SA: Ácido salicílico

MeJA: Ácido metil jasmónico

ABA: Ácido abscísico

COI1: receptor de ácido jasmónico y coronatina

COR. Coronatina

Xcc **FV**: factor de virulencia de *Xcc*

MS: sales Murashige & Skoog

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Marco general

Los microbios patógenos, así como condiciones ambientales desfavorables, pueden resultar una amenaza para el crecimiento normal de una planta. Otros microbios (no patógenos), en cambio, pueden ser beneficiosos y útiles para proteger a la planta de otros atacantes, para promover su crecimiento o bien para ayudarla a sobreponerse de condiciones ambientales peligrosas para su ciclo de vida. Entre los microbios patógenos que interactúan con las plantas, encontramos virus, viroides, hongos y bacterias. Las bacterias son, por lejos, las más abundantes colonizadoras de las plantas (Lugtenberg, 2015). Debido a la enorme diversidad de microbios patógenos, y a la batería de instrumentos con los que cuentan para eludir la respuesta de defensa de las plantas, resulta de enorme importancia conocer los mecanismos mediante los cuales los patógenos evaden dicha barrera de defensa para poder contar con mayor número de elementos a la hora de establecer mecanismos de control de las enfermedades causadas por los patógenos. Esto cobra enorme relevancia a la luz de las pérdidas totales de lo que es cultivado a nivel mundial. Aproximadamente el 25% del total de lo cultivado en el mundo se pierde cada año, mayormente debido a enfermedades causadas por hongos y bacterias (Lugtenberg, 2015). Este no es un número despreciable si se tiene en cuenta que la población mundial está creciendo y se espera que, en 2050, necesitemos el doble de alimentos que lo que hoy es producido. Esta tesis tiene por propósito realizar un aporte en esta área, estudiando los mecanismos de interacción entre una bacteria fitopatógena y uno de sus hospedadores, la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

1.2 El género *Xanthomonas*

El género *Xanthomonas* está compuesto de un diverso grupo de especies bacterianas asociadas a plantas, todas juntas en el universo de las γ proteobacterias (Parkinson *et al.*, 2009). Las bacterias de este género son bacilos aerobios obligados móviles (con dimensiones en lo ancho de 0,2 - 0,6 μm y de largo entre 0,8-2,9 μm) (Figura 1A, B), Gram negativas, solitarios o filamentosos, sin

estados latentes (Figura 1A,B), y rodeados por un polisacárido extracelular denominado xantano (Swings, 1993). Como puede verse en la Figura 1C, la mayoría de las cepas forman en medio rico pigmentos amarillos insolubles, conocidos como xanthomonadinas unidos a la membrana celular. Asimismo, son productoras de una importante cantidad de enzimas degradativas, que juegan un rol importante durante la infección como glucosidasas, galactosidasas, mananasas, hidrolasas de almidón, ligninasas, quitinasas, celulastas y pectinasas (Swings, 1993).

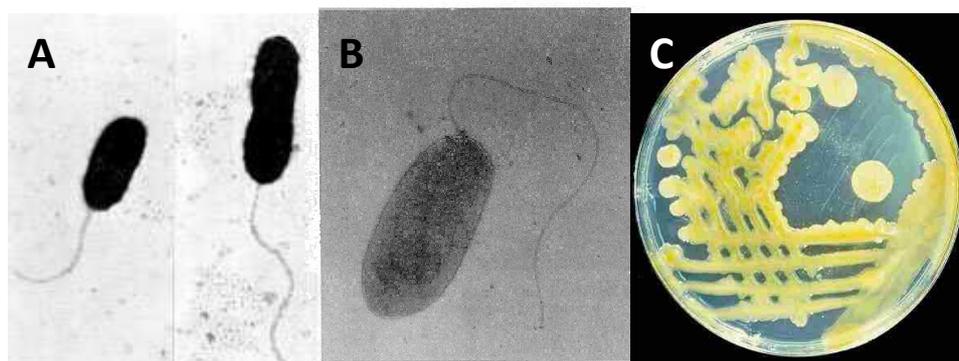


Figura 1. Bacterias del género *Xanthomonas*. A, Microscopía electrónica de un bacilo de *Xanthomonas oryzae* (<http://sian.inia.gob.ve/>). Microscopía electrónica de un bacilo de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (<http://sian.inia.gob.ve/>). C. Placa de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (<http://archive.bio.ed.ac.uk/>).

Estas bacterias son los agentes causales de una enorme variedad de periódicas y persistentes enfermedades de plantas, algunas de las cuales tienen gran importancia agronómica y económica, particularmente en regiones cuya subsistencia se basa en la agricultura y en aquellos países con escasos recursos de manejo de cultivos (Frederik Leyns, 1984; Heyward, 1993). Las especies que integran el género *Xanthomonas* tienen por hospedadores a un gran número de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas y son responsables de enfermedades que incluyen síntomas de marchitez vascular, canchros, manchas en las hojas y en los frutos y quemaduras foliares.

Cabe destacar que en nuestro país, otra especie del género, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), causa la enfermedad conocida como canchrosis bacteriana de los cítricos. Esta enfermedad resulta de gran importancia económica por las pérdidas que supone la dispersión de la bacteria. Se trata de una enfermedad endémica de Argentina y Brasil pero también está presente en Estados Unidos y Australia. Debido al carácter cuarentenario de la enfermedad, se imponen

barreras a la exportación de estos cultivos, lo que como ya fue mencionado, provoca enorme cantidad de pérdidas económicas (Gottwald *et al.*, 2002). Esta bacteria cobra relevancia ya que nuestro país es actualmente el octavo productor mundial de cítricos y primer productor mundial de limón. La producción total de cítricos de Argentina es de 2,5 millones de toneladas (Informe Federcitrus año 2015), en una superficie que abarca 150.000 hectáreas y, por el clima adecuado para el desarrollo de la enfermedad, es prioritario su estudio fitopatológico en nuestro país.

1.2.a. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Xcc es otra especie importante del género *Xanthomonas* debido a que es el patógeno responsable de la enfermedad de la podredumbre negra en miembros de la familia *Brassicaceae* (conocidas como crucíferas) de importancia agronómica en el mundo, como son el brécol (*Brassica napus*), col china (*Brassica pekinensis*), coliflor (*Brassica oleracea*), colza (*Brassica napus* var. *oleifera*), nabo (*Brassica rapa*), rábano (*Raphanus sativus*), mostaza (*Brassica nigra*) y, especialmente, en repollo (*Brassica fruticulosa*). Tal es su importancia que esta especie bacteriana se ubica en el 5° puesto en la nómina de las diez especies fitopatógenas con mayor impacto en la agricultura (Lugtenberg, 2015). Dentro de la familia *Brassicaceae*, encontramos también a *A. thaliana*, un modelo en el estudio de plantas y hospedador de *Xcc*. Es una de las especies más estudiadas hasta la actualidad. Las condiciones óptimas para su crecimiento son las altas temperaturas (25-35°C) y alta humedad (80-100%), por lo que las áreas de cultivo tropicales se ven seriamente afectadas, especialmente en temporada de lluvias. Como puede observarse en la Figura 2, esta bacteria provoca lesiones cloróticas o necróticas en forma de V al invadir la planta a través de hidatodos. También pueden colonizar la planta a través poros estomáticos o heridas. Una vez dentro, colonizan los tejidos vasculares, interrumpiendo el transporte de agua, causando así una necrosis foliar, marchitez y vuelco de las partes afectadas (Wang *et al.*, 2015).



Figura 2. Síntomas provocados por la infección de Xcc en Brassica oleracea, Brassica fruticulosa y en A. thaliana. A, podredumbre negra en hoja de coliflor; **B,** lesiones en los bordes de hoja de repollo; **C,** lesiones cloróticas en hojas de *A. thaliana*. The Center of Agriculture, food and the environment (<http://ag.umass.edu/fact-sheets/brassic-as-black-rot>).

1.3 La inmunidad vegetal

1.3.a. MAMPs y su reconocimiento

Las plantas y los animales han evolucionado sofisticados sistemas de percepción para discriminar entre lo propio y lo ajeno y son capaces de activar respuestas de defensa complejas y en múltiples capas (Wang, 2015). Las plantas se protegen contra la mayoría de los microbios a través de barreras físicas, como las paredes celulares, las cutículas y compuestos antimicrobianos superficiales (García-Brugger *et al.*, 2006; Nurnberger *et al.*, 2004; Zipfel, 2014). Cuando potenciales patógenos entran en contacto con las plantas, las células vegetales reconocen moléculas conservadas que disparan la respuesta de defensa basal. Estas moléculas se conocen como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs del inglés *microbe-associated molecular patterns*, antiguamente llamados PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*, porque están asociadas al reconocimiento de un patógeno). Los MAMPs son moléculas altamente conservadas y abundantes dentro de un espectro muy amplio de microbios y repercuten en su *fitness* y supervivencia ya que mutaciones en los mismos pueden tener un costo adaptativo para el patógeno (Wang, 2015). Dado que el hospedador vegetal no posee estos MAMPs, las plantas reconocen a estas moléculas como algo ajeno, extraño y por ello pueden desencadenar una respuesta contra el potencial patógeno. Ejemplos de MAMPs incluyen la quitina de los hongos, los glucanos β lineales de oomicetes, la flagelina, el factor de elongación Tu (EF-Tu) y los peptidoglicanos de bacterias (PGN), entre otros. Además de los MAMPs, existe otra clase de moléculas endógenas, derivadas de las plantas, antiguamente llamadas “inductores endógenos” y hoy conocidas como DAMPs (del inglés *damage-associated molecular patterns*). Los DAMPs son moléculas endógenas que aparecen en el espacio intercelular en respuesta al daño causado, por ejemplo, por un patógeno. Entre los ejemplos de estas moléculas, encontramos fragmentos de pared celular o efectores derivados de proteínas vegetales citoplasmáticas. Algunos DAMPs no derivan de estructuras dañadas, sino que son sintetizados por la planta en respuesta al ataque. Uno de ellos es el péptido endógeno conocido como Pep1 de *A. thaliana*,

generado por clivaje de la región C-terminal la proteína precursora PROPEP1, cuyo gen codificante se induce fuertemente en respuesta a la degradación de la pared celular, daño mecánico y hormonas como ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) (Krol *et al.*, 2010).

Los MAMPs son sensados por receptores (PRR del inglés *pattern recognition receptors*) en la superficie de la célula vegetal. Algunos de estos PRRs, pertenecen a la familia de receptores quinasas ricos en leucina mientras que otros pertenecen a la familia de receptores con dominios ricos en lisina (Monaghan and Zipfel, 2012). Por su parte el DAMP Pep1 es percibido por los receptores PEPR1 y PEPR2, los cuales también pertenecen a la familia de receptores quinasas ricos en leucina (Yamaguchi *et al.*, 2006) (Figura 3).

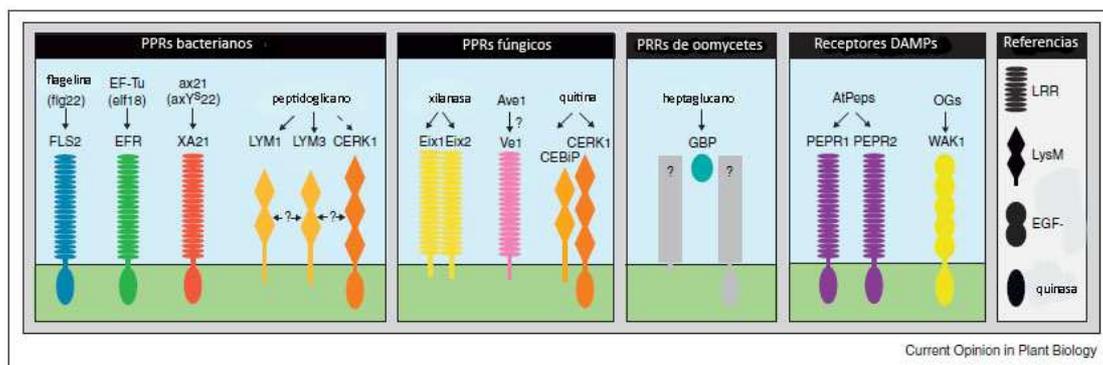


Figura 3. Receptores de ligandos conocidos. FLS2 reconoce a la flagelina bacteriana o a un péptido artificial derivado de la flagelina llamado flg22 en *A. thaliana*, tomate, arroz y *Nicotiana benthamiana*. El receptor específico de la familia Brassicaceae EFR, reconoce el factor de elongación bacteriano (Ef-Tu) o a al péptido derivado de Ef-Tu, elf-18. El receptor XA21 percibe el péptido ax21 derivado de la proteína de *Xanthomonas oryzae* en arroz. LYM1 y LYM3 son receptores con dominio LysM que perciben PGN mientras que CERK1 una débilmente PGN. A pesar de no haber sido probado, se hipotetiza que estos receptores pueden formar complejos que perciben PGN. El MAMP fúngico xilanasa es percibido por los receptores Eix1 y Eix2 en tomate, mientras que Ave1 es percibido por el receptor Ve1 en tomate. Por su parte, la quitina es percibida en arroz por el receptor CEBiP que interactúa con CERK1, mientras que en *A. thaliana* CERK1 actúa como receptor de quitina. En legumbres, una proteína conocida como GBP (del inglés *glucan binding protein*) reconoce al heptaglicano de *Phytophthora*. Aun no se conoce con cuáles otras proteínas interactúa en ese reconocimiento. Los receptores PEPR1 y PEPR2 reconocen los péptidos Pep que se sintetizan frente a daños mecánicos o cambios hormonales en la planta. Finalmente, los oligogalacturónidos (OGs) son percibidos por el receptor WAK1 (Monaghan and Zipfel, 2012).

Los PRRs disparan respuestas de defensa que pueden prevenir la colonización de una planta por un patógeno. Tradicionalmente esta primera línea de defensa se denomina inmunidad inducida por MAMPs (PTI, del inglés *PAMP-triggered immunity*) (Boller and Felix, 2009). Luego del reconocimiento, la respuesta de defensa comienza con rápidos flujos de iones a través de la membrana plasmática, seguidos de una cascada de señalización que incluye la activación de

MAP quinasas (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) y de quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), cambios rápidos en la expresión de genes, un refuerzo en la pared celular a través de la deposición de calosa, un glucano β -(1,3) lineal, y cambios en los patrones fotosintéticos (Gohre *et al.*, 2012; Segonzac and Zipfel, 2011).

Como mencionábamos, la deposición de calosa es una de las respuestas de las plantas frente al ataque de patógenos. La calosa está compuesta por un polímero amorfo de alto peso molecular que químicamente se corresponde con un glucano β -(1,3) lineal. Este polímero sirve como una matriz para que se depositen compuestos antimicrobianos sintetizados para la defensa, y así puedan estar concentrados en los sitios de ataque del patógeno (Luna *et al.*, 2011). Si bien típicamente la deposición de calosa ocurre cuando las plantas perciben los MAMPs (Gomez-Gomez *et al.*, 1999), también ha sido reportado que un conjunto de compuestos químicos actúan como inductores de la deposición de calosa, tales como el ácido salicílico (SA) y su análogo benzotidiazol (BTH) (Kohler *et al.*, 2002) y también el aminoácido modificado ácido β -aminobutírico (BABA) (Ton and Mauch-Mani, 2004; Zimmerli *et al.*, 2000).

Entre las respuestas de defensa iniciadas frente al reconocimiento de MAMPs, la producción de ERO es una de las más rápidas, comenzando a pocos minutos luego del reconocimiento de los MAMPs. Se ha propuesto que la producción de ERO podría actuar como reforzador de la pared celular para bloquear la entrada del patógeno, o bien como segundos mensajeros locales y sistémicos para disparar respuestas adicionales, como la expresión de genes o el cierre estomático (Kadota *et al.*, 2015). En el marco de la respuesta de defensa, la producción de ERO depende predominantemente de la NADPH oxidasa D (RBOHD, del inglés *respiratory burst oxidase homologue D*). La mutante *rbohD* de *A. thaliana* no produce ERO durante el tratamiento con MAMPs y lo produce muy débilmente frente a la exposición con un patógeno (Nuhse *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2002). Si bien los mecanismos regulatorios finos de activación de RBOHD para dar lugar a la producción de ERO no están del todo elucidados, hoy sabemos que el Ca^{2+} apoplástico es necesario para la producción de ERO mediado por MAMPs (Kadota *et al.*, 2014; Segonzac *et al.*, 2011). Recientemente fue publicado que la quinasa BIK1 (del inglés *Botrytis-induced kinase 1*),

interactúa directamente con RBOHD, fosforilándola, y dando como resultado su activación (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Asimismo también ha sido reportado que las CDPKs son importantes en la regulación de RBOHD ya que tanto la CDPK4 y CDPK5 en tomate fosforilan directamente la RBOHB de esa misma especie de modo dependiente de Ca^{2+} (Kobayashi *et al.*, 2007). Las RBOHBs poseen motivos de unión a Ca^{2+} , a través sus extremos N-terminal, denominados “*EF-hands*”, mediante los cuales este catión ejerce una importante regulación de la actividad de estas enzimas (Kadota *et al.*, 2015; Kadota *et al.*, 2014).

1.3.b. La flagelina y su percepción a través de su receptor FLS2

La flagelina es la principal proteína constituyente del flagelo bacteriano y es reconocida por animales y plantas (Wang, 2015; Zipfel and Felix, 2005). Esta proteína es un importante inductor de la respuesta inmune. Del análisis de fragmentos sintéticos de la proteína, resultó que la mínima porción capaz de inducir la respuesta inmune en plantas era un fragmento N-terminal de 22 aminoácidos que fue denominado flg22 (Zipfel and Felix, 2005). Estudios adicionales han demostrado que un polimorfismo en un único aminoácido dentro de la flagelina en diferentes aislamientos de *Xcc* las hace diferir en su habilidad para inducir la respuesta de defensa de la planta (Sun *et al.*, 2006).

Un receptor del tipo PRR muy bien estudiado es FLS2 (del inglés *flagellin sensing 2*), un receptor de la familia de receptores ricos en leucina o LRR-RLK (del inglés *leucine-rich repeat receptor like kinase*) que reconoce a la flagelina bacteriana y al péptido derivado flg22. Dicha proteína receptora fue hallada a través de un *screening* de mutantes insensibles a flg22 (Chinchilla *et al.*, 2006; Gomez-Gomez and Boller, 2000). La flagelina se une a FLS2 y rápidamente lo induce a interactuar con otro LRR-RLK denominado BAK1 (del inglés *BRI1-associated receptor kinase 1*) (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007). La interacción entre FLS2 y BAK1 produce fosforilaciones cruzadas (Schulze *et al.*, 2010), la síntesis de ERO, la activación de quinasas y oscilaciones de Ca^{2+} (Boller and Felix, 2009; Boudsocq *et al.*, 2010; Schwessinger *et al.*, 2011). La cascada de señalización continúa con una reprogramación transcripcional, inducción de la expresión de factores de transcripción (Navarro *et al.*, 2004) y la promoción de la deposición de calosa para atenuar la entrada del patógeno (Boller and Felix, 2009). Se ha descrito que el

tratamiento con el péptido sintético flg22 también conduce a la acumulación de SA como molécula clave en la defensa (Mishina and Zeier, 2007; Tsuda *et al.*, 2008a; Tsuda *et al.*, 2008b), y que a su vez, en una retroalimentación positiva para amplificar la señal de defensa, el SA potencia la producción de ERO inducida por flg22 (Sato *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014). Todas estas respuestas llevan a un aumento de la defensa de las plantas y consecuentemente se ha observado que las mutaciones que afectan la expresión de FLS2 hacen a las plantas más susceptibles al ataque de patógenos (Zipfel *et al.*, 2004).

1.3.c. Peptidoglicanos (PGN), factores NOD y sus receptores

El PGN, componente estructural de la pared celular de las bacterias Gram positivas y negativas, es otro importante inductor de la respuesta inmune (Gust *et al.*, 2007). El PGN, de naturaleza glucosídica, está formado por unidades repetitivas alternadas entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. Se ha reportado que el PGN purificado induce la respuesta de defensa en plantas (Clay *et al.*, 2009; Erbs *et al.*, 2008; Gust *et al.*, 2007).

Por su parte, las bacterias del género *Rhizobium* secretan lipoquitinolisacáridos conocidos como factores de nodulación (factores NOD), los cuales son necesarios para el establecimiento de las relaciones simbióticas con sus hospedadores (Gough and Cullimore, 2011). Los factores NOD consisten en un esqueleto de quitina acoplado a un azúcar no reductor y a un ácido graso, que puede variar en largo y saturación (Oldroyd and Downie, 2008). El reconocimiento de los factores NOD define la especificidad con el hospedador e inicia la formación del nódulo que dará lugar a la fijación de nitrógeno, como comunión de la relación simbiótica (Gough and Cullimore, 2011). En *Lotus corniculatus*, se ha demostrado que los factores NOD inducen respuestas transitorias de defensa (Nakagawa *et al.*, 2011) mientras que en *A. thaliana* se ha reportado que estos compuestos tienen la capacidad de suprimir respuestas de defensa inducidas por flg22 (Liang *et al.*, 2013).

Los receptores de PGN fueron recientemente identificados en *A. thaliana* y denominados LYM1 y LYM3 (Willmann *et al.*, 2011). Estos receptores, a diferencia de FLS2, pertenecen al grupo de receptores con dominios extracelulares ricos en lisina, denominados dominios LysM. A través

de ensayos de inmunoprecipitación se demostró que las moléculas de PGN coprecipitan con proteínas LYM1 y LYM3 con una marca de histidina (Willmann *et al.*, 2011). Por otra parte plantas mutantes de *A. thaliana* afectadas en la expresión de estos receptores son insensibles a PGN, demostrando que tanto LYM1 como LYM3 son necesarios para su percepción.

En *L. corniculatus* var. *japonicus*, la percepción de los factores NOD de *Rhizobium spp.* es llevada a cabo por las proteínas NFR1 y NFR5, las cuales poseen un dominio intracelular con actividad quinasa, un dominio transmembrana y dos o tres dominios extracelulares del tipo LysM, respectivamente (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003).

1.4. Señalización y diálogo hormonal en la defensa vegetal

La activación de la respuesta inmune en la planta está finamente regulada, asegurándose una respuesta eficiente pero a la vez controlada contra patógenos bacterianos, fúngicos, virales y herbívoros como los insectos (Vos, 2013). El reconocimiento de patógenos atacantes trae como resultado la acumulación de moléculas de señalización muy importantes como las hormonas SA y JA y sus derivados, las cuales juegan un rol preponderante en la activación de respuestas de defensa río abajo de su acumulación (Caarls *et al.*, 2015). En términos generales, el SA activa la resistencia de la planta frente a patógenos biótropos, es decir aquellos que no matan al hospedador sino que, una vez dentro de él, provocan síntomas sin causar muerte celular extendida, mientras que el JA es la hormona crítica para la activación de la defensa contra patógenos necrótrofos, aquellos que necrosan el tejido del hospedador, e insectos herbívoros (Caarls *et al.*, 2015). Los caminos de señalización de SA y JA son interdependientes y actúan en complejas redes. Existen otras hormonas que participan en estas redes de señalización y que son capaces de modular algunas respuestas desencadenadas por SA y JA. Un ejemplo de ello es el ácido abscísico (ABA) y el ET que pueden actuar de modo sinérgico junto al JA de manera de antagonizar respuestas desencadenadas por SA. Asimismo, las auxinas, giberelinas y citoquininas pueden reprimir respuestas de defensa en virtud de priorizar el crecimiento de la planta y, al revés, tanto el SA como el JA pueden antagonizar esta respuesta de crecimiento para reforzar la defensa contra patógenos (Pieterse *et al.*, 2012).

En la señalización de SA es clave la actividad de un factor de transcripción maestro y coregulador de la expresión de genes asociados a SA, conocido como NPR1 (Fu and Dong, 2013). El SA induce una respuesta de fluctuación bifásica en el estado redox de la célula que puede ser sentido por NPR1, que pasa de su estado oligomérico a su estado monomérico por la reducción de sus puentes disulfuro. Estos monómeros de NPR1 viajan al núcleo. La regulación de los niveles de NPR1 en el núcleo también depende de SA. NPR3 y NPR4, los homólogos de NPR1, fueron descritos como los receptores de SA (Fu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Estos receptores actúan como proteínas adaptadoras que median en la degradación de NPR1. La diferencia entre NPR3 y NPR4 es la afinidad con la que se unen a SA y a NPR1. Cuando los niveles de SA son bajos, NPR4 se une a NPR1 y lo conduce a la degradación, bloqueando la activación de genes de respuesta a SA. Si los niveles de SA son altos, la unión entre NPR1 y NPR3 se facilita, lo que también lleva a la degradación de NPR1, y activa la muerte celular programada en la zona atacada por el patógeno, ya que se sospecha que NPR1 es un regulador negativo de esa respuesta (Fu *et al.*, 2012). Cuando los niveles de SA son intermedios, no se produce la interacción de NPR1 con NPR3, y NPR1 puede acumularse y activar la defensa dependiente de SA. Esta molécula puede interactuar así con factores de transcripción de la familia TGA, induciendo de esta manera genes de respuesta dependientes de SA como *PR1* (del inglés *pathogenesis-related 1*) así como también factores de transcripción de la familia WRKY, que amplifican río abajo la señal (Caarls *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2006). Esta familia de proteínas, conocidas como proteínas WRKY están caracterizadas por su unión a secuencias consenso de ADN (W-box TGAC) presentes en los promotores de muchos genes relacionados con la defensa (Du and Chen, 2000; Kalde *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2005). Adicionalmente, la activación, señalización y expresión de MAPK es uno de los eventos más tempranos involucrados en la inmunidad vegetal (Asai *et al.*, 2002).

Con respecto a la señalización de JA, podemos decir que los grandes reguladores maestros de esta ruta son la proteína COI1 (del inglés *coronatine insensitive 1*) del tipo F-box, receptor de JA, y los represores JAZ, siendo COI1 la proteína que guía a las proteínas JAZ al proteasoma para su posterior degradación. En ausencia de JA, los represores JAZ reprimen varios factores de transcripción, entre los cuales encontramos a MYC2, EIN3, EIL1 (Song *et al.*, 2014). En presencia

de JA, COI1 se une al conjugado JA-Ile, la forma bioactiva de esta hormona, lo que da por resultado el envío de las proteínas JAZ a degradación. Ya sin las proteínas JAZ, se activan una serie de genes en respuesta a JA. Desde hace años, se ha podido distinguir dos ramas dentro de la vía de señalización de JA: la rama MYC, que es co-regulada por ABA y JA, en la cual MYC2 es el regulador maestro y que permite la activación río abajo de los genes *VSP2* y *LOX2*, y la rama ERF que tiene a ERF1 y a ORA59 como dos de sus reguladores maestros y que está co-regulada por JA y ET, activando el marcador río abajo *PDF1.2* (del inglés *plant-defensin 1.2*) (Pieterse *et al.*, 2012; Wasternack and Hause, 2013; Zhu *et al.*, 2011) (Figura 4). La rama MYC2 está mayormente asociada a la respuesta contra insectos y daño mecánico mientras que la rama ERF está más involucrada en la defensa contra hongos.

Recientemente se ha reportado que la supresión de la señalización de JA por acción de SA está predominantemente regulada a nivel de la transcripción (Van der Does *et al.*, 2013). El diálogo entre SA y JA mostró ser independiente de la biosíntesis de JA, produciéndose la supresión de SA sobre el gen de respuesta a JA *PDF1.2* independientemente de COI1 (Leon-Reyes *et al.*, 2010). Asimismo, pudo verse que la proteína ORA59, factor de transcripción de la rama ERF involucrada en la respuesta contra hongos necrótrofos, es enviada a degradación por SA (Van der Does *et al.*, 2013).

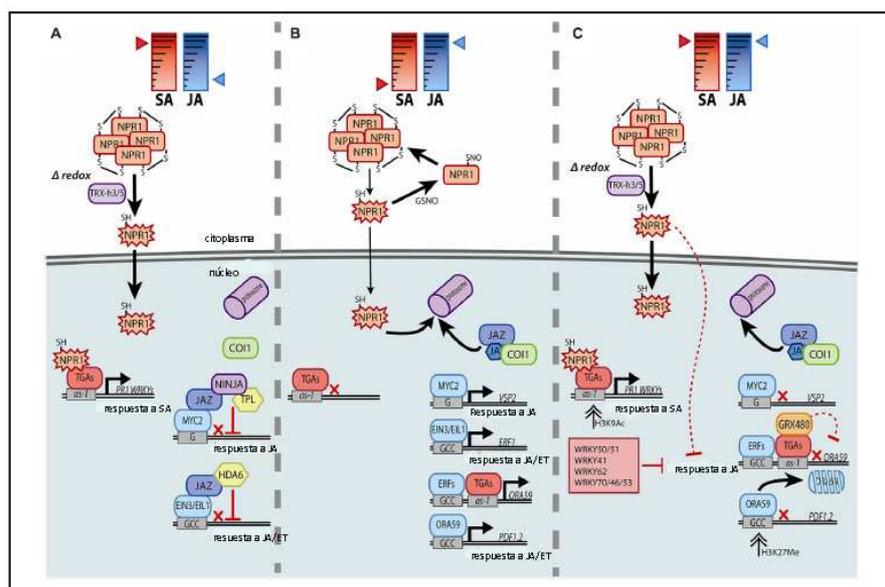


Figura 4. Modelo simplificado de la maquinaria molecular involucrada en la regulación transcripcional de la señalización de hormonas vegetales (A), SA (B) JA, (C) el antagonismo entre SA y JA (Caarls *et al.*, 2015).

1.5. Estrategias de evasión de las respuestas de defensa vegetal por parte de los patógenos

Frente a la barrera de defensa impuesta por las plantas, los patógenos han evolucionado en una serie de “armas” para evadir el reconocimiento, bloquear o suprimir, en algún grado, la PTI en sus respectivos hospedadores. Dentro de enorme universo de estrategias, muchos patógenos producen toxinas de naturaleza no proteica y proteica que ayudan a eludir la respuesta de defensa montada por las plantas, como las que desarrollaremos más adelante.

1.5.a Efectores proteicos y fitocromos con roles durante el proceso infectivo

Muchos patógenos bacterianos suprimen la PTI a través de las proteínas efectoras inyectadas a través de sistema de secreción de tipo III en la célula vegetal, las cuales actúan sobre blancos específicos y cuyo efecto es impedir o atenuar la respuesta defensiva de la planta (Macho and Zipfel, 2015). Algunos ejemplos de efectores son HopU1, efector de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*Pst* DC 3000) (Jeong *et al.*, 2011; Nicaise *et al.*, 2013), AvrPtoB, presente en algunos patovares de *P. syringae* (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009b; Gohre *et al.*, 2008), o bien el efector XopAC de *Xcc* (Feng *et al.*, 2012), entre otros muchos descriptos. Una estrategia muy interesante utilizada por algunas especies del género *Pseudomonas*, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pst* DC 3000, es secretar una proteasa alcalina denominada AprA, la cual es capaz de degradar monómeros de flagelina, aunque no la flagelina polimérica que forma parte del flagelo, evitando así la interacción de la proteína con el receptor FLS2 en el caso de los vegetales y con el receptor TLR5 en el caso de los animales. Esto da por resultado que, tanto en animales como plantas, las respuestas de defensa se vean ostensiblemente inhibidas, como ocurre con la activación de la interleuquina 8 (IL-8), el interferón gamma (IFN- γ) en células animales o la disminución en la expresión de genes de defensa como *PR1* o *FRK1* en *A. thaliana* (Bardoel *et al.*, 2011; Pel *et al.*, 2014).

En aras de colonizar con mayor éxito a sus hospedadores, las bacterias han desarrollado mecanismos complejos, algunos de los que muy poco se sabe aún. Como sabemos, la luz lleva energía vital para nuestro planeta pero también provee información espacio-temporal cifrada en

periodos de luz-oscuridad y en la calidad y cantidad de luz sensada por los organismos en todos los reinos. Los fotorreceptores biológicos, también llamados fitocromos, detectan la luz sensando la longitud de onda y la intensidad, transduciendo esa información en distintas rutas de señalización celular. Durante mucho tiempo, no hubo evidencia de la existencia de fotorreceptores en organismos procariotas no fotosintéticos. Sin embargo, durante la última década, muchos estudios mostraron que estas proteínas juegan un rol importante en la fisiología de las bacterias así como en su patogenicidad. Particularmente fue reportado que el proceso infectivo es regulado por un fotorreceptor de luz azul, LOV-HK, del patógeno de mamíferos *Brucella abortus*, en el endosimbionte de plantas *Rhizobium leguminosarum*, y en la bacteria fitopatógena *X. citri* (Bonomi *et al.*, 2012; Kraiselburd *et al.*, 2012; Swartz *et al.*, 2007). Los fitocromos son fotosensores que pueden transducir la luz por una reconversión reversible entre una forma que absorbe la porción del espectro correspondiente al rojo (Pr) y una forma que absorbe la fracción del espectro correspondiente al rojo lejano (Pfr). Este proceso es iniciado por la fotoisomerización de un cromóforo covalentemente unido, un tetrapirrol de cadena abierta (Rockwell *et al.*, 2006). Si bien los fitocromos fueron descritos originalmente en plantas, han sido encontrados también en otros organismos como cianobacterias, bacterias y hongos (Rockwell *et al.*, 2006). Aún con esta evidencia, los roles biológicos de la mayoría de los fitocromos bacterianos (BphP) se desconocen y sólo muy pocos BphPs han sido relacionados con respuestas biológicas que permitan a las bacterias mejorar su estrategia de colonización (Davis *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2013).

Al tiempo que los patógenos desarrollan efectores para batallar con las defensas de la planta, éstas accionan con unas proteínas, llamadas R, que directa o indirectamente reconocen los efectores de tipo III. El reconocimiento de los efectores tipo III por las proteínas R de las plantas se conoce como inmunidad inducida por efectores (ETI, del inglés *effector-triggered immunity*). La ETI se caracteriza por un rápido aumento de ERO y por la muerte celular en la zona atacada por el patógeno, también conocida como respuesta hipersensible (HR, del inglés *hypersensitive response*) (Bittel and Robatzek, 2007; Jones and Dangl, 2006). Todo lo mencionado anteriormente puede sintetizarse en el modelo evolutivo conocido como modelo *zigzag*, que se resume en la Figura 5.

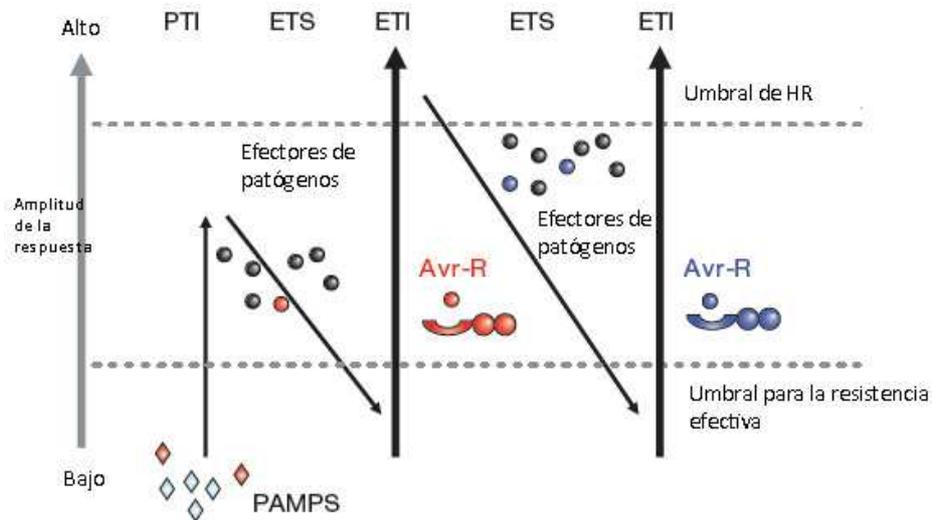


Figura 5. Esquema del modelo zigzag durante la defensa de la planta frente al ataque de patógenos. En la primera fase, los MAMPs (PAMPs, diamantes rojos) son reconocidos por sus PRRs para desencadenar la PTI. En la segunda fase, los patógenos más exitosos envían proteínas efectoras para interferir con la PTI, dando lugar a la ETS (del inglés *effector triggered susceptibility*). En la tercera fase, alguno de esos efectores (marcado en rojo) será reconocido por una proteína de la planta, que desencadenará la ETI, que amplificará la la respuesta iniciada por la PTI, dando incluso lugar a la respuesta de hipersensibilidad (HR) (Jones and Dangl, 2006).

Hasta aquí, hemos dado algunos ejemplos de moléculas proteicas efectoras que colaboran con la bacteria para suprimir la respuesta de la planta, en su estrategia de colonización. Sin embargo, existen otros compuestos producidos por las bacterias de naturaleza no proteica, como el glucano β -1,2 cíclico y el xantano y que también poseen importantes roles como factores de virulencia durante el proceso infeccioso.

1.5.b. Polisacáridos producidos por *Xcc*

1.5.b.i. El glucano β -1,2 cíclico

Xcc sintetiza un glucano cíclico neutro que está formado por 16 residuos de glucosa, 15 unidos por enlaces del tipo β -1,2 y el restante unido por un enlace α -1,6 (Figura 6). Los glucanos cíclicos pueden estar asociados al espacio periplasmático de la bacteria o bien ser liberados al medio extracelular.

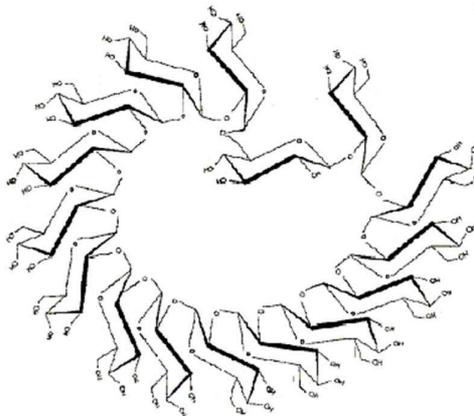


Figura 6. Estructura de glucano β -1,2 cíclico.(Bohin, 2000)

En *Xcc* y en *X. citri* se han identificado dos genes implicados en su síntesis: *hrpM* (del inglés *hypersensitive response pathogenicity*) y *ndoB* (del inglés *nodule development B*) (Malamud *et al.*, 2012; Rigano *et al.*, 2007a). La disrupción del gen *hrpM* ocasiona en la bacteria una pérdida de movilidad, una pérdida de virulencia en la infección y menor capacidad de organizarse en comunidades, conocidas como *biofilms* en *X. citri*. La organización de las bacterias en *biofilms* les permite protegerse de condiciones adversas (Malamud *et al.*, 2012).

Los glucanos cíclicos son producidos por un número de bacterias, entre las que contamos *Xanthomonas spp.*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti* y *B. abortus* (Bohin, 2000). Se ha demostrado la importancia de los glucanos cíclicos en un número de interacciones simbióticas como aquellas establecidas con *B. japonicum* y *Sinorhizobium meliloti*. También en interacciones planta-patógeno se ha visto la importancia de los glucanos cíclicos, como aquella descrita en *A. tumefaciens* (Inon de Iannino *et al.*, 1998) y *P. syringae* (Loubens *et al.*, 1993). En *Xcc*, estudios de la función de los glucanos cíclicos demostraron su rol en la enfermedad, actuando como supresores de la respuesta inmune activada por la planta. Se ha demostrado que el glucano β -1,2 cíclico induce, local y sistémicamente, la susceptibilidad a *Xcc* en plantas de *A. thaliana* y *N. Benthamiana*, suprimiendo la deposición de calosa y retrasando la expresión de un gen relacionado con la defensa, *PR1* (Rigano *et al.*, 2007a). En *P. syringae* se ha visto que la falta de glucanos cíclicos también reduce la capacidad de formar *biofilm* (Penaloza-Vazquez *et al.*, 2010) y que esta cepa posee un muy

reducido potencial de infección en *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Minsavage *et al.*, 2004). Reportes previos han demostrado que los glucanos cíclicos son requeridos para la efectiva formación del nódulo de la bacteria fijadora de nitrógeno *R. meliloti*, y para la inducción del tumor producido por *A. tumefaciens* (Wang *et al.*, 2015). En ensayos competitivos de unión a membranas de soja (*Glycine max*) pudo demostrarse que los glucanos cíclicos de *B. japonicum* son capaces de desplazar un hepta β glucósido (HG-APEA) que se une de modo específico, saturable y reversible a un potencial receptor de glucano en soja, sugiriendo que es posible que los glucanos cíclicos de *B. japonicum* sean percibidos por un receptor en esta planta. Se ha mostrado también la capacidad de los glucanos cíclicos de *B. japonicum* en la supresión de la síntesis de fitoalexinas en cotiledones de soja (Bhagwat *et al.*, 1999).

Como fue mencionado en la Sección 1.3.c, los receptores de los factores NOD, NFR1 y NFR5, en leguminosas poseen dominios extracelulares del tipo LysM. Es interesante que estas proteínas están muy relacionadas evolutivamente con otro receptor de *A. thaliana* con dominios LysM que percibe la quitina, CERK1 (del inglés *chitin elicitor receptor kinase 1*) (Miya *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2011), indicando que estas proteínas con dominios LysM son capaces de percibir moléculas que poseen efectos diferentes: inductores de la defensa, como la quitina y factores NOD, con roles en la simbiosis. En estudios recientes en *A. thaliana*, fue reportado que receptores quiméricos formados por el dominio extracelular de los receptores NFR1 y NFR5 de *Lotus japonicus* y el dominio intracelular de CERK1 de *A. thaliana*, son capaces de percibir los factores NOD y que éstos inducen, a través de esta quimera, ERO y genes relacionados con la defensa como MPK3, WRKY33 Y 53 (Wang *et al.*, 2014). En estudios comparativos entre las respuestas de defensa y las simbióticas, fue visto que al incubar plántulas de *Lotus japonicus* con su simbiote, *Mesorhizobium loti*, o con flagelina, se disparaban las respuestas de defensa (acumulación de la hormona etileno, activación de MAPKs, expresión de genes de defensa). Sin embargo, cuando las plántulas de esta leguminosa se incubaban con la flagelina purificada a partir de una preparación de *Mesorhizobium loti*, la respuesta de defensa no se inducía, lo cual sugiere que la flagelina de *M. loti* no actúa como un inductor de la respuesta inmune, pese a que el extracto completo de dicha bacteria sí posee inductores que son percibidos por la leguminosa. Esto permite conjeturar que las leguminosas son capaces de reconocer compuestos inductores de la

defensa, logrando activarla tempranamente pero, es probable, que durante la evolución, estas plantas que reconocen los factores NOD hayan adquirido la capacidad de suprimir esta inducción de la defensa para dar lugar al establecimiento de la simbiosis (Lopez-Gomez *et al.*, 2012; Nakagawa *et al.*, 2011).

En *A. thaliana*, se han identificado cinco receptores con dominios LysM ricos en lisina (Tanaka *et al.*, 2013), entre los que se cuenta al receptor de la quitina, CERK1 (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Estos receptores con actividad quinasa con dominios ricos en lisina (LYK, del inglés LysM receptor kinases) están muy emparentados con los receptores de factores NOD en legumbres. También fue reportado que *A. thaliana* es capaz de percibir los factores NOD suprimiendo así la respuesta inmune de la planta inducida por flg22. Particularmente fue demostrado que las plantas mutantes en un receptor con dominio LysM, LYK3, son insensibles a la supresión por parte de los factores NOD de la producción de ERO inducida por flg22, mostrando que LYK3 podría estar involucrado en la percepción o señalización de los factores NOD en *A. thaliana* (Liang *et al.*, 2013). Recientemente, fue reportado en *L. japonicus* la existencia de un receptor con dominios LysM capaz de unirse a un exopolisacárido de *M.loti*, denominado EPR3 (del inglés *exopolysaccharide receptor 3*) y, de cuya unión depende el ingreso de esta bacteria a la planta y la virulencia de la infección (Kawaharada *et al.*, 2015).

1.5.b.ii. El Xantano

El xantano de *Xcc* es un exopolisacárido (EPS), liberado por la bacteria al medio extracelular. Como ha sido estudiado, las bacterias viven en comunidades organizadas, llamadas *biofilms*. La formación de estructuras de *biofilm* requiere de la producción de xantano ya que mutantes defectivas en dicho polisacárido no logran formar estas estructuras (Rigano *et al.*, 2007b; Torres *et al.*, 2007). Asimismo, se ha reportado la importancia del xantano en la protección de las comunidades bacterianas organizadas en *biofilms* frente a distintos tipos de estrés como cambios bruscos de temperatura, cambios de pH, radiación UV, cambios osmóticos fuertes y desecación (Flemming, 1993). La mutante de *Xcc* incapaz de sintetizar xantano (*Xcc gumB*) presenta un aspecto muy seco, a diferencia de lo observado en la cepa silvestre, ya que este EPS cumple un

rol muy importante en la retención de moléculas de agua (Becker *et al.*, 1998). Se ha demostrado también que el xantano es un importante factor de virulencia durante el proceso infeccioso además de tener usos muy extendidos en la industria como emulsionante y espesante (Aslam *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 1998; Enrique *et al.*, 2011; Kakkar *et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2006).

En términos estructurales, el xantano consiste en un polisacárido compuesto por unidades repetitivas de cinco azúcares: dos glucosas, dos manosas y un ácido glucurónico. Una vez polimerizadas las unidades repetitivas para dar el producto final, el xantano, su estructura consiste en una celulosa modificada, es decir: una cadena lineal de celulosa en uniones β -1,4, con cadenas laterales trisacáridicas compuestas por una manosa unida β -1,4 a un ácido glucurónico que a su vez está unido a otra manosa por enlaces β -1,2. Este trisacárido se une al disacárido de la cadena lineal por uniones α -1,3. La cadena lateral trisacáridica se une a la segunda glucosa de la cadena lineal (Jansson *et al.*, 1975) (Figura 7A).

Cerca de la mitad de las manosas externas del polisacárido poseen un residuo cetil piruvato en los carbonos 4 y 6 y la mayoría de las manosas internas del mismo se encuentran acetiladas en la posición 6 (Jansson *et al.*, 1975; Melton *et al.*, 1976; Ramey *et al.*, 2004). La composición molecular del xantano, particularmente respecto de los grupos no glucosídicos sustituyentes, afecta la transición orden-desorden de este polisacárido y, por ende, su estructura y su accesibilidad a enzimas degradativas (Kool *et al.*, 2013). Los grupos acetilo contribuyen a una conformación más ordenada ya que estos grupos pueden interactuar con el esqueleto de celulosa a través de uniones intermoleculares como puentes de hidrógeno. Sin embargo, los cetil piruvatos contribuyen a una conformación más desordenada debido a una desestabilización por la repulsión de cargas negativas entre cadenas laterales, lo que cambia el plegado de la molécula.

La síntesis del xantano en las especies de *Xanthomonas* está cifrada por un operon conocido como *cluster gum*, compuesto de 12 genes: *gumB,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L* y *M*, los cuales se expresan primariamente bajo el control de un único promotor que se ubica río arriba del gen *gumB* (Vojnov *et al.*, 2001). Los genes *gumD*, *M*, *H*, *K* e *I* cifran diferentes enzimas con actividad glicosiltransferasas que ensamblan las unidades repetitivas pentasacáridicas a partir de las unidades de glucosa. La síntesis de este polisacárido comienza cuando la proteína *gumD*

transfiere un residuo de glucosa-fosfato a un transportador lipídico ubicado en la cara interna de la membrana plasmática. En los cuatro pasos siguientes gumM, gumH, gumK y gumI agregan secuencialmente un residuo de glucosa, dos de manosa y un residuo de ácido glucurónico para formar la estructura del xantano (Vorholter *et al.*, 2008). La manosa externa puede ser piruvilada por gumL, mientras que tanto la manosa interna como la externa pueden ser acetiladas por gumF y gumG, respectivamente (Barreras *et al.*, 2008; Salinas *et al.*, 2011; Vorholter *et al.*, 2008). La sucesión de pasos en la síntesis de xantano se ilustra en la Figura 7B.

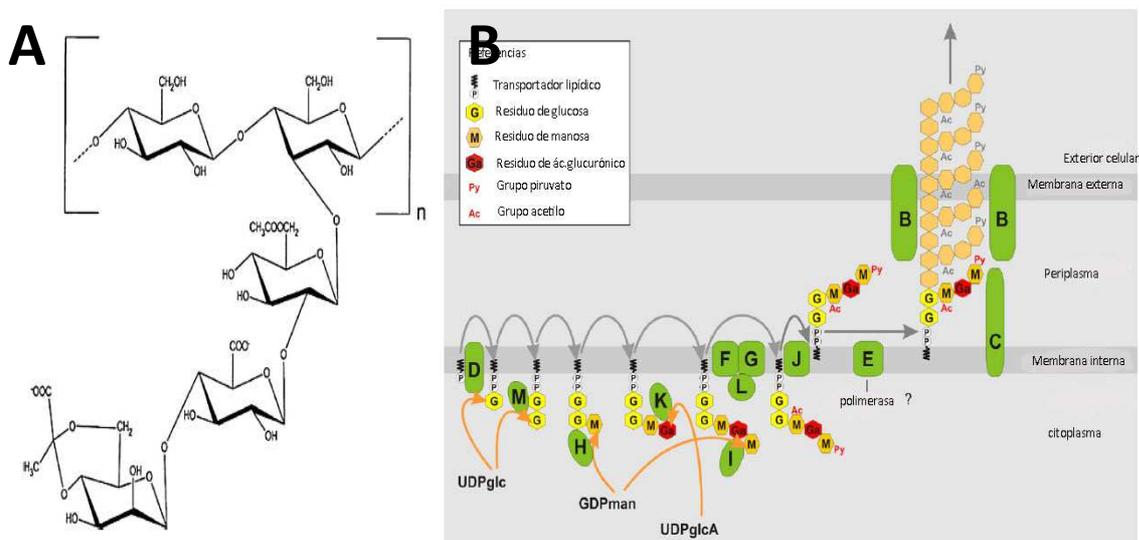


Figura 7. Estructura del xantano y su biosíntesis en *Xcc*. **A**, Representación de la estructura de xantano (Kool *et al.*, 2013). **B**, Las proteínas codificadas por los genes *gum* están resaltadas en verde. En la primera reacción, *gumD* transfiere residuo de glucosa-fosfato a un transportador lipídico ubicado en la cara interna de la membrana plasmática. En los cuatro pasos siguientes, *gumM*, *gumH*, *gumK* y *gumI* agregan secuencialmente un residuo de glucosa, dos de manosa y un residuo de ácido glucurónico para formar la estructura del xantano. La manosa externa puede ser piruvilada por *gumL*, mientras que tanto la manosa interna como la externa pueden ser acetiladas por *gumF* y *gumG* respectivamente. Finalizado esto, las unidades repetitivas son exportadas por *gumJ* al periplasma y allí *gumE* polimeriza dichas unidades, formando un xantano inmaduro que luego, a través de *gumC*, comienza a ser exportado. Cuando el dominio periplasmático de *gumC* alcanza a *gumB*, anclada en la membrana externa, estas proteínas comienzan a formar un poro que permite la exportación del xantano fuera de la célula (Vorholter *et al.*, 2008).

En varios trabajos se ha reportado el rol del xantano como factor de virulencia de *Xcc*, incrementando el potencial infectivo de esta bacteria durante la colonización endofítica de la planta hospedadora. En *A. thaliana* se ha demostrado que el xantano es capaz de suprimir la respuesta inmune de defensa inducida por MAMPs. Esta supresión parece obedecer a la naturaleza polianiónica que posee el xantano, mostrando que este polisacárido une cationes Ca^{2+} , disminuye la cantidad ERO y la expresión de genes de defensa, *PR1* y *PF1.2* (Aslam *et al.*,

2008). En este sentido, bacterias defectivas en la producción de xantano, ya sea por la síntesis o por su regulación, son menos infectivas en plantas de *N. benthamiana* y no son capaces de suprimir la deposición de calosa (Torres *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2006). Recientemente, se ha reportado que el xantano interfiere con la respuesta de defensa vegetal inducida por una molécula difusible de naturaleza lipídica, DSF (ácido *cis*-11-metil-2-dodecanoico, del inglés *diffusible signal factor*) que regula la expresión de factores de virulencia bacterianos y la comunicación célula-célula. Este efecto pudo ser visto en plantas de *A. thaliana*, *N. benthamiana* y arroz (*Oryza sativa*) (Kakkar *et al.*, 2015).

1.6. Los estomas como parte de la respuesta inmunitaria de la planta

Las plantas han desarrollado durante su evolución elaborados mecanismos para percibir e integrar señales provenientes de diferentes condiciones ambientales. En la superficie de la hoja, los estomas median el intercambio gaseoso necesario para la fotosíntesis, controlan la pérdida de agua por transpiración así como también son capaces de responder a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. Es así como el cierre de estomas puede ser inducido por sequía, estrés salino y también por MAMPs, ya que los patógenos pueden utilizar estos poros como vía de colonización endofítica. Debido a la cantidad de estímulos percibidos por los estomas de la superficie foliar, es natural que los poros estomáticos cobren especial relevancia como barrera de defensa instantánea para prevenir mayores daños en las plantas (Zhu and Chen, 2012).

Los estomas son los poros más abundantes de la superficie foliar y resulta razonable que muchos patógenos que pueden ingresar por estomas arbitren diferentes mecanismos para mejorar su eficiencia de penetración a través de los mismos. Este es el caso de las bacterias patógenas *Pst* DC 3000 y *Xcc* (Gudesblat *et al.*, 2009; Melotto *et al.*, 2006), las cuales ingresan por estomas y secretan al medio extracelular toxinas que interfieren con el cierre estomático inducido por MAMPs. Sin embargo, esta no es una estrategia privativa de bacterias sino que se ha reportado que el patógeno fúngico *Sclerotinia sclerotiorum* produce ácido oxálico como factor de virulencia, toxina que le permite inhibir el cierre estomático, incrementando su tasa de ingreso a través de estomas (Guimaraes and Stotz, 2004). Por su parte, el hongo *Fusicoccum amygdale*, secreta una fitotoxina conocida como fusicocsina que inhibe de modo irreversible el

cierre estomático, mediante la activación de una H⁺-ATPasa de membrana (Ballio A, 1964; Baunsgaard *et al.*, 1998). Todo esto indica que son múltiples los mecanismos por los cuales los patógenos son capaces de eludir la respuesta estomática de defensa, complejizando la interacción planta-patógeno.

Las células de la guarda son células epidérmicas especializadas, localizadas de a pares en los órganos aéreos de las plantas que delimitan el poro estomático (Figura 8).

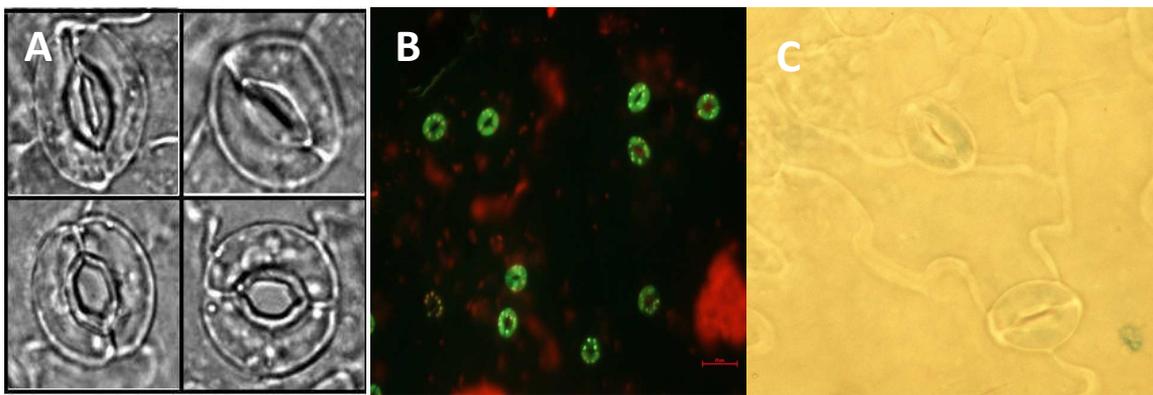


Figura 8. Células de la guarda. **A.** El estoma de *Vicia faba* en dos estados: abierto y cerrado por inducción con ABA (Gao *et al.*, 2005). **B.** Epidermis de *A. thaliana* en la cual se pueden ver los estomas teñidos por la sonda fluorescente (H₂DCFDA), luego de ser tratados con ABA (Microscopio de Fluorescencia, este trabajo de tesis). Escala = 20µm. **C.** Epidermis de *A. thaliana* en la cual se pueden ver los estomas (Microscopía de campo claro, este trabajo de tesis).

La regulación activa de la apertura de los estomas los convierte importantísimos reguladores del ambiente atmosférico global ya que cada año pasan a través de ellos el doble del contenido de vapor de agua de la atmósfera, y un sexto de su contenido de CO₂ (Hetherington and Woodward, 2003). La diferenciación, durante el desarrollo, de células epidérmicas en células de la guarda maduras, está regulada por señales medioambientales (Gray *et al.*, 2000; Hetherington and Woodward, 2003; Masle *et al.*, 2005). El cierre y apertura del poro estomático, causado por la pérdida o ganancia de turgor de las células de la guarda, está regulado por la presión osmótica de las células de la guarda debido a los cambios dinámicos en las concentraciones intracelulares de iones orgánicos e inorgánicos (malato²⁻ y K⁺) y azúcares. Estos eventos requieren del diálogo concertado entre los sensores de cada estímulo y los efectores como lo son los canales iónicos, transportadores vacuolares y de membrana y así como de cambios en los metabolitos (Roelfsema and Hedrich, 2005; Wasilewska *et al.*, 2008). Asimismo, los canales iónicos están

regulados por una compleja red de señalización que incluye la producción de ERO, óxido nítrico (NO), fosfolípidos, fluctuaciones de calcio, alcalinización del citosol, entre otros componentes de señalización.

1.6.a. Señalización durante la apertura y cierre estomático

1.6.a.i. Cierre estomático inducido por ABA

El ABA es un terpenoide sintetizado a partir de precursores carotenoides y su inducción ocurre en condiciones de sequía, salinidad y frío, lo que desencadena, entre otras muchas respuestas, el cierre estomático (Pei *et al.*, 2000).

Para el cierre estomático mediado por ABA, se ha podido determinar una cascada de señalización en la planta modelo *A. thaliana*. El ABA es percibido por receptores PYR/PYL/RCAR (del inglés *pyrabactin resistance/PYR1-like/regulatory component of ABA receptor*) localizados en el citosol (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), lo que permite el cierre estomático a través de mensajeros como ERO, Ca^{2+} citosólico y aumento de pH intracelular (Murata *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 2000). En ausencia de ABA, dichos receptores de ABA interactúan con las fosfatasa del tipo PP2C, ABI1 y ABI2, inhibiendo así su acción (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Estas fosfatasa actúan como inhibidores de la proteína quinasa OST1/ SnRK2.6 (del inglés *open stomata 1/SNF1 related kinase 2.6*) en estomas y de otras quinasas de esta familia SNF1 en otros tejidos (Kwak *et al.*, 2003; Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2015), las cuales fosforilan múltiples blancos involucrados en la respuesta al ABA. Cuando el ABA es percibido, tanto ABI1 como ABI2 dejan de inhibir a OST1/SnRK2.6. El Ca^{2+} citosólico aumenta debido al influjo de estos iones provenientes de fuera de las células de la guarda y a partir de su liberación desde reservorios en el retículo endoplasmático hacia el citosol. El ingreso de Ca^{2+} es mediado por canales de Ca^{2+} e inducido por ERO (Pei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001). El aumento de Ca^{2+} provoca una activación de los canales de salida de cationes K^{+} ubicados en la vacuola, una salida de iones orgánicos a través de canales S aniónicos de la célula e inhibe la actividad de los canales de ingreso de K^{+} (Sirichandra *et al.*, 2009b). La percepción del ABA entonces promueve la activación de esta proteína quinasa OST1/ SnRK2.6 que fosforila y activa al canal aniónico SLAC1 (Lee *et al.*, 2009; Raghavendra *et al.*, 2010; Vahisalu *et al.*, 2010), un evento que contribuye

a la despolarización de la membrana y consecuente salida de solutos de las células de la guarda. La mutante de la quinasa OST1, no puede sintetizar ERO en respuesta a ABA, por lo que no puede cerrar los estomas en respuesta a esta hormona (Mustilli *et al.*, 2002). Asimismo, OST1 activa la producción de ERO a través de las NADPH oxidasas, RBOHD y RBOHF (Kwak *et al.*, 2003; Mustilli *et al.*, 2002). La mutación puntual de ganancia de función *abi1-1* evita que esta proteína interactúe con los receptores de ABA. Esto ocasiona que ABI1 se encuentre activada aún en presencia de ABA, lo que vuelve insensible a la mutante al cierre estomático mediado por ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). El cierre estomático mediado por ABA se ve disminuido en la mutante NADPH oxidasa F, *rboh*f y parcialmente afectado en la doble mutante *rboh*d/*rboh*f (Kwak *et al.*, 2003; Macho *et al.*, 2012) ya que existen otras vías de señalización actuando de modo redundante. La producción de ERO también promueve la síntesis de NO, que a su vez estimula la salida de Ca²⁺ de reservorios intracelulares (Bright *et al.*, 2006; Desikan *et al.*, 2002; Garcia-Mata *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2002; Sokolovski *et al.*, 2005).

1.6.a.ii. Cierre estomático inducido por MAMPs y hormonas de defensa

El cierre estomático inducido por patógenos depende de la percepción de MAMPs por los PRRs. En particular, la flagelina y el péptido derivado de ella flg22 son percibidos por el complejo receptor FLS2-BAK1, el cual fosforila a la quinasa BIK1, que a su vez activa, mediante fosforilación, a la NADPH oxidasa RBOHD (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Esto conduce a la producción de ERO en células de la guarda, lo que activa los canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática. La mutante *rboh*d es totalmente insensible a flagelina o a bacterias para el cierre de estomas (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014), mientras que *bik1*, se ha visto que está impedida de producir ERO luego de la inducción con flg22, pero que de manera inesperada posee un fenotipo de resistencia a la infección con *P. syringae*, si bien es más susceptible a la infección con el hongo *Botrytis cinerea* (Lin *et al.*, 2014; Veronese *et al.*, 2006). Se ha reportado que, entre los componentes de señalización involucrados en el cierre de estomas inducido por flagelina y bacterias pero no por ABA, se encuentran las quinasas MPK3 y MPK6 (Gudesblat *et al.*, 2009; Montillet *et al.*, 2013). Además de su rol en la señalización de los estomas, tanto MPK3 como

MPK6 han sido reportadas como proteínas necesarias para la síntesis de camalexina, la fitoalexina más abundante en *A. thaliana* y que es sintetizada como un compuesto antimicrobiano que frena el ataque de patógenos fúngicos, como *Botrytis cinerea* (Ren et al., 2008). Estas MAPKs también han sido involucradas en la señalización de la hormona ET (Xu et al., 2008). Asimismo, el receptor LECRK-VI.2 (del inglés *L-type lectin receptor kinase-VI.2*) también es requerido para el cierre estomático inducido por MAMPs pero no por ABA (Singh et al., 2012). Este tipo de receptores posee un dominio extracelular que se asemeja estructuralmente a lectinas solubles, es decir a proteínas que unen carbohidratos. Si bien se especula que su rol podría ser importante en la unión entre la pared celular y la membrana celular vegetal, aún su exacto rol biológico se desconoce (Bouwmeester and Govers, 2009). Por otra parte, un elemento central en la señalización de SA, el factor de transcripción NPR1 también es necesario para el cierre estomático inducido por MAMPs pero no por ABA (Zeng and He, 2010). La mutante *npr1-3* también mostró ser más sensible a la infección por patógenos, teniendo alterada la expresión de marcadores de defensa, como el gen *PR1* (Cao et al., 1997).

El cierre de estomas inducido por ciertos MAMPs como quitina, *yeast elicitor* y por la hormona SA, involucrada en la respuesta a patógenos, requiere la producción de ERO mediado por peroxidasas de pared celular. Esto se ha descubierto al demostrarse que la acción de estos compuestos no está afectada en mutantes de las NADPH oxidasas pero sí es afectada por el inhibidor de peroxidasas conocido como ácido salicilhidroxámico (SHAM, del inglés *salicylhydroxamic acid*) (Khokon et al., 2011; Khokon et al., 2010). A continuación mostramos un resumen simplificado de la red de señalización en estomas en respuesta a ABA y a MAMPs (Figura 9).

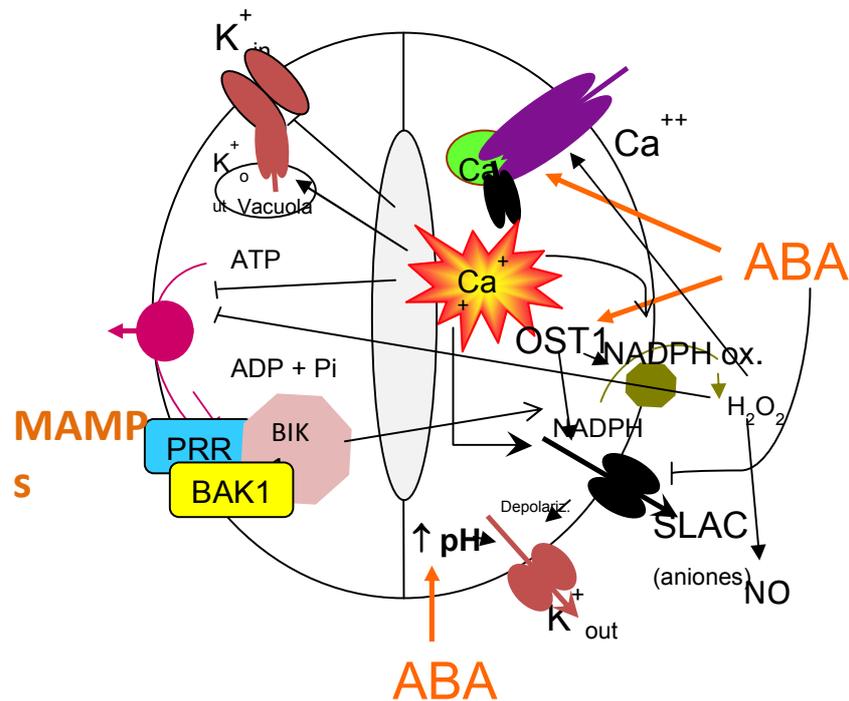


Figura 9. Señalización en células de la guarda en respuesta a ABA y MAMPs. La percepción de los MAMPs por los receptores PRR, inicia una cascada de señalización que activa la proteína RBOHD, que induce la producción de ERO, ocasionando el cierre estomático. La percepción de ABA por sus receptores provoca la activación de la quinasa SnRK2.6, lo que activa a las NADPH oxidasas RBOH y a los canales iónicos independientemente de Ca^{2+} . Asimismo, el ABA induce un aumento del pH intracelular y la activación de los canales de salida de K^+ . Por su parte, el ABA también activa a la quinasa OST1, la cual induce a las NADPH oxidasas para dar lugar a la producción de ERO y también a la activación de los canales aniónicos SLAC1, logrando la pérdida de turgencia de las células de la guarda. Esquema modificado a partir de <http://labs.biology.ucsd.edu/schroeder/clickablegc.html#figure1>.

1.6.b. Toxinas que modulan la apertura estomática

Pst DC 3000 es una bacteria patógena que infecta tallos, hojas y frutos de una variedad de especies de plantas y que desarrolla parte de su vida como un saprófito en las superficies foliares. Esta bacteria ingresa a través de estomas y crece de modo exitoso en hojas y una vez que alcanza cierto umbral de crecimiento, causa lesiones húmedas en hojas y frutos. Estas lesiones eventualmente pueden volverse necróticas y estar rodeadas por halos cloróticos. Si bien este patógeno causa lesiones de cierto grado de severidad según la cepa, no alcanza a matar a la planta. Esta bacteria es fácil de cultivar y posee gran capacidad de metabolizar un amplio rango de sustratos.

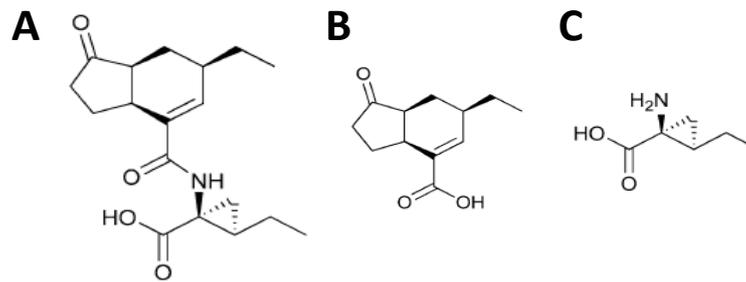


Figura 10. Estructura de la coronatina. **A**, coronatina, **B**, ácido coronafácico (CFA), **C** ácido coronámico (CMA) (Strange, 2007).

Su genoma es de aproximadamente 6 mega pares de bases (6Mpb) y algunas cepas poseen uno o más plásmidos (Wang *et al.*, 2015).

Pst DC 3000 produce al medio extracelular una toxina denominada coronatina (Figura 10A), la cual imita estructuralmente la forma activa del JA, Ile-JA, hormona muy importante en la defensa de la planta (Yan *et al.*, 2009). Esta toxina actúa a nivel sistémico en la planta entera así como a nivel estomático, interfiriendo con el cierre inducido por ABA, MAMPs y oscuridad (Melotto *et al.*, 2006; Mino *et al.*, 1987), siendo muy importante durante el proceso de patogénesis de la bacteria. Se ha demostrado que, además de suprimir sistémicamente la síntesis de SA, a través de la activación de la cascada de señalización de JA en *A. thaliana* (Zheng *et al.*, 2012) y en tomate (Uppalapati *et al.*, 2007), la coronatina promueve la producción de ERO en cloroplastos, asociada a muerte celular en la zona de infección pero inhibe la producción de ERO en citosol, la cual está más relacionada con la defensa en respuesta a MAMPs (Ishiga *et al.*, 2009) en plantas de tomate.

La coronatina, químicamente un poliketido, es sintetizada a partir de dos *clusters* de genes: uno llamado *cf*a que cifra las enzimas necesarias para la producción de uno de los precursores bioquímicos de la toxina, ácido coronafácico (CFA) (Figura 10B), mientras que la síntesis del otro precursor bioquímico, el ácido coronámico (CMA) (Figura 10C), es cifrado por los genes del *cluster c*ma (Wang *et al.*, 2015). El cluster de genes que permite la síntesis de la coronatina se encuentra en un plásmido de la bacteria (Bender *et al.*, 1989; Bender *et al.*, 1998).

Estudios de infección realizados con mutantes en la síntesis de CFA y CMA, ambos intermediarios bioquímicos de la coronatina, mostraron que ninguno de estos precursores por sí solos son capaces revertir el cierre estomático inducido por MAMPs, es decir que dichas cepas mutantes resultaron menos exitosas que la cepa silvestre para colonizar el tejido a través de estomas (Brooks *et al.*, 2004).

El efecto inhibitorio de la coronatina en estomas depende de la presencia de su receptor COI1 y de los factores de transcripción que responden a JA, MYC2, ANAC019, ANAC055 y ANAC072 (Melotto *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2012). Para las respuestas a nivel de la planta entera, la coronatina, requiere la misma ruta de señalización que el JA. Sin embargo, existen evidencias contradictorias sobre el efecto del metil conjugado de JA, MeJA sobre los estomas. Existen reportes que indican que el MeJA es capaz de inducir el cierre de estos poros y promover la producción ERO (Gehring *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2011; Savchenko *et al.*, 2014; Suhita *et al.*, 2004). Sin embargo, también ha sido reportado que el MeJA no tiene efecto alguno sobre el cierre estomático (Zhao *et al.*, 2008) y que además, sí es capaz de revertir el cierre inducido por flg22 pero no por ABA, de un modo independiente del receptor COI1 (Montillet *et al.*, 2013). Si bien en estomas, tanto el JA como la coronatina parecen tener efectos distintos, en otros tejidos de la planta, comparten efectos similares dependientes de COI1 (Wasternack and Hause, 2013).

Otra toxina capaz de prevenir el cierre estomático inducido por ABA y MAMPs es producida por *Xcc*. Nuestro grupo ha demostrado que la síntesis de este compuesto de estructura aún desconocida depende del sistema de señalización célula-célula bacteriano, el sistema *rpf*/DSF (del inglés *regulation of pathogenicity factors/difusible signal factor*). Mutantes de *Xcc* sobreproductoras y no productoras de la molécula señal lipídica célula-célula, DSF, se ven afectadas en la síntesis de esta toxina. Asimismo se ha establecido que, para que esta toxina

ejerza su acción en los estomas previniendo el cierre de los mismos, requiere de presencia de la proteína MPK3 en *A. thaliana* (Gudesblat *et al.*, 2009).

1.7. Variación natural en *A. thaliana*

El área de distribución natural de *A. thaliana* se sitúa en Eurasia, región que abarca muy variados climas y alturas, desde las altas montañas de Asia central hasta la costa atlántica europea así como desde el norte de África hasta el Círculo ártico (Kramer, 2015).

La distribución actual de esta especie es muy amplia en el mundo y en los últimos 100 años, *A. thaliana* ha logrado una gran expansión y colonización en zonas de Norteamérica, así como lugares en el este de Asia. Esta expansión geográfica de *A. thaliana* no se ha dado en esta magnitud en sus parientes más cercanos como *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis halleri* y *Arabidopsis croatica*, convirtiendo a *A. thaliana* una especie muy interesante para estudiar la variación genética natural que ha surgido durante su evolución (Hohmann *et al.*, 2014; Koch and Matschinger, 2007).

Los genomas quedan determinados por la interacción de diversos procesos evolutivos: la recombinación, la conversión genética, la mutación, la selección natural y la deriva génica, así como ciclos recurrentes de poliploidización y posterior diploidización, junto con la hibridación y procesos de introgresión asociados. Desentrañar los efectos de estos procesos sobre la variación genética es esencial no sólo para comprender cómo la diversidad es generada y mantenida sino también para localizar variantes alélicas responsables de dichas variantes fenotípicas que pueden ser adaptativas y por lo tanto de interés por diversas razones (Cao *et al.*, 2011). Si bien en los últimos años se ha avanzado enormemente en el desarrollo de herramientas que permitan asociar regiones del genoma de interés a una función, a través de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*) (Atwell *et al.*, 2010; Baxter *et al.*, 2010; Brachi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010), dentro de la plataforma GWAS (del inglés *genome wide association*), aun no resulta trivial poder unir los datos de los genotipos con los fenotipos asociados (Cao *et al.*, 2011).

Desde el año 2008, se comenzó a trabajar en un consorcio internacional compuesto por varios institutos en todo el mundo con el propósito de secuenciar el genoma de aproximadamente 1000 variantes naturales (ecotipos) de *A. thaliana*. La información provista por estas secuenciaciones abre un nuevo camino en la genética de poder identificar nuevas variantes alélicas responsables de la diversidad fenotípica de esta especie en todo el mundo. En septiembre de 2014, se habían completado las secuencias de cerca de 1100 accesiones (Cao *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2013; Ossowski *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2013; Schneeberger *et al.*, 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) son parte de nuestro banco de semillas y las mutantes *lyk1*, *lyk2*, *lyk3* y *lyk4* (Wan *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2008), todas en el fondo genético Columbia, fueron enviadas por el Dr. Gary Stacey (Universidad de Missouri, USA). Las semillas *atrboh1*, *atrboh1/atrboh1f* (*atrboh1f*) (Torres *et al.*, 2002) y *bik1* (Veronese *et al.*, 2006) fueron provistas por el Dr. Cyril Zipfel (Laboratorio Sainsbury, UK), *myc2* (Dombrecht *et al.*, 2007) y la triple mutante *anac* (Zheng *et al.*, 2012) fueron provistas por el Dr. Xinnian Dong (Universidad de Duke, USA), *npr1-3* (Cao *et al.*, 1997), fue provista por la Dra. Rita Ulloa (INGEBI, Argentina), *mpk3* (SALK_151594) y *mpk6* (SALK_127507) (Alonso *et al.*, 2003) fueron provistas por el Dr. Fernando Pieckenstain (Universidad de San Martín, Argentina), *coi 1-16* (Ellis and Turner, 2002) fue provista por Alain Goosens (Universidad de Ghent, Bélgica), *ost1-2* (en fondo genético Landsberg *erecta*) (Mustilli *et al.*, 2002) fue provista por la Dra. Irene Baroli (UBA, Argentina), y *lecrk-VI.2-1* (SALK_070801) (Singh *et al.*, 2012) fue cedida por el Dr. Laurent Zimmerli (Universidad Nacional de Taiwán, China). Las semillas fueron desinfectadas en una mezcla de lavandina comercial, agua destilada y etanol (1:1:8) durante cinco minutos dentro de microtubos de 1,5 ml. Posteriormente fueron lavadas tres veces con etanol 96% en condiciones de esterilidad y sembradas en placas de Petri conteniendo medio MS (Murashige, 1962), 1% m/v de sacarosa, 0,5 g/L de MES pH 5,8 (Duchefa, Holanda) y 0,8% m/v de ágar (Sigma, EUA). Las placas con las semillas fueron estratificadas durante dos o tres días en la oscuridad a 4°C y posteriormente transferidas a una cámara de cultivo a una temperatura de 22-23°C y un fotoperíodo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad (fluencia de fotones 90 µE) durante siete días. Al cabo de ese tiempo, las plántulas se transfirieron a vasos plásticos de 110 ml con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (1:1:1) y fueron fertilizadas cada dos días. Para preparar la solución fertilizante, se diluyeron las siguientes cantidades de stocks de sales en un litro de agua de la canilla: KNO₃ 1

M: 5ml; KH_2PO_4 1M (pH 5,6): 2,5 ml; MgSO_4 1 M: 2ml; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M: 2ml; Fe-EDTA 1 M: 2,5 ml; micronutrientes: 1 ml. Para preparar 450 ml de la solución de Fe-EDTA, es preciso disolver 2,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 400 ml de agua, agregar luego 3,36 g de Na-EDTA, calentar a ebullición y dejar enfriar lentamente en agitación mientras se lleva a volumen final de 450 ml. La solución de micronutrientes consta de las siguientes sales en estas concentraciones finales: H_3BO_3 70 mM; MnCl_2 14 mM; CuSO_4 0,5 mM; ZnSO_4 1 mM; NaMoO_4 0,2 mM; CoCl_2 0,01 mM.

2.2. Compuestos químicos utilizados

En este estudio fueron utilizados los siguientes compuestos químicos que se detallan a continuación:

- Peroxidasa de rabanito, HRP (Sigma, EUA)
- Luminol (Sigma, EUA)
- Ácido salicílico, SA (Sigma, EUA)
- Ácido metil jasmónico, MeJA (Duchefa, Holanda)
- Flg22 (GL Biochem, China)
- Ácido abscísico, ABA mezcla de isómeros (Sigma, EUA)
- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, H_2DCFDA (Sigma, EUA)
- Ácido salicilhidroxámico, SHAM (Sigma, EUA)
- Difeniliodonio, DPI (Sigma, EUA)
- Peróxido de hidrógeno, H_2O_2 (JT Baker, EUA)
- Silwet-L 77 (Momentive, EUA)
- Cristal Violeta (Hardy Diagnostics)

2.3. Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas bacterianas de *Xcc* y *Pst* utilizadas en este estudio se detallan en la siguiente tabla:

	Características	Referencia
Cepas		
Xcc 8004	Rif ^r	Vojnov et al. 2001
Xcc <i>ndvB</i>	Rif ^r , Spect ^r	Rigano et al. 2007
<i>Pst</i> DC 3118	Rif ^r , Kn ^r	Ma et al. 1991
XcFC2 *	Rif ^r derivado de la cepa silvestre NRRL B-1459 ^a	Katzen et al. 1998
Xc1231 *	NRRL B-1459 Tc::Tn10 Δ <i>gum</i>	Capage, et al. 1987
XcF *	XcFC2 F(<i>gumF-lacZ-aacC1</i>) sitio inserción: <i>EcoRI</i> (nucleotide 7247) ^b	Katzen et al. 1998
XcG *	FC2 F(<i>gumG-lacZ-aacC1</i>) sitio inserción: <i>BamHI</i> (nucleotido 7963) ^b	Katzen et al. 1998
XcL *	FC2 F(<i>gumL-lacZ-aacC1</i>) sitio inserción: <i>PstI</i> (nucleotido 13708) ^b	Katzen et al. 1998
XcI *	FC2 F(<i>gumI-lacZ-aacC1</i>) sitio inserción: <i>StuI</i> (nucleotido 10097) ^b	Katzen et al. 1998
XcFC2 pBBR2-GFP	XcFC2 portando pBBR2-GFP	Este trabajo
Xc1231 pBBR2-GFP	Xc1231 portando pBBR2-GFP	Este trabajo
XcF pBBR2-GFP	XcF portando pBBR2-GFP	Este trabajo
XcG pBBR2-GFP	XcG portando pBBR2-GFP	Este trabajo
XcL pBBR2-GFP	XcL portando pBBR2-GFP	Este trabajo
XcI pBBR2-GFP	XcI portando pBBR2-GFP	Este trabajo
XcFC2 pBBR2	XcFC2 portando pBBR2	Este trabajo
Xc1231 pBBR2	Xc1231 portando pBBR2	Este trabajo
XcF pBBR2	XcF portando pBBR2	Este trabajo
XcG pBBR2	XcG portando pBBR2	Este trabajo
XcL pBBR2	XcL portando pBBR2	Este trabajo
XcI pBBR2	XcI portando pBBR2	Este trabajo
Plásmidos		

pBBR2	pBBR1-MCS derivado de LacZ α +, Kn ^r	Kovach et al, 1995
pBBR2-GFP	pBBR2 portando el gen de GFP (proteína verde fluorescente)	Posadas et al, 2012

Tabla1. Descripción de las cepas utilizadas en este trabajo

^a NRRL B-1459: Cepa salvaje de *Xcc* (Koplin *et al.*, 1992)

^b Número correspondiente a las posiciones en la secuencia nucleotídica de la región *gum* (GenBank accession N°. U22511)

*Las cepas marcadas con asteriscos fueron cedidas gentilmente por le Dr.Luis Ielpi

Las cepas de *Xcc* fueron crecidas en medio rico PYM (Cadmus *et al.*, 1976) o en medio YMM (Sherwood, 1970) según el ensayo realizado, mientras que las cepas de *Pst* fueron crecidas en medio LB (Bertani, 1952). *Xcc* y *Pst* fueron crecidas a 28°C en agitación continua a 200 rpm. A continuación, se detalla la composición de los medios de cultivo utilizados para *Xcc*.

Medio PYM (Para 1L de medio):

- 10 g de glucosa
- 5 g de extracto de peptona
- 3 g de extracto de malta
- 3 gramos de extracto de levadura
- 15 gramos de ágar (opcional para medio sólido)

Medio YMM (Para 1L de medio):

- 10 g de glucosa
- 1 ml de una solución 10 g/L de MgSO₄·7H₂O
- 1 ml de una solución 22 g/L de CaCl₂
- 1 ml de una solución 22 g/L de K₂HPO₄
- 1 ml de una solución 2 g/L de una solución de FeCl₃ (en 0,1 M de HCl)
- Casaminoácidos 0,3% m/v
- Solución de glutamato de sodio 11% v/v

El glutamato de sodio debe ser agregado luego que el medio haya sido autoclavado

2.4. Ensayos de producción de xantano y determinación de viscosidad

Para la producción de xantano, las células de *Xcc* fueron crecidas en medio PYM a 28 °C y 200 rpm durante 5 días. El xantano producido fue precipitado con dos volúmenes de isopropanol y recuperado por filtración con un tamiz. Las fibras del xantano húmedo fueron lavadas con concentraciones crecientes de etanol (75% a 96% de etanol en agua), secado luego a 55 °C, y finalmente pesado para determinar el rendimiento de producción.

La viscosidad de los distintos xantanos fue determinada para soluciones de 0,45% de xantano en un solución (NaCl 16,2 mM, CaCl₂ 0,95 mM) a temperatura ambiente usando un viscosímetro Brookfield (RVTD II) con un huso N°1 a una velocidad de agitación de 3 rpm. La viscosidad intrínseca de las soluciones de xantano (en NaCl 0,05 M) fue realizada usando un analizador de viscosidad (Vilastic Scientific, Inc., Austin, TX).

2.5. Ensayo de adhesión de bacterias

Para este ensayo de determinación de la adhesión de las distintas cepas productoras de variantes de xantano a una superficie abiótica, fue utilizada la técnica de cristal violeta (O'Toole and Kolter, 1998). Brevemente, las cepas bacterianas fueron crecidas toda la noche en medio PYM e inoculadas a medio YMM hasta una DO₆₀₀ = 0,1. Alícuotas de 150 µl fueron usadas para llenar diferentes pocillos de una placa multipocillo. La placa fue incubada a 28 °C por 24 horas. Para confirmar que las cepas utilizadas hayan crecido de modo similar, la DO₆₀₀ fue medida antes de comenzar con el revelado del ensayo de adhesión. El medio de cultivo fue delicadamente removido de los pocillos usando una pipeta; la placa fue lavada con una solución 0,9% NaCl y teñida luego con una solución 0,1% (m/v) de cristal violeta. Luego de 30 minutos de incubación, la solución de cristal violeta no unida fue removida y los pocillos lavados dos veces con agua destilada. El cristal violeta de cada pocillo fue disuelto agregando 150 µl de etanol 70% (v/v), y la absorbancia fue medida con un lector de placas a $\lambda = 570$ nm.

2.6. Análisis *in vitro* de la formación de *biofilm* por Microscopía Confocal

Todas las cepas de *Xcc* utilizadas en esta parte del trabajo fueron transformadas por conjugación (Tesis doctoral M.V.Ielmini "Genética molecular y bioquímica de la síntesis de exopolisacáridos

bacterianos", UBA, 2007) con el plásmido pBBR2-GFP (Posadas *et al.*, 2012) (Tabla 1) que porta el gen codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo la dirección de un promotor constitutivo. Para los experimentos *in vitro*, estas cepas se crecieron a 28 °C en medio PYM suplementadas con kanamicina. Alícuotas de 500 µl se transfirieron a cámaras de vidrio de 1 mm de borosilicato (N°de catálogo 155411; LabTek, Nunc, Penfield, NY, EUA), como fue descrito previamente (Malamud *et al.*, 2011). Los cultivos fueron diluidos 1:1000 en medio YMM y crecidos en cámaras a 28°C por 72 horas. La formación de *biofilm* fue monitoreada con un Microscopio Confocal Olympus Fluo View 1000 (Center Valley, PA, EUA). Las imágenes tridimensionales fueron generadas utilizando el software Image J 1.41 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.htmL>). Para realizar un análisis cuantitativo de los parámetros físicos de estos *biofilms*, utilizamos el Software COMSTAT2 (Heydorn *et al.*, 2000).

2.7. Extracción y purificación de glucanos cíclicos periplasmáticos

2.7.a. Extracción de glucanos cíclicos periplasmáticos

Los glucanos cíclicos de *Xcc* fueron extraídos de acuerdo a la metodología publicada anteriormente a partir de los pellets bacterianos (Rigano *et al.*, 2007a). Las células de *Xcc* se colectaron por centrifugación a 10.000 g por 25 minutos y fueron lavadas por centrifugación en presencia de 30 mM de solución tampón Tris-HCl (pH = 8). Los pellets de las células se extrajeron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con 1% v/v de ácido tricloroacético (TCA) para liberar los glucanos periplasmáticos. Las células rotas, luego de la incubación con el TCA, se centrifugaron y el sobrenadante se conservó para concentrarlo y neutralizarlo a pH = 7 con NH₄OH puro. El sobrenadante concentrado y neutralizado fue liofilizado. El liofilizado fue resuspendido en 500µl de una solución de ácido acético 5% v/v para su posterior análisis por cromatografía en gel.

2.7.b. Técnicas cromatográficas para purificar glucanos cíclicos periplasmáticos

2.7.b.i. Cromatografía en gel

Los azúcares obtenidos de la extracción anterior se resuspendieron en una solución de ácido acético 5% v/v y fueron sembrados en una columna (dimensiones 1,5 x 3 x 42cm) preparada con

la matriz Bio-Gel P-4 fine (Biorad) y equilibrada con ácido acético 5% v/v. Los volúmenes de exclusión y de inclusión fueron determinados por los volúmenes de elución del azul dextrano (4 mg/ml) y de CoCl₂ (200 μM), respectivamente. El eluido se recolectó en fracciones de 0,75 ml mediante un colector de fracciones automático (Modelo FRAC-100, Amersham Biosciences), con un flujo de 30 gotas/minuto. Las fracciones que contenían glucanos cíclicos se determinaron por el método de la antrona-sulfúrico (ver protocolo más abajo) y posteriormente se agruparon. Esta fracción de glucanos cíclicos se cuantificó a través del mismo método de antrona-sulfúrico, utilizando una curva estándar de glucosa.

2.7.b.ii Cromatografía en capa delgada

Para confirmar la identidad de los glucanos cíclicos extraídos y cuantificarlos, se utilizó la cromatografía en capa delgada. Una alícuota de la muestra de glucanos cíclicos se resuspendió en etanol 70% para posteriormente sembrarla en placas de Sílica gel 60 (Merck). La cuba en la que fue realizada la cromatografía fue saturada con una mezcla de butanol, etanol y agua (5:5:4), y se llevaron a cabo tres desarrollos, es decir que fue corrida tres veces en tres días consecutivos. La placa se reveló con una solución en *spray* de 5% de ácido sulfúrico en etanol y se transfirió a una estufa a 180°C durante 1 minuto.

2.7.c. Cuantificación de hidratos de carbono

La cantidad de hidratos de carbono fue determinada a través del método antrona-sulfúrico cuyo protocolo se describe a continuación:

Reactivo de antrona: 0,4 g antrona (Biopack) en 20ml de acetato de etilo.

1. Mezclar 200 μl de muestra + 50 μl de reactivo de antrona
2. Agregar 500 μl de H₂SO₄. Mezclar y dejar enfriar, debido a que la reacción es exotérmica.
3. Lectura de absorbancia a 630 nm.

2.8. Síntesis *in vitro* de [¹⁴C] glucano β-(1,2) cíclico

Se preparó [¹⁴C]-glucano β-(1,2)-cíclico a través de síntesis enzimática *in vitro* a partir de UDP-glucosa usando membranas totales de *Xcc*. Las células de un cultivo de *Xcc* de 24 horas se

cosecharon por centrifugación durante 20 minutos, se trataron con lisozima (100 µg/ml) durante 30 minutos y posteriormente fueron lisadas utilizando una prensa francesa. Luego del tratamiento con DNAsa (1 µg/ml), se procedió a remover las células no lisadas por centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos. Las membranas totales fueron colectadas por centrifugación a 100.000 g durante 4 horas y resuspendidas en una solución tampón Tris-HCl 30 mM (pH = 8). Estas preparaciones de membranas fueron utilizadas para la síntesis *in vitro* de [¹⁴C]-glucano β-(1,2)-cíclico. Para ello, 4 µM de UDP-[¹⁴C]-glucosa (actividad específica 287 mCi/mmol) se incubaron con 200-300 mg de proteínas en 50 mM de solución tampón Tris-HCl (pH = 8), en un volumen total de 100 ml por un lapso de 2 horas a 28°C. La reacción se detuvo por calor durante 5 minutos y los glucanos cíclicos marcados se aislaron por cromatografía de exclusión molecular como fue descrito anteriormente. La concentración de glucanos cíclicos marcados se determinó por el ensayo de antrona-sulfúrico y su relación con la radiactividad fue determinada en un contador de centelleo (Beckman LSC LS6500). Se utilizó para los ensayos una solución madre de 495 µg/ml, que fue diluída a las concentraciones indicadas.

2.9. Ensayos de infección con bacterias

Las inoculaciones de bacterias en plantas se realizaron por el método de *spray* (rociado) y la cuantificación de su crecimiento adentro del tejido vegetal se realizó según Macho *et al.* (2012). Para preparar el inóculo bacteriano, se centrifugaron cultivos de 24 horas en medio PYM y los pellets bacterianos se resuspendieron en una solución de MgCl₂ 10 mM a una OD₆₀₀ = 0,1 (1,6.10⁸ UFC/ml). Inmediatamente antes de rociar el cultivo bacteriano a dicha OD, se agregó a esta solución el surfactante Silwet L-77 en una concentración de 0,02% v/v. La solución bacteriana fue inoculada por rociado en todas las hojas de las plantas de *A. thaliana* de 4 semanas utilizando un aspersor, tanto por su cara adaxial como por la abaxial. Para facilitar la infección, una vez inoculadas las plantas fueron mantenidas hasta el final del experimento en una bandeja con una tapa. Al cabo de 4 horas, y 4 días después la infección, se precedió a tomar 12 discos de hoja de 0,6 cm² con un sacabocado de hojas bien desarrolladas de cada planta infectada (usando dos réplicas biológicas de dos plantas diferentes por tratamiento). Estos discos fueron esterilizados superficialmente con etanol 70% por 30 segundos y luego secados rápidamente para ser colocados luego en un tubo conteniendo 500 µl de solución estéril de MgCl₂ 10 mM. Estos discos

fueron machacados y homogeneizados utilizando un palillo plástico con punta cónica. Una vez homogeneizado el tejido, las muestras fueron diluidas de manera seriada 1:10 y sembradas en placas de Petri con medio PYM, suplementado con los antibióticos correspondientes según la bacteria utilizada. Las placas fueron incubadas a 28°C por 48 hs, tiempo después del cual se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

2.10. Ensayos de medición de ERO

2.10.a. Ensayos de ERO en discos de hoja

Estos experimentos fueron realizados utilizando el método de quimioluminiscencia basado en luminol (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009a). La producción de ERO fue inducida en 12 discos de hoja por tratamiento en plantas de 4-5 semanas de edad. Los discos de hoja (0,25cm²) fueron incubados durante una noche en agua en una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One) (un disco por pocillo), la cual fue reemplazada por 100µl de una solución de Tris-HCl 10mM (pH = 9,5), 10 µg/ml de peroxidasa de rabanito (HRP) y 20 µM de luminol. La producción de ERO fue inducida por la adición de 1 µM de flg22. Las mediciones de luminiscencia fueron llevadas a cabo en un luminómetro de placas (PHERAstar Plus HTS, BGM LabTech) una vez por minuto durante 40 minutos.

2.10.b. Ensayos de ERO en células de la guarda

La producción de ERO en células de la guarda fue medida usando la sonda fluorescente H₂DCFDA (Murata *et al.*, 2001). Las epidermis se incubaron 2,5 horas (en las condiciones de luz mencionadas en *Material Vegetal y condiciones de crecimiento*) en la solución tampón 10:10 (ver composición en la Sección 2.14). Posteriormente, las epidermis fueron transferidas a una solución tampón de Tris-HCl 10mM (pH = 7,2), conteniendo H₂DCFDA 10 µM por 15 minutos. El exceso de sonda se eliminó con tres lavados sucesivos con la solución tampón de Tris-HCl 10 mM (pH = 7,2). Luego, las epidermis fueron incubadas nuevamente en la solución tampón 10:10 y se agregó ABA (20 µM), flg22 (5 µM) o SA (10 µM). Los compuestos que interfieren con el cierre estomático (coronatina 1,56 µM y Xcc FV, 2 µl de una solución preparada según se describe en la Sección 2.15) fueron agregados 10 minutos antes de los inductores de cierre estomático. Los ensayos se hicieron en un volumen de 500 µl en placas de 24 pocillos.

Transcurrido ese tiempo, se observó la fluorescencia de las epidermis en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E 600 ($\lambda_{exc} = 460-480 \text{ nm}$ y $\lambda_{emis} = 495-540 \text{ nm}$) a 400X. Se tomaron imágenes con una cámara Nikon N70 y se cuantificó la intensidad relativa dentro de cada estoma con el Software Image J 1.46. Los datos se presentan como el promedio de 80 mediciones por tratamiento, colectadas de dos experimentos independientes.

2.10.c. Medición de capacidad antioxidante de la coronatina

La posible actividad de la coronatina como antioxidante del anión superóxido fue determinada por inhibición de la tasa de formación de adenocromo a partir de epinefrina a 480 nm, como fue decripto previamente (Misra and Fridovich, 1972). La mezcla de reacción usada contenía 1 mM de epinefrina (en HCl 0,1 M), 50 mM de solución tampón de carbonato de sodio (pH = 10,2) y diferentes concentraciones de coronatina. El aumento en la absorbancia debido a la formación de adenocromo fue seguida durante 10 minutos y se calculó la actividad a partir de la zona lineal de la curva en ausencia o presencia de coronatina. Se utilizó el ácido ascórbico como control positivo de la actividad antioxidante de anión superóxido. La absorbancia fue monitoreada en un lector de ELISA multiplaca FlexStation 3 (Molecular Devices).

2.11. Ensayos de deposición de calosa

La tinción para observar la deposición de calosa se realizó de acuerdo a un protocolo ya publicado (Clay *et al.*, 2009). Plántulas de 10 días crecidas en medio líquido MS $\frac{1}{2}X$ (medio MS líquido diluído a la mitad de su concentración original) con el agregado de MES (0,5 g/l) y glucosa (0,5% m/v) en placas de 12 pocillos se trataron con flg22 (100 nM), β -(1,2)-glucano cíclico (50 $\mu\text{g/ml}$) o xantano (200 $\mu\text{g/ml}$), solos o en combinación según se indica, por 24 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio líquido por una solución fijadora de etanol y ácido acético (3:1) por varias horas. Se reemplazó la solución fijadora varias veces para asegurar una buena diafanización del tejido. Luego, las plántulas fueron rehidratadas con etanol 70% por 2 horas, posteriormente con etanol 50% por 2 horas adicionales, luego de lo cual se las lavó varias veces con agua y se incubaron en agua toda la noche. Al día siguiente, las plántulas se trataron con una solución de NaOH 10% a 37°C por 2 horas para mejorar la clarificación del tejido. Luego de 3 o 4 lavados con agua, las plántulas fueron incubadas en una solución de K_2HPO_4 150 mM

(pH = 9,5) y 0,01% (m/v) de azul de anilina como colorante (Sigma, EUA) por varias horas. Las plántulas fueron montadas en portaobjetos en glicerol 50% y la deposición de calosa (observada como puntos brillantes) fue detectada usando el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E 600 ($\lambda_{exc} = 390\text{nm}$ y $\lambda_{emis} = 460\text{nm}$) a 40X y 200X de magnificación. Se tomaron imágenes con una cámara Nikon N70, y se cuantificó la cantidad de puntos brillantes dentro de cada campo con el Software Image J 1.46.

2.12. Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

Los experimentos de expresión de genes inicialmente se germinaron las semillas durante cinco días en medio MS ágar, y luego cinco plántulas fueron transferidas a medio líquido MS 1/2X con el agregado de MES (0,5 g/l) y glucosa (0,5% m/v) en placas de 24 pocillos. Al cabo de cinco días adicionales se agregó al medio de cultivo flg22 (100 nM), glucano- β -(1,2) cíclico (50 $\mu\text{g/ml}$), SA (1 mM) o MeJA 0,1 mM, solos o en combinación, durante los tiempos indicados. Al cabo de las incubaciones, se congelaron 50 mg de material vegetal en nitrógeno líquido. El ARN total fue extraído usando el reactivo Trizol Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se cuantificaron espectrofotométricamente mediante un Nanodrop (Biophotometer Plus, Eppendorf), y la integridad del ARN quedó confirmada por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNAsa RQ-1 (Promega) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la síntesis de la hebra de ADN complementario al ARNm, usando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega), según las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el equipo StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). A continuación queda resumido el protocolo de Promega para la síntesis de cDNA previo tratamiento con DNAsa:

Tratamiento con DNAsa:

2 μg de ARN (según la muestra el volumen incubado oscila entre 5 y 10 μl)

1 μl de solución tampón RQ DNAsa

1 μl solución para detener la reacción

Completar con agua hasta volumen final de 12 μ l

Retrotranscripción PARTE I:

ARN tratado con DNAsa (no más de 2 μ g totales en masa)

1 μ l de oligodT (solución madre 100 mM)

7 μ l de agua estéril

Incubar la mezcla 5 minutos a 70°C y luego 5 minutos en hielo

Retrotranscripción PARTE II: A cada tubo de la PARTE I, se le agrega:

5 μ l de solución tampón MMLV

5 μ l de solución de DNTPs (10 mM)

1 μ l de enzima MMLV

Se incuban los tubos por 1 hora a 43°C y luego, para cortar la actividad de la enzima, 15 minutos a 70°C.

Mezcla de reacción de qRT-PCR

5 μ l de Mix (FastStart Universal SYBR Green MasterMIX, Roche)

2,4 μ l de agua estéril

0,6 μ l de mezcla de cebadores (solución mezcla: 10 μ M de cebador FW y 10 μ M cebador RV)

2 μ l de cDNA dilución 1:10

Volumen final de reacción: 10 μ l

Programa

1 ciclo de 10' a 95°C

15'' 95°C }
1' 60°C } 40 ciclos

El factor de elongación 1 (EF1) fue usado como gen de referencia interna por su expresión constitutiva. Los cebadores usados en estos ensayos se detallan a continuación:

Gen	Cebador FW (5´3´)	Cebador RV (5´3´)
EF1 (At1g18070)	AGCACGCTCTTCTTGCTTC	GGGTTGTATCCGACCTTCTTC
PR1 (At2g14610)	GTCTCCGCCGTGAACATGT	CGTGTCGCAGCGTAGTGT
PDF1.2 (At5g44420)	TTTGCTTCCATCATCACCCCTTA	GCGTCGAAAGCAGCAAAGA
MPK3 (At3g45640)	TCCCTGGTAAAGACCATGTTCA	TCGGTGTGCCAAGCAACTC
WRKY22 (At4g01250)	GACTTCAGCCGACGAATTTGT	TCAAGATCTCCCACCGCTAGA
BIK1 (At2g39660)	GCGAGCGTTGGATCATAACA	CGAGCCCAATCCACAAGGT
WRKY33 (At2g38470)	TTCGTATGGCTGCTTCTTTC	TGAGGTTAGGATGGTTGTGG

Los datos de fluorescencia crudos se obtuvieron del cicladador StepOne Plus y las eficiencias de amplificación para cada gen fueron calculadas usando el software LinReg PCR (Ramakers *et al.*, 2003). El gen EF1 fue utilizado para estandarizar la expresión de los genes blanco; luego se calculó una relación entre tratamientos usando el algoritmo desarrollado por Pfaffl (2001). La determinación del grado de inducción de un gen y el análisis estadístico se realizaron mediante el Software FgStatistics (J.A. Di Renzo, comunicación personal). Se consideraron significativas las diferencias con un valor $p \leq 0,05$ de acuerdo al análisis provisto por el Software.

2.13. Ensayos de unión ligando-receptor

Los ensayos de unión de ligando-receptor fueron realizados según el protocolo de Zipfel *et al.*, (2006). Se pulverizaron 100 mg de tejido proveniente de hojas de 4-5 semanas en nitrógeno líquido y se resuspendieron en 500 μ l una solución tampón (MES 25 mM pH= 6, NaCl 50 mM, KCl 2 mM, KI 5 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 10mM). Ese pulverizado resuspendido fue centrifugado a 14.000 rpm por 25 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet resuspendido en 500 μ l de la misma solución tampón se conservó para ser usado en los experimentos de unión. Las membranas totales se incubaron en la mencionada solución tampón en presencia de [¹⁴C]-glucanos β -(1,2)-cíclicos (4,76x10⁶ cpm/ μ mol) en un volumen final de 100 μ l. Esta incubación se realizó por el término de 1 hora a 28°C. La reacción fue detenida por enfriamiento de las muestras en un baño de hielo e inmediatamente el contenido de la reacción fue filtrado en vacío utilizando papel de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Sciences) y lavado por 10 segundos con 15

ml de la solución reguladora. La radiactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo (Beckman LSC LS6500). El ensayo de desplazamiento de radioactividad por acción de glucano β -(1,2)-cíclico sin marcar, fue realizado con concentraciones crecientes de glucano β -(1,2)-cíclico no radiactivo en las mismas condiciones de incubación antes descritas. Luego, las muestras fueron colectadas y filtradas según el mismo procedimiento antes descrito.

2.14. Medición de aperturas estomáticas

Las aperturas estomáticas fueron medidas de acuerdo al protocolo publicado previamente por nuestro grupo (Gudesblat *et al.*, 2009). Se utilizaron epidermis de hojas de plantas de cuatro semanas (no florecidas). Dichas epidermis fueron colocadas en una solución tampón 10:10 (KCl 10 mM y MES-KOH 10mM, pH = 6,15) bajo las condiciones normales de cultivo de las plantas por 2, 5 horas. Luego, se agregaron al medio los distintos tratamientos: ABA (20 μ M), SA (10 μ M), flg22 (5 μ M), DPI (20 μ M), SHAM (2 mM) o *Pst* DC3118 (10^8 UFC/mL) y se incubaron las epidermis durante 1,5 horas más. La coronatina (1,56 μ M), el *Xcc* FV (2 μ l de la preparación descrita en la Sección 2.15) y el MeJA en las concentraciones indicadas fueron agregados 10 minutos previo a los otros tratamientos. Los ensayos se hicieron en un volumen de 500 μ l en placas de 24 pocillos. Para los ensayos de cierre estomático inducido por oscuridad, después de la apertura inicial en la solución tampón 10:10 en condiciones de luz, las epidermis fueron incubadas en la misma solución por 2 horas en total oscuridad en presencia o ausencia de los compuestos químicos indicados. La promoción del cierre por H₂O₂ fue realizada según Pei *et al.* (2000). La incubación inicial para abrir los estomas se realizó en presencia de EGTA 0,1 mM y luego se agregó H₂O₂ (100 μ M) junto con CaCl₂ (0,2 mM). La coronatina (1,56 μ M) y el *Xcc* FV (2 μ l de la preparación descrita en la Sección 2.15) fueron añadidos 10 minutos antes de la adición de H₂O₂. Para los ensayos de inhibición de la apertura estomática, las epidermis se incubaron en la oscuridad en la solución tampón 10:10 por 2 horas para promover el cierre. Luego, se transfirieron las epidermis conteniendo los compuestos descritos anteriormente a la luz por 2 horas. Se midió la apertura de 40 estomas a 400 aumentos para cada tratamiento. Los datos se presentan como el promedio de entre 80 y 120 medidas de apertura, colectados de 2 o 3 experimentos independientes, según se indica en cada figura.

2.15. Preparación de extractos para purificar el Xcc FV

La extracción utilizada para purificar el Xcc FV fue publicada previamente por nuestro grupo (Gudesblat *et al.*, 2009). Esta metodología consiste en la extracción de este compuesto con un tercio de volumen de acetato de etilo por cada volumen de sobrenadante del cultivo bacteriano crecido en medio YMM durante 48 hs. Esta extracción es repetida tres veces y todo el volumen de acetato de etilo es evaporado, dejando que el residuo seco sea resuspendido en una mezcla de metanol: agua (20:80) para su posterior utilización en ensayos de apertura estomática o posterior purificación. Para purificar la fracción con actividad biológica a partir de los extractos de acetato de etilo, se utilizó una columna de exclusión molecular Biogel P2. Para correr la muestra en la columna, utilizamos una mezcla de solventes metanol: agua (20:80). Esta columna fue conectada a un colector de fracciones automático que fue tomando el eluido saliente. Una vez obtenidas las fracciones provenientes de la columna, las secamos en un evaporador rotatorio (Modelo 5301, Eppendorf) y realizamos un ensayo de actividad biológica para evaluar su capacidad de inhibir el cierre estomático inducido por ABA (20 μ M). Las fracciones de eluido se agregaron 10 minutos antes que el ABA. Para simplificar el ensayo, inicialmente realizamos grupos de fracciones tomando de a 5 tubos para hacer un grupo, de modo de ensayar grupos y no fracciones individuales. Mezclamos entonces volúmenes iguales de cada tubo individual para dar un grupo y así sucesivamente. Del grupo que tuviera actividad biológica, se tomaban los tubos individuales correspondientes y se ensayaban nuevamente para determinar el tubo que poseía actividad. Luego de este paso, la fracción activa proveniente de la cromatografía en gel se corría por HPLC (Serie 1200, Agilent Technologies; columna utilizada: ZORBAX C-18, largo y ancho de columna, 25 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μ m, tamaño de poro 300 Å). El eluido se colectaba nuevamente con el colector de fracciones y esos tubos eran nuevamente ensayados para determinar presencia de actividad biológica.

El programa de corrida utilizado en el HPLC es el que se detalla a continuación.

Tiempo (minutos)	0	30	35	40	42
ACN (TFA 0,1%)	0	80	100	100	0
H ₂ O (TFA 0,1%)	80	0	0	0	80
METANOL	20	20	0	0	20

Tabla 2. Esquema de programa de corrida de HPLC.

Tanto al Acetonitrilo (ACN) como al H₂O, se le agregó, para mejorar la resolución de los picos, 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). La duración total de la corrida es de 42 minutos. En los ensayos de medición de aperturas estomáticas para determinar la actividad biológica del compuesto durante el proceso de purificación (Sección 3.1.a) se utilizaron 6 µl de extracto proveniente de las extracciones con acetato de etilo en las distintas condiciones de extracción: acetato de etilo, acetato de etilo (pH = 3) y acetato de etilo (pH = 3, NaCl 35 g/100 ml). Los volúmenes de medio de cultivo PYM o YMM de partida para realizar las extracciones fueron de 200 ml. En todos los ensayos de medición de aperturas estomáticas de las Secciones 3.1,b,c,d y e, el volumen de *Xcc* FV utilizado fue de 2 µl, proveniente de una purificación de 10 L de medio de cultivo en medio YMM, el cual fue purificado por una cromatografía de exclusión molecular Biogel P2 y posterior HPLC.

2.16. Mediciones de largo de raíz

Para realizar estos ensayos, se sembraron semillas estériles de *A. thaliana* en placas verticales de medio MS (según está descrito en la Sección 2.1) por el término de 6 días. Luego estas plántulas fueron transferidas a nuevas placas verticales de medio MS suplementadas con ABA (50 µM), coronatina (5 µM) o 6 µl de *Xcc* FV (Ver Sección 2.15) y se dejaron creciendo 3 días más (Jiao *et al.*, 2013). La longitud de 10 raíces fue medida utilizando el software Image J. Los resultados se presentan como el promedio de 20 raíces por tratamiento, colectadas de dos experimentos independientes.

En el caso de la medición del largo de raíz de plántulas tratadas con glucano β-(1,2)-cíclico y flg22, el protocolo que se siguió fue ligeramente diferente. En este caso, semillas estériles de *A. thaliana* fueron crecidas en placas de medio MS por el término de 2 días. Luego, dichas plántulas

pequeñas (10 por tratamiento) fueron transferidas a placas multipocillo conteniendo 2 ml de MS 1/2X líquido suplementado con MES (0,5 g/l) y glucosa (0,5% m/v) y conteniendo flg22 (100 nM), glucano β -(1,2)-cíclico (50 μ g/ml) o la combinación de ambos, y se las cultivó por 5 días adicionales. Para el ensayo de sensibilidad de raíz al MeJA, se procedió de la misma manera y las plántulas de 2 días se transfirieron al medio líquido en presencia de MeJA (50 μ M). La longitud de 10 raíces fue medida utilizando el software Image J. Los resultados se presentan como el promedio de 20 raíces por tratamiento, colectadas de dos experimentos independientes.

2.17. Análisis de la variación natural en *A. thaliana*

Para la parte experimental del análisis de la variabilidad, seleccionamos 7 ecotipos de los que poseíamos en nuestro banco de semillas, usando de referencia el ecotipo Columbia (Col-0). Estos ecotipos fueron: Mv-0, ICE-75, Cvi-0, Bur-0, Kas-2 y Kondara. Para la parte evolutiva, decidimos aumentar el número de ecotipos utilizados para el análisis, totalizando un n=152 que se detallan en el ANEXO I de este trabajo y que fueron obtenidos del sitio web de los 1001 genomas (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>). Dentro de estos 152 ecotipos se encontraban los ecotipos analizados experimentalmente. La variabilidad del gen y la región promotora de COI1 (AT2G39940) fue analizada utilizando el Software DNASP 5.10 (DNA *sequence polymorphism*), versión 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009). En el ANEXO II, se detallan las secuencias nucleotídicas de los ecotipos Col-0, Mv-0 y ICE-75 con los nucleótidos polimórficos marcados.

A continuación se esquematiza la representación del locus *COI1*, sus intrones, exones y región promotora (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>)



OBJETIVOS DE ESTA TESIS

Objetivo general

Estudiar de manera integral las estrategias de *Xcc* para suprimir la respuesta del sistema de defensa vegetal ejercido tanto en primera instancia por los estomas, como aquél que se desencadena una vez que la bacteria se encuentra dentro de la planta.

Objetivos específicos

1. Determinar la estructura molecular del factor sintetizado por *Xcc* capaz de modular la apertura estomática y el mecanismo de acción del mismo. Para llevar adelante este objetivo utilizamos en paralelo otro compuesto de identidad conocida sintetizado por *P. syringae*, cuyo mecanismo también estudiamos.
2. Profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción del glucano cíclico de *Xcc* en la supresión de la defensa vegetal.
3. Determinar qué componentes estructurales del xantano de *Xcc* son cruciales para su rol como supresor de la inmunidad vegetal.

3. RESULTADOS

3.1. PARTE I. Mecanismo de inhibición del cierre estomático por *Xcc* y *Pst* DC 3000

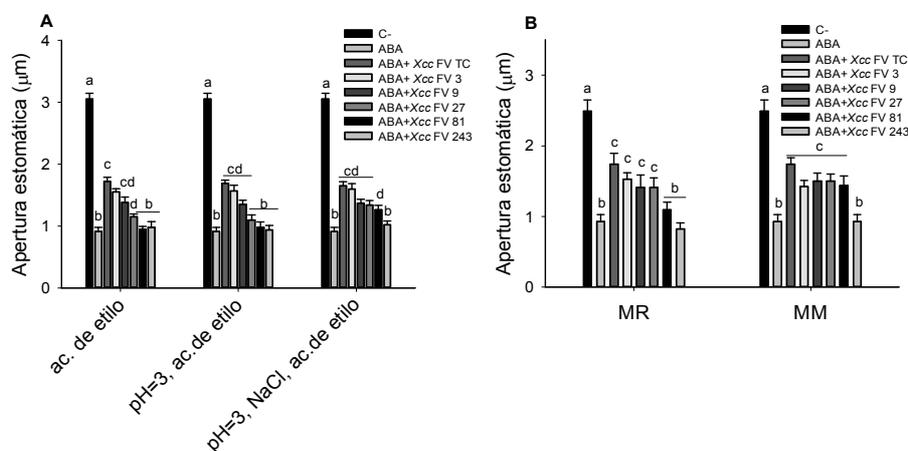
3.1.a. Purificación preliminar del factor de virulencia de *Xcc* a partir de sobrenadantes de cultivo

Nos propusimos como objetivo de este trabajo purificar el *Xcc* FV, un compuesto capaz de interferir con el cierre estomático secretado por esta bacteria, cuya existencia y actividad biológica habían sido previamente descrita por nuestro laboratorio (Gudesblat *et al.*, 2009). En primer lugar intentamos mejorar el rendimiento de *Xcc* FV extraído de los sobrenadantes de cultivo de la bacteria.

Por estudios previos, sabíamos que el *Xcc* FV era un compuesto extraíble en acetato de etilo (Gudesblat *et al.*, 2009). Asimismo, cuando calentábamos a hervor durante algunos minutos el extracto con dicho compuesto, su actividad se mantenía intacta, lo cual nos condujo a pensar que se trataba de un metabolito no proteico. Por último, mediante ensayos de cromatografía de exclusión molecular en una matriz con un límite de peso de 2 kDa, observamos que este compuesto quedaba incluido, por lo cual teníamos una estimación de su peso de menos de 2 kDa.

Dado que la cepa silvestre de *Xcc* 8004 produce xantano en enormes cantidades, y eso suele complicar el proceso extractivo, decidimos utilizar una cepa mutada deficiente en la producción de este EPS (*Xcc gumB*), para simplificar el proceso de purificación, ya que previamente vimos que esta mutación no afectaba en absoluto su capacidad para producir nuestro compuesto de interés. Comenzamos por evaluar si alguna condición de acidez, basicidad o la fuerza iónica podrían afectar el rendimiento en la extracción orgánica. Se evaluaron tres condiciones diferentes de extracción del *Xcc* FV. Al pH del sobrenadante de la bacteria, que es aproximadamente 6-7, muchos metabolitos de naturaleza no polar o medianamente no polar, que presenten grupos cargados eléctricamente pueden estar desprotonados, y en esas condiciones podrían permanecer en la fase acuosa durante el proceso de extracción orgánica, pudiendo perderse así parte del compuesto. Por su parte, un aumento de fuerza iónica o *salting*

out (aumento de la concentración salina) fomenta las interacciones hidrofóbicas entre solutos y eso puede dar por resultado una precipitación de proteínas u otros polímeros que no son de interés, facilitando la purificación. Por ello, evaluamos tres condiciones de extracción orgánica: la condición control, sólo con acetato de etilo, una segunda, llevando el pH del sobrenadante a 3 previamente a la extracción con acetato de etilo y la tercera, similar a la segunda pero con el agregado de NaCl (35g /100 ml), para provocar un *salting out*. Partiendo de iguales volúmenes de sobrenadante en cada caso (200 ml), llevamos adelante las extracciones orgánicas, como se indica en la Sección 2.15. De la publicación previa del grupo (Gudesblat *et al.*, 2009) sabemos que *Xcc* FV inhibe el cierre mediado por ABA. Realizamos diluciones seriadas al tercio de cada extracto y medimos las aperturas estomáticas en cada caso para evaluar la dilución límite a la cual se perdía la actividad biológica del compuesto, en presencia de ABA. Así vimos que, mientras que en la condición 1 y 2, la actividad se perdía en la dilución 1/81 y 1/27 respectivamente, en la condición 3, la actividad se perdía en la dilución 1/243, sugiriendo que el agregado de sal al sobrenadante del cultivo, mejoraba la eficiencia de la extracción (Figura 11A).



Dado que el medio rico en el que crece normalmente *Xcc* (PYM, ver Sección 2.3) es un medio complejo, indefinido, que aporta enorme cantidad de compuestos extras al sobrenadante del cultivo, pudiendo hacer más dificultosa la purificación, decidimos examinar si, en un medio mínimo YMM, *Xcc* FV se producía en cantidades similares que en medio rico. Observamos que, del análisis de las diluciones seriadas, las bacterias producen similares cantidades de *Xcc* FV en ambos medios (Figura 11B), por lo que optamos por trabajar con el medio mínimo (YMM), dado que nos permite partir de una muestra mucho más limpia y pura que el medio rico (PYM), decidimos continuar el trabajo utilizando YMM en condiciones de pH =3 y utilizando NaCl para aumentar la fuerza iónica. A continuación, con el *Xcc* FV extraído a partir de medio mínimo en las condiciones anteriormente descritas, procedimos a intentar la separación del *Xcc* FV haciendo uso de la cromatografía de exclusión molecular, utilizando como matriz una columna de Biogel P2, la cual permite resolver compuestos de hasta 2kDa de peso molecular. Al ensayar los grupos, como se ve en la Figura 12, observamos que la actividad biológica aparece entre las fracciones 16-25. De acuerdo al número total de tubos que obtuvimos de la columna y el lugar de elución de los marcadores de volumen muerto (V_0) (azul dextrano) y volumen final (V_f) (CoCl_2), el compuesto eluía en la mitad del volumen total de la misma, sugiriendo que su peso sería de alrededor 1 kDa.

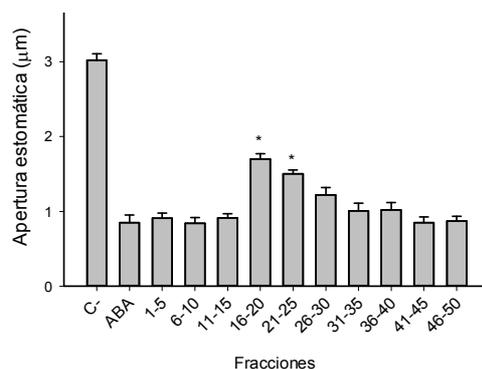


Figura 12. Separación de *Xcc* FV por medio de cromatografía de exclusión molecular. La promoción de cierre estomático por ABA fue realizada en grupos fracciones correspondientes a 5 tubos contiguos cada uno colectados a partir de la columna. C-, control sin tratar, ABA (20 µM) como estímulo de cierre. Las aperturas estomáticas fueron medidas 1,5 horas luego de la aplicación de los respectivos tratamientos+ABA (20 µM). El extracto de *Xcc* FV fue añadido 10 minutos antes que el ABA. El asterisco indica diferencias significativas con $p < 0,01$ respecto del control ABA. Las barras de error representan ES de un experimento, $n=40$ por ensayo en todos los experimentos.

Con estos grupos de tubos eluidos de la columna de exclusión molecular, realizamos la puesta a punto de un protocolo de separación de HPLC para poder identificar posibles picos con actividad biológica (Ver Sección 2.15). Utilizando el programa de corrida detallado previamente, obtuvimos los siguientes cromatogramas a tres longitudes de onda distintas, como se muestra en la Figura 13.

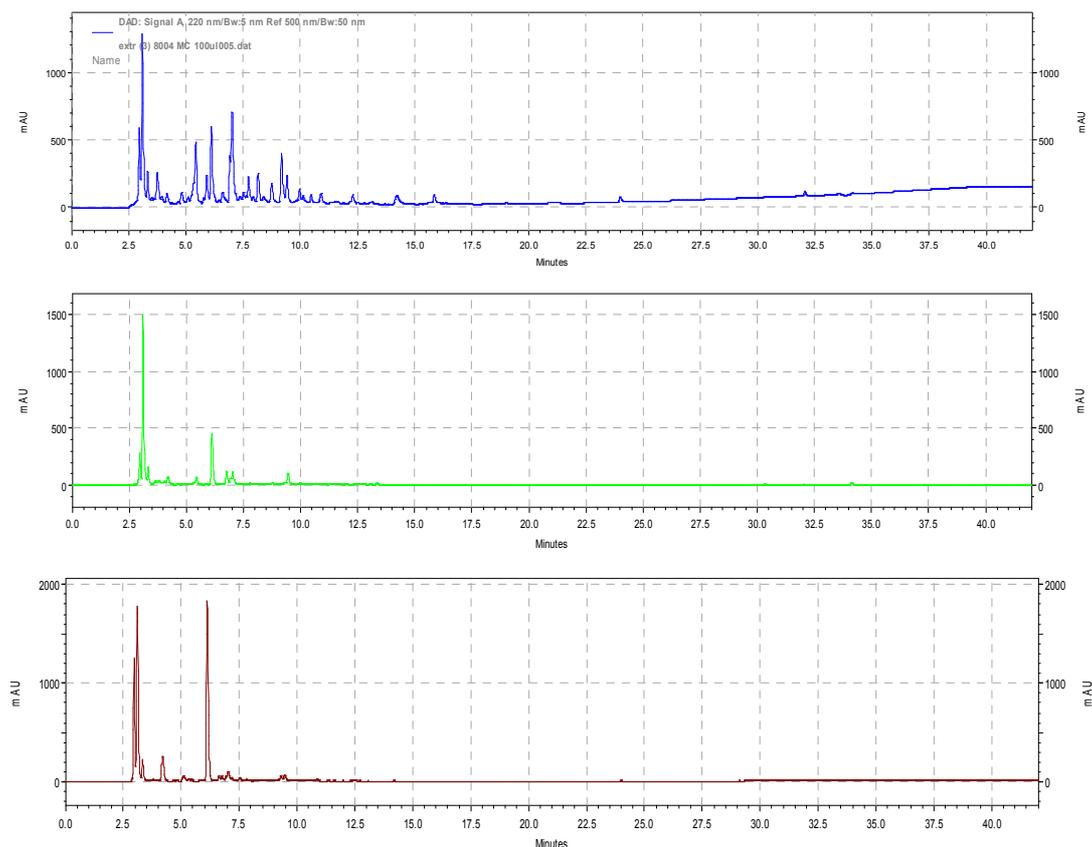


Figura 13. Cromatogramas obtenidos de la corrida de la fracción activa de Xcc FV proveniente de la columna Biogel. Se esquematiza las miliunidades de Absorbancia (m AU) en función de tiempo de corrida (minutos). El primer panel (azul) muestra la absorbancia a $\lambda=220$ nm. El segundo panel (verde) muestra la absorbancia a $\lambda=254$ nm. El tercer panel (rojo) muestra la absorbancia a $\lambda=280$ nm. Equipo utilizado: Agilent 1200 Series. Detector: arreglo de diodos (DAD).

En esta corrida se muestran los cromatogramas a $\lambda = 220, 254$ y 280 nm, siendo $\lambda = 220$ la longitud de onda a la cual aparecen más picos. Se colectaron fracciones cada minuto para poder ensayar su actividad biológica. Procedimos para ello según se indica en la Sección 2.15. Como se observa en la Figura 14A, al ensayar la actividad biológica de los grupos de las fracciones obtenidas del HPLC, observamos que la actividad de inhibición del cierre estomático por ABA eluía entre los 11 y 15 minutos. El análisis de las fracciones individuales de este grupo

permitió acotar el tiempo de retención de nuestro compuesto al minuto 14 (Figura 14C). Al observar los cromatogramas (Figura 13), notamos que a $T_R=14$ minutos sólo se advierte un pequeño pico a $\lambda = 220\text{nm}$.

Cuantificamos la actividad de esta fracción mediante el método de la dilución límite y observamos actividad hasta la dilución 1/64 (Figura 14B). Esta información nos permitió cuantificar la actividad específica de nuestro compuesto en relación a la cantidad de sobrenadante de cultivo de la cual se partió para hacer la purificación. Teniendo en cuenta el volumen de sobrenadante de partida utilizado (10 L), nuestros cálculos indican que la mínima cantidad de sobrenadante que permite detectar la actividad biológica es de 0,465 ml. Podríamos decir que “1 unidad mínima arbitraria de actividad” de nuestro Xcc FV se encuentra por cada 0,465 ml de medio mínimo de cultivo.

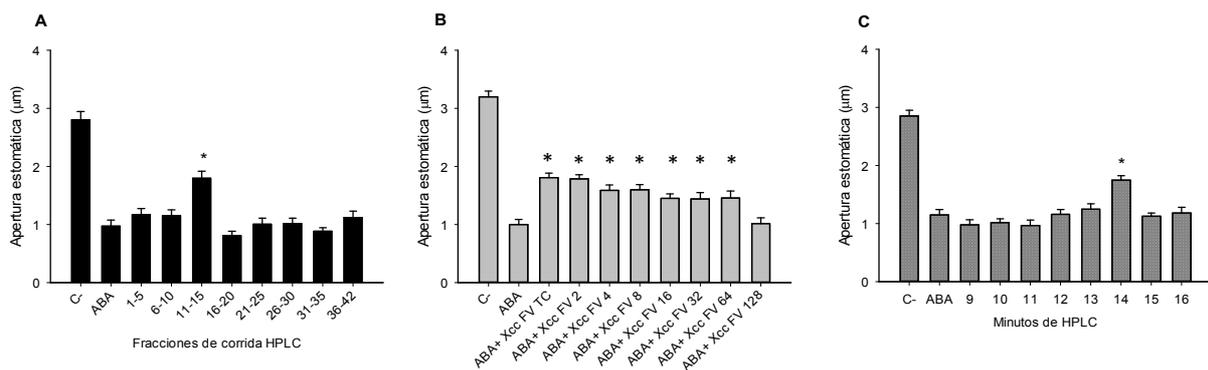


Figura 14. Separación de Xcc FV por medio de HPLC. **A**, La medición de la promoción de cierre estomático por ABA fue realizada como se detalla en la sección 2.17 de Materiales y Métodos. C-, control sin tratar, ABA (20 µM) como estímulo de cierre. Las aperturas estomáticas fueron medidas 1,5 horas luego de la aplicación de los respectivos tratamientos (fracciones se indican el eje X de la Figura). **B**, los ensayos de inhibición del cierre estomático por ABA se llevaron a cabo haciendo diluciones seriadas al medio (TC, tal cual, 2, 4, 8, 16, 64 y 128) de la fracción activa de A. Las aperturas estomáticas fueron medidas 1,5 horas luego de la aplicación de los compuestos. **C**, Medición de inhibición de la promoción de cierre estomático por ABA por parte de fracciones contenidas en tubos individuales correspondientes a la fracción 11-15 minutos de **A**, con actividad biológica. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con $p < 0,01$ respecto del control ABA, según Test de Student. Las barras de error representan ES de un experimento, $n = 40$ por ensayo en todas las figuras.

A partir de esta información y teniendo en cuenta el buen grado de purificación alcanzado, decidimos continuar produciendo más cantidad de compuesto ya que era probable que, aún siendo muy activo biológicamente, se encontrara en trazas y por eso no pudiéramos detectarlo en un estudio de espectrometría de masas. Por el tamaño tan pequeño del único pico candidato observado en el cromatograma a $T_R = 14$ minutos, sumado a que el compuesto tenía bajas

chances de estar puro, decidimos cultivar mayores cantidades de *Xcc gumB* en fermentadores hasta alcanzar cerca de 15 L, para obtener mayor cantidad de nuestro compuesto de interés y así poder determinar su estructura. Con este fin, establecimos una colaboración con el Laboratorio del Dr. Heribert Hirt, en la Universidad de Ciencia y Tecnología Rey Abdalá, en Arabia Saudita. Pese a contar con mayor cantidad de extractos de sobrenadantes bacterianos, la cantidad no fue suficiente para poder determinar sin lugar a dudas su masa por espectrometría, lo cual constituye el primer paso para poder averiguar la estructura molecular del compuesto. Esta cantidad pequeña de compuesto, en relación a la cantidad de impurezas (relación señal: ruido), seguía siendo baja, imposibilitando su elucidación.

3.1.b. Efecto del *Xcc* FV y de la coronatina en la producción de ERO en células de la guarda

Entre los objetivos de esta primera parte de este trabajo de tesis, nos propusimos investigar el mecanismo de acción del *Xcc* FV sobre los estomas. Con este fin decidimos abordar el estudio de dicho mecanismo comparándolo con el de una toxina de efecto similar producida por *Pst* DC 3000 llamada coronatina. En la literatura se encontraba descrito que tanto el *Xcc* FV como la coronatina reducían el cierre estomático inducido por ABA y MAMPs (flg22 y lipopolisacárido en el caso de la coronatina, y lipopolisacárido en el de *Xcc* FV) (Gudesblat *et al.*, 2009; Melotto *et al.*, 2006). Sin embargo, no se conocía cómo se comportaban estas toxinas en presencia de otro inductor del cierre estomático, la hormona involucrada en la defensa contra patógenos SA. Es por ello que comenzamos midiendo la apertura estomática en respuesta a ABA, flg22 y SA, en presencia o no de estas toxinas (Figura 15A).

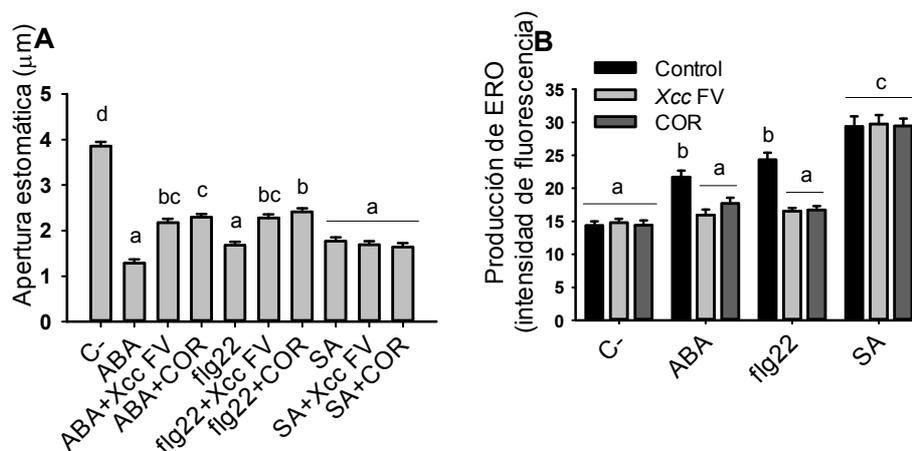


Figura 15. El Xcc FV y la coronatina afectan el cierre estomático y la producción de ERO por ABA y flg22 pero no por SA. **A.** Xcc FV (2µl) y la coronatina (COR, 1,56 µM) inhiben el cierre estomático inducido por ABA (20 µM) o flg22 (5 µM) pero no por SA (10 µM). Las aperturas estomáticas fueron medidas 1,5 horas luego de la aplicación de los respectivos tratamientos. **B.** El Xcc FV y la coronatina (COR, 1,56 µM) impiden la producción de ERO en respuesta a ABA (20 µM) o flg22 (5 µM) pero no a SA (10 µM). Las ERO fueron detectadas mediante la sonda fluorescente H₂DCFDA en células de la guarda 20 minutos luego de cada tratamiento. En A y B tanto Xcc FV como la coronatina fueron añadidos 10 minutos antes que el resto de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 1 factor, test de Tukey) en A y $p < 0,05$ (ANOVA de 2 factores) en B. Las barras de error representan ES de dos (B) o tres (A) experimentos independientes, $n=40$ por ensayo en todas las figuras.

Observamos que, tanto el Xcc FV como la coronatina, son incapaces de inhibir el cierre estomático mediado por SA, a diferencia de su ya conocido efecto sobre las respuestas a ABA o flg22. A la luz de este resultado, medimos la producción de ERO en células de la guarda, frente a los mismos estímulos de cierre (ABA, flg22 y SA), en presencia o ausencia de estas toxinas. Notamos que estos compuestos tienen la capacidad de disminuir la producción de ERO inducida por ABA y flg22 (Figura 15B), pero no ejercen este efecto en estomas cuya producción de ERO es inducida por SA. Esta hormona induce la síntesis de estos segundos mensajeros a través de peroxidasas de pared celular mientras que la flg22 y ABA gatillan la producción de ERO a través de NADPH oxidadas (Kadota *et al.*, 2015; Khokon *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2003; Mustilli *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que el Xcc FV y la coronatina interfieren con el cierre estomático a través de la inhibición de la producción de ERO cuya producción está mediada por NADPH oxidadas. De manera consistente con reportes previos (Khokon *et al.*, 2011) que muestran que la producción de ERO por SA es mediada por peroxidasas, y como control de nuestros experimentos, utilizamos el inhibidor de peroxidasas SHAM, observándose que este pudo inhibir el cierre estomático inducido por SA pero no por flg22, mientras que el SA fue

capaz de producir el cierre estomático normalmente en la mutante *atrboh1d*, afectada en la percepción de flg22 (Figura 16A,B).

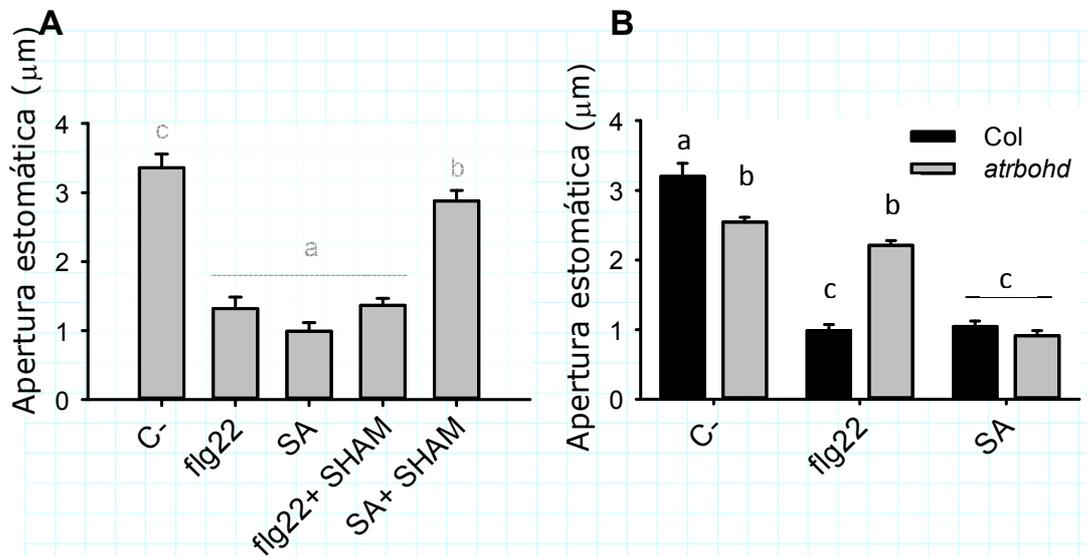


Figura 16. El Xcc FV y la coronatina no afectan la producción de ERO inducida por peroxidasas.. **A**, SHAM (2 mM) inhibe el cierre estomático inducido por SA (10 µM) pero no por flg22 (5 µM). **B**, la mutante *atrboh1d* es insensible a flg22 (5 µM) pero no a SA (10 µM) para la promoción de cierre. En (A), letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 1 factor, Test de Tukey) y ANOVA de 2 factores en (B). Las barras de error representan el ES de dos experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento.

Ha sido publicado que la flg22 induce la producción de ERO en discos de hoja (Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Macho *et al.*, 2012). Es por ello que quisimos explorar si el Xcc FV y/o la coronatina poseían efecto sobre este comportamiento inducido por flg22. Observamos que ninguno de los compuestos es capaz de alterar la producción de ERO inducida por flg22 en discos de hoja (Figura 17A,B), mostrando que el efecto de estas toxinas en la producción de ERO en estomas no ocurre en otros tejidos de hoja.

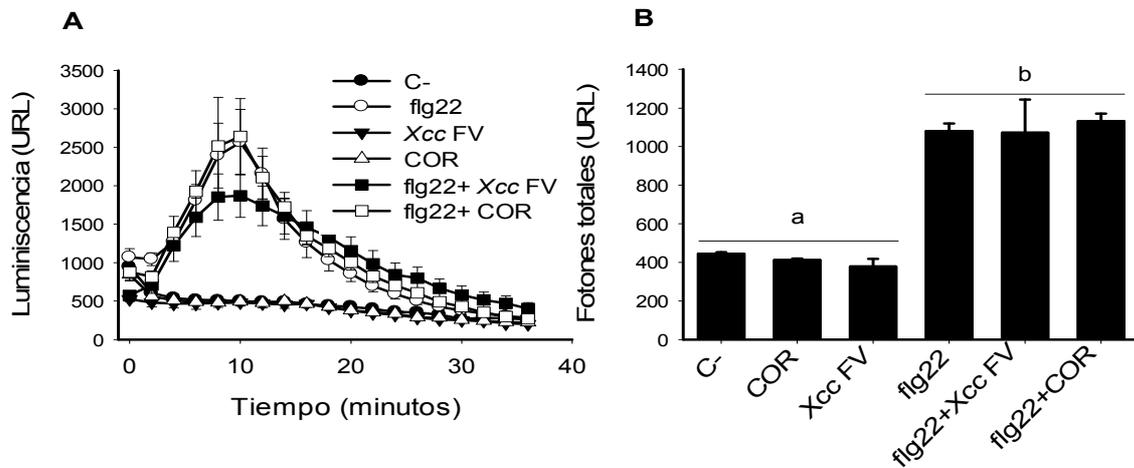


Figura 17. El Xcc FV y la coronatina no afectan la producción de ERO en discos de hoja. **A**, Xcc FV y la coronatina (COR, 1,56 μ M) no impiden la producción de ERO inducida por flg22 (1 μ M) en discos de hoja. Las ERO fueron medidas por el método de quimioluminiscencia de peroxidasa-luminol y los resultados expresados como unidades relativas de luz (URL). **B**, Cuantificación de los fotones totales de cada tratamiento descrito en A. En (A), letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 1 factor, Test de Tukey). Las barras de error representan el ES de dos experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento. En (B), los valores indicados representan los promedios del conteo total de fotones de cada tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,01$ (ANOVA de 1 factor, Test de Tukey). Las barras de error representan el ES de tres experimentos independientes, $n=12$ por tratamiento.

3.1.c. El efecto inhibitorio de Xcc VF y de la coronatina en los estomas requiere NADPH oxidasas

En concordancia con los resultados mostrados anteriormente, encontramos que ni el Xcc FV ni la coronatina son capaces de impedir el cierre estomático inducido por H_2O_2 aplicado exógenamente (Figura 18A). Esta molécula es producida por superóxido dismutasas, a partir de aniones superóxido generados por acción de las NADPH oxidasas.

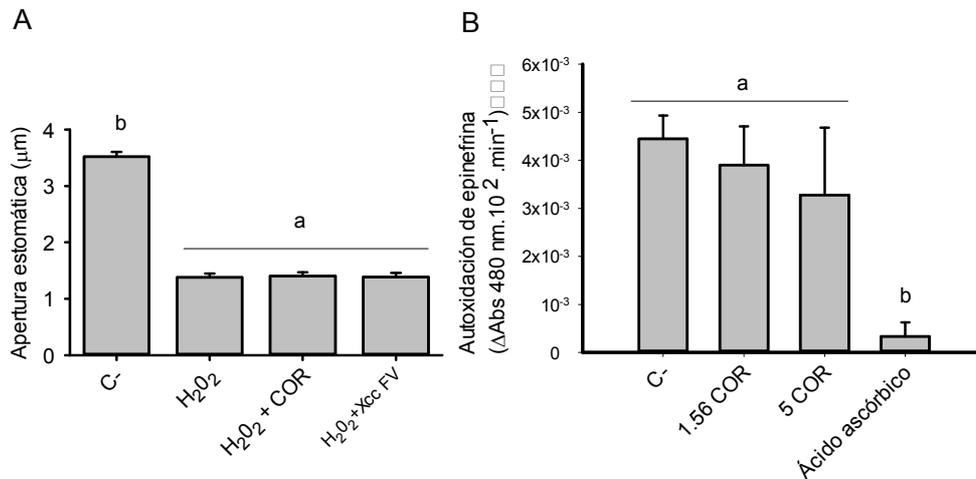
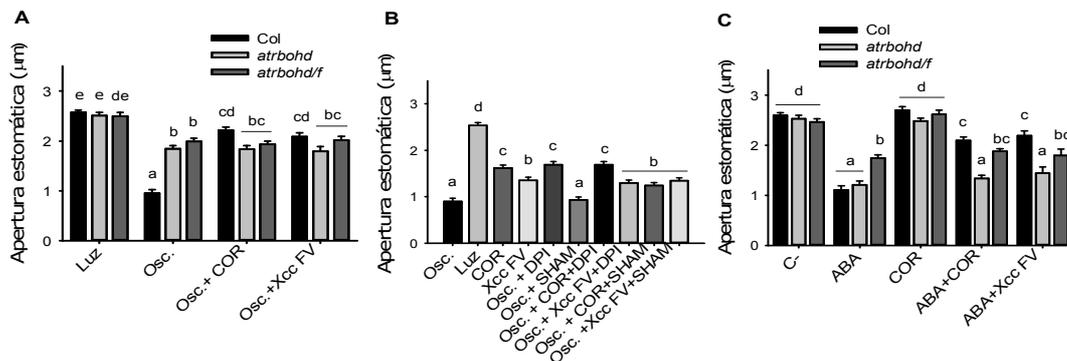


Figura 18. Xcc FV ni la coronatina pueden inhibir el cierre estomático inducido por H₂O₂ y la coronatina no posee actividad de scavenger *in vitro*. **A**, Xcc FV (2µl) y la coronatina (COR, 1,56 µM) no pueden inhibir el cierre estomático inducido por H₂O₂ (100 µM) exógeno. Las aperturas estomáticas fueron medidas luego de 1,5 horas de incubación. **B**, La actividad antioxidante del anión superóxido fue determinada por inhibición de la formación de adenocromo a 480 nm. La coronatina fue evaluada en dos concentraciones diferentes: 1,56 µM (1,56 COR) y 5µM (5 COR). El ácido ascórbico fue utilizado como control positivo de la actividad antioxidante del anión superóxido a una concentración de 5 µM. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 1 factor, Test de Tukey). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes.

Quisimos saber si alguno de estos compuestos era capaz de actuar como *scavenger* del anión superóxido. Para ello, estudiamos el efecto de la coronatina sobre la autooxidación de la epinefrina (no utilizamos el Xcc FV para este experimento ya que desconocíamos su concentración molar y su grado de pureza). En un ensayo *in vitro* en el cual testeamos la coronatina en dos concentraciones, observamos que este compuesto era incapaz de prevenir la autooxidación de la epinefrina, indicando que no actúa como *scavenger* de aniones superóxido (Figura 18B) ni tampoco de H₂O₂, al no poder impedir el cierre estomático inducido por esta molécula (Figura 18A). Para poner a prueba la hipótesis de que estas toxinas pueden inhibir ERO producidas por NADPH oxidasas, investigamos su efecto en la promoción del cierre inducido por oscuridad, el cual requiere NADPH oxidasas (Desikan *et al.*, 2004). Observamos que el cierre estomático mediado por oscuridad se ve disminuido por el tratamiento con Xcc FV y coronatina en plantas Col-0 mientras que este efecto se pierde en mutantes *atrboh1d* y *atrboh1d/f* (Figura 19A); mientras que el inhibidor de NADPH oxidasas difenileniodonio (DPI) revierte el cierre inducido por oscuridad, dicho cierre se produce normalmente aún en presencia de SHAM, el inhibidor de peroxidasas (Figura 19B). El agregado de estas toxinas permite revertir el

cierre estomático inducido por oscuridad sólo en presencia de SHAM pero no de DPI (Figura 19B). Estos resultados sugieren que estas toxinas requieren de las NADPH oxidasas para inhibir el cierre inducido por ABA, flg22 y oscuridad.



Figura

19. El efecto de Xcc FV y la coronatina en el cierre estomático requiere la producción de ERO mediado por NADPH oxidasas. **A**, las mutantes *atrbohd* y *atrbohd/f* están parcialmente afectadas en el cierre estomático inducido por oscuridad y tanto el Xcc FV como la coronatina (COR, 1,56 µM) son incapaces de revertirlo. **B**, Xcc FV, la coronatina (COR, 1,56 µM), el DPI (20 µM) pero no SHAM (2 mM) inhiben el cierre estomático inducido por oscuridad. **C**, Xcc FV y la coronatina (COR, 1,56 µM) no logran inhibir el cierre inducido por ABA (20 µM) en las mutantes *atrbohd* y *atrbohd/f*. En (B) el Xcc FV, la coronatina, DPI y SHAM fueron agregados al inicio de la incubación en una solución tampón 10/10 por 2 horas. En A y C, tanto el Xcc FV como la coronatina fueron agregados al medio 10 minutos previo a los tratamientos respectivos. Las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ en A y C (ANOVA de 2 factores) y B (ANOVA de 1 factor, Test de Tukey). Las barras de error representan ES de dos experimentos en A, B y C, $n=40$ por tratamiento en todos los ensayos.

De manera consistente con la hipótesis del rol inhibitorio del Xcc FV y de la coronatina sobre las NADPH oxidasas, estos compuestos no tuvieron efecto sobre el cierre inducido por oscuridad en estas mutantes o en plantas Col-0 tratadas con el inhibidor DPI (Figura 19B). Se observó un fenómeno similar al evaluar la promoción del cierre por ABA, ya que encontramos que la doble mutante *atrbohd/f*, que es solo parcialmente insensible al ABA en el cierre estomático debido a la redundancia existente en la señalización de esta hormona (Kwak et al., 2003), cierra sus estomas en una manera muy similar, en presencia o en ausencia de Xcc FV o coronatina (Figura 19C), lo cual también apoya la hipótesis de que estos compuestos ejercen un efecto inhibitorio sobre las NADPH oxidasas. Sin embargo, la mutante simple *atrbohd*, la cual exhibe una respuesta normal a ABA pero es totalmente insensible a flg22 (Kwak et al., 2003; Macho et al., 2012), también resultó insensible a Xcc FV y a coronatina para la promoción de cierre estomático mediada por ABA (Figura 19C). Este resultado no fue el esperado, dado que hipotetizábamos que estos

compuestos probablemente inhibieran AtRBOHF y que, por ello, aún en ausencia de AtRBOHD, podrían inhibir el cierre estomático inducido por ABA.

Quisimos evaluar si la posible regulación de la coronatina y el *Xcc* FV sobre las NADPH oxidasas era a través de proteínas quinasa que se sabe regulan por fosforilación a estas enzimas. OST1 fosforila y activa a AtRBOHF (Sirichandra *et al.*, 2009a), mientras que BIK1 hace lo mismo con AtRBOHD (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). En consecuencia el fenotipo de la mutante *ost1-2* es de insensibilidad a ABA mientras que el *bik1* es de insensibilidad a flg22 para el cierre estomático. Para estos experimentos sólo utilizamos coronatina. En ensayos de promoción de cierre estomático observamos que mutaciones que afectan a OST1 y BIK1, no afectan su sensibilidad a coronatina para el cierre estomático inducido por flg22 en el caso de *ost1-2*, y por ABA en el caso de *bik1* (Figura 20A, B).

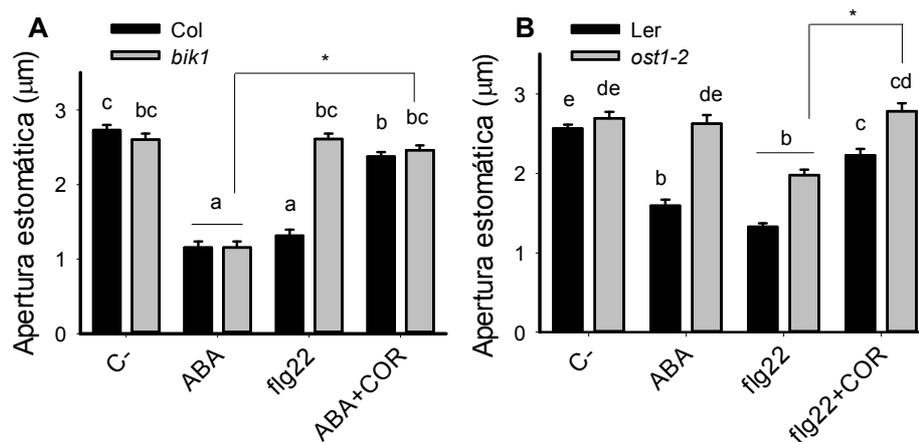


Figura 20. La coronatina no depende de BIK1 ni de OST1 para revertir el cierre estomático inducido por ABA y flg22. **A**, la mutante *bik1* es sensible a coronatina (COR, 1,56 µM) para el cierre inducido por ABA. **B**, la mutante *ost1-2* es sensible a coronatina (COR, 1,56 µM) para el cierre inducido por flg22. En (A) y (B), la coronatina fue agregada 10 minutos antes de la aplicación de los tratamientos indicados. Las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 2 factores). Los datos marcados con asteriscos son significativamente diferentes según el test de ANOVA *, $p < 0,05$. Las barras de error representan ES de dos experimentos, $n=40$ por tratamiento en todos los ensayos.

3.1.d. La coronatina revela una posible regulación de ERO sobre componentes de la vía de señalización de ABA en estomas

Debido a la insensibilidad de la mutante *atrbohhd* a coronatina, hipotetizamos que una síntesis anormal de ERO en esta mutante podía estar provocando alteraciones en la red de señalización

de ABA. Para investigar esta posibilidad, testamos la capacidad de la coronatina para inhibir el cierre de estomas inducido por ABA en otras mutantes que, como *atrboh1d*, son también insensibles a flg22 pero no a ABA para la promoción de cierre estomático. Con este fin utilizamos las mutantes *mpk6*, *mpk3* (Montillet *et al.*, 2013), *npr1-3* (Zeng and He, 2010) y *lecrkVI.2-1* (Singh *et al.*, 2012). Observamos que en estas mutantes, al igual que en *atrboh1d*, la toxina era incapaz de inhibir el cierre estomático mediado por ABA (Figura 21A).

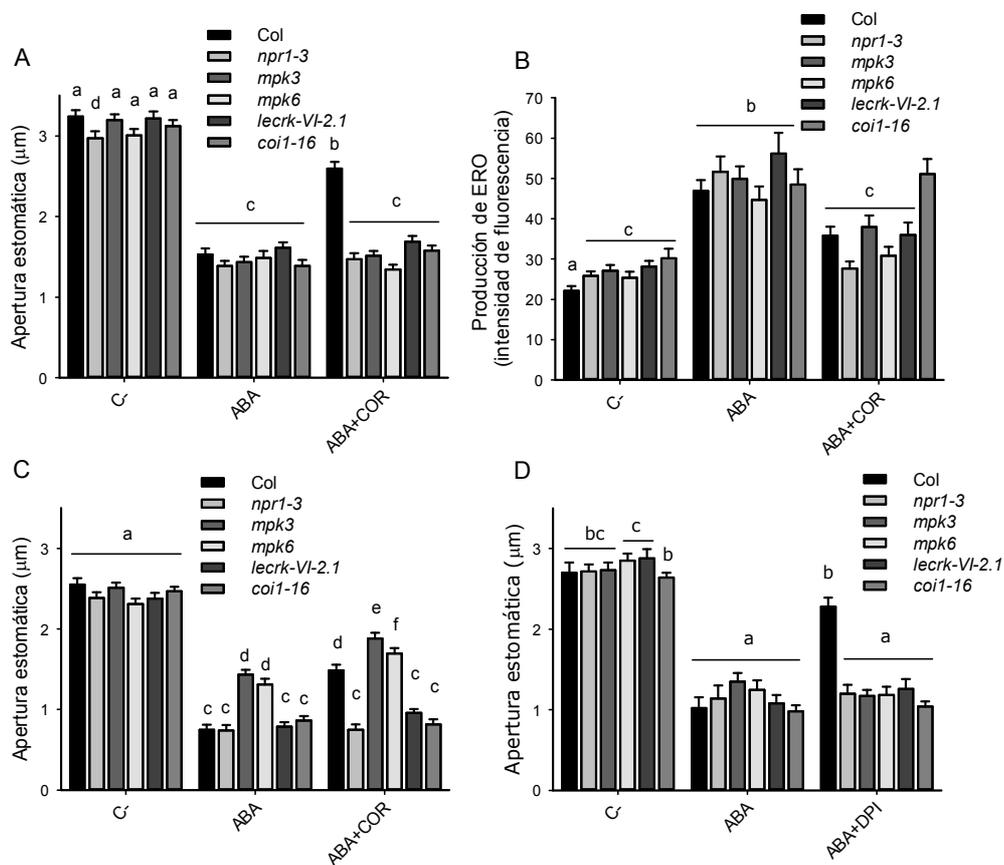


Figura 21. Las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI-2.1* exhiben insensibilidad a coronatina en respuesta a ABA y a DPI. **A**, La coronatina (COR, 1,56 μM) es incapaz de inhibir el cierre estomático inducido por ABA (20 μM) en las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3*, *lecrkVI-2.1* y *coi1-16*. **B**, la coronatina (COR, 1,56 μM) inhibe la producción de ERO mediada por ABA en células de la guarda en las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI-2.1*. **C**, la coronatina (COR, 1,56 μM) revierte la inhibición de la apertura estomática dependiente de luz y mediada por ABA (20 μM) en las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI-2.1*. **D**, El tratamiento con DPI (20 μM) es incapaz de interferir con el cierre estomático inducido por ABA (20 μM) en mutantes *npr1-3*, *mpk3*, *mpk6* y *lecrkVI-2.1* pero no en plantas de genotipo silvestre, Col. En (D) DPI fue agregada a la solución tampón de incubación 10 minutos antes del agregado de ABA (20 μM). En (A), (B) y (C) la coronatina fue agregada 10 minutos antes que el ABA. En (A), (B) y (C) y (D) las aperturas de estomas fueron medidas 1,5 h luego de los tratamientos. Las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ en A,B, C y D (ANOVA de 2 factores). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento (A,B, C y D).

Como la coronatina inhibe la producción de ERO inducida por ABA en plantas Col-0, pensamos que en las mutantes insensibles a coronatina, dicha producción no se vería afectada por el efecto de la coronatina. Sin embargo, observamos que esta toxina sí inhibe la producción de ERO en las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* en una manera muy similar a lo que ocurre en plantas Col-0 (Figura 21B), indicando que estas mutantes están afectadas río abajo o de modo independiente respecto de la producción de ERO dependiente de NADPH oxidasas. Estos resultados sugieren que las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* poseen la capacidad de cerrar los estomas en respuesta a ABA del mismo modo que las plantas Col-0, pero sin requerir la síntesis de ERO. Es por ello que luego evaluamos el efecto del DPI en el cierre estomático mediado por ABA en estas mutantes y encontramos que, de modo similar a lo observado para la coronatina, este inhibidor impide el cierre de estomas inducido por ABA en plantas Col-0 pero no en las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* and *lecrkVI.2-1* (Figura 21D), apoyando la hipótesis de que estas mutantes pueden cerrar sus estomas en respuesta a ABA, sin depender de la síntesis de ERO mediada por NADPH oxidasas. Como podría esperarse dada la aparente alteración que presentan en la señalización de ERO, encontramos que estas mutantes también poseen sensibilidad reducida a H₂O₂ aplicado exógenamente (Figura 22). En forma consistente con el rol de COI1 como el receptor de la coronatina, no observamos un efecto inhibitorio de la coronatina ni en el cierre estomático ni en la producción de ERO en la mutante del receptor, *coi1-16* (Figura 21A,B). Sin embargo, resultó inesperado que el DPI no lograra inhibir el cierre estomático inducido por ABA en esta mutante, lo cual sugiere que la señalización de ROS también podría estar afectada en ella.

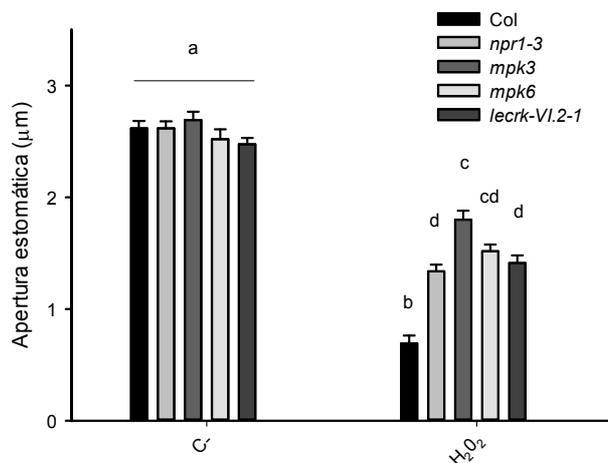


Figura 22. La sensibilidad estomática de las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* frente a H₂O₂ está disminuída. Las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* están parcialmente afectadas en la sensibilidad a H₂O₂ (100 μM). Las aperturas estomáticas fueron medidas 1,5 h luego de la aplicación del tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 2 factores). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, n=40 por tratamiento.

Estos resultados sugieren que las ERO podrían regular negativamente algunos componentes en la señalización de ABA y por ello logran compensar la anormal señalización de ERO en las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1*, y posiblemente en algunas mutantes de las NADPH oxidasas.

La coronatina interfiere también con la inhibición por flg₂₂ de la apertura estomática inducida por luz, aliviando el efecto inhibitorio de la flg₂₂ sobre las corrientes de entrada de K⁺ (Zhang et al., 2008). Dado que existe fuerte evidencia de que la red de señalización de ABA difiere entre la inhibición de apertura estomática y en la promoción de cierre (Yin *et al.*, 2013), evaluamos si las mutantes *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* están similarmente afectadas en la sensibilidad a coronatina en ensayos de inhibición de apertura lumínica por ABA. Tal como se observó en los experimentos de promoción de cierre, la coronatina tampoco pudo impedir la inhibición de apertura por ABA en las mutantes *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* (Figura 21C). Como fue reportado previamente, la mutante *mpk3* (Gudesblat *et al.*, 2007), exhibe parcial insensibilidad a la inhibición de apertura lumínica por ABA. Tanto la mutante *mpk3* como la *mpk6*, resultaron sólo parcialmente insensibles a coronatina. Como era esperado, la mutante *coi1-16* resultó también insensible a coronatina por lo que respondieron normalmente a ABA tanto en presencia como en

ausencia de este compuesto. Estos resultados indican que los componentes de señalización afectados por la coronatina, los cuales son requeridos para la síntesis de ERO, están activos tanto para la promoción de cierre como la inhibición de apertura mediadas por ABA.

3.1.e. El MeJA y la coronatina inhiben el cierre de estomas inducido por flg22 a través de mecanismos diferentes

La coronatina y los jasmonatos activan una cascada de señalización similar, aunque sus efectos sobre los estomas son diferentes. Debido a la existencia de evidencia conflictiva en la literatura acerca del efecto que el MeJA posee en estomas (Gehring *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2011; Montillet *et al.*, 2013; Savchenko *et al.*, 2014; Suhita *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008), que incluyen resultados que sugieren que la razón de la variabilidad observada de su efecto sobre el cierre estomático es debido a las dosis utilizadas (Speth *et al.*, 2009), decidimos primero realizar una curva dosis respuesta con esta hormona sola y en presencia de flg22. Observamos que el MeJA por sí solo es incapaz de cerrar los estomas en concentraciones que oscilan entre 0,1 nM y 10 μ M, como fue previamente publicado (Montillet *et al.*, 2013) y que además inhibe el cierre mediado por flg22 en un amplio rango de concentraciones (Figura 23A).

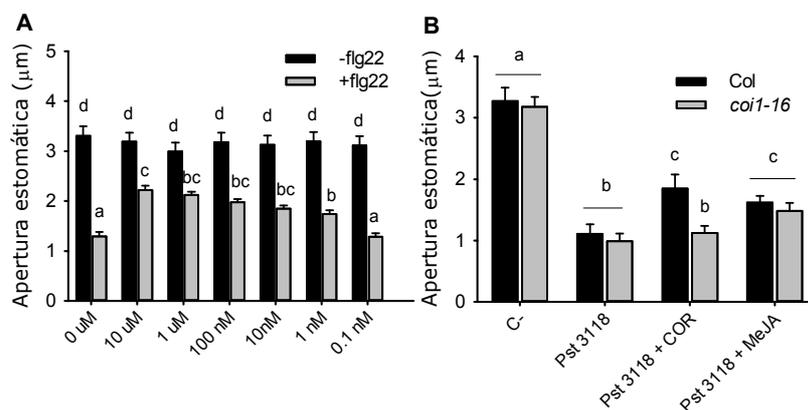


Figura 23. El MeJA previene el cierre estomático mediado por flg22 y bacterias de modo independiente de COI1. **A.** El MeJA no induce el cierre estomático pero sí inhibe el cierre inducido por flg22. El MeJA fue agregado a las concentraciones indicadas 10 minutos antes que flg22 (5 μ M). **B.** MeJA (1 μ M) pero no la coronatina (COR 1,56 μ M) puede inhibir parcialmente el cierre estomático inducido por una cepa deficiente en la producción de coronatina, *Pst* DC 3118, en la mutante insensible a coronatina *coi1-16*. En (A) y (B) el MeJA o la coronatina fueron agregados 10 minutos previo a otros tratamientos. En (A) y (B) las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 2 factores). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento en (A,B).

Aunque en nuestras manos el MeJA no logró promover el cierre de estomas, sí pudo inhibir el crecimiento de la raíz en plántulas, como era de esperar (Figura 24A), lo cual muestra la actividad biológica del MeJA utilizado para los ensayos estomáticos. Mientras que la coronatina modula la defensa estomática de forma dependiente de COI1 (Melotto *et al.* 2006), el MeJA inhibe el cierre estomático inducido por flg22 independientemente de su receptor (Montillet *et al.*, 2013). Consistentemente con este hallazgo, encontramos que el MeJA también es capaz de inhibir el cierre estomático inducido por la bacteria mutante en la producción de coronatina *Pst* DC3118, tanto en plantas silvestres como en la mutante *coi1-16* (Figura 23B); y que la mutante *myc2*, afectada en la señalización de JA río abajo del receptor COI1, exhibió una sensibilidad normal a la inhibición de MeJA para el cierre estomático inducido por flg22 (Figura 24B). Conocíamos que la coronatina mediaba la prevención del cierre estomático de modo dependiente de COI1 y que esta toxina inhibía el crecimiento del largo de raíz (Feys *et al.*, 1994); sin embargo no sabíamos si estos fenotipos eran también causados por *Xcc* FV. Como vemos en la Figura 24C, el *Xcc* FV no es capaz de inhibir el crecimiento de la raíz, como sí lo hace la coronatina, pero sin embargo, sí depende de COI1 para la reapertura estomática (Figura 24 D), sugiriendo que es probable que no se trate de una molécula muy similar a la coronatina o a sus análogos, los jasmonatos. La coronatina es capaz de interferir con el cierre estomático, activando los factores de transcripción MYC2 y éste a su vez a los factores ANAC019, ANAC055 y ANAC072 (Zheng *et al.*, 2012). Para saber si *Xcc* FV también los requería, realizamos el ensayo de apertura estomática en las mutantes *myc2* y triple *anac* (triple mutante de ANAC019, ANAC055 y ANAC072) y observamos que este compuesto también es incapaz de reabrir los estomas en ausencia de estas proteínas, indicando que, por lo visto, estas dos toxinas comparten mecanismos de acción sobre la señalización estomática (Figura 24D).

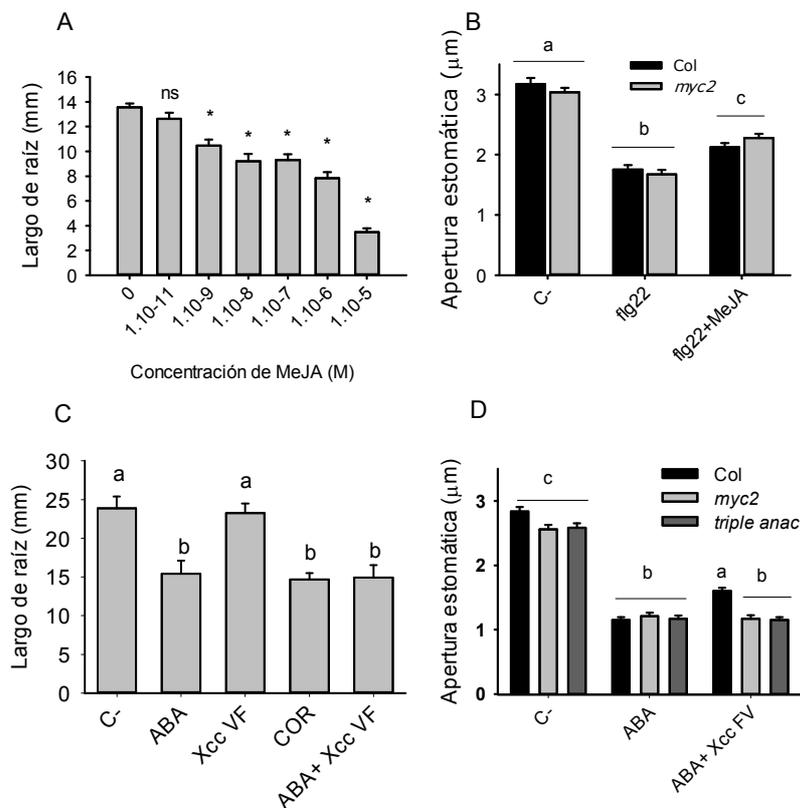


Figura 24. El efecto del MeJA y Xcc FV en el crecimiento de la raíz y en la promoción del cierre estomático mediado por flg22 en la mutante *myc2* y *triple anac*. **A**, Curva dosis respuesta de MeJA en raíces de *A. thaliana*. **B**, El MeJA (1 μM) inhibe el cierre estomático inducido por flg22 (5 μM) en la mutante *myc2*. **C**, El Xcc FV no inhibe el crecimiento de la raíz a diferencia de la coronatina. **D**, El Xcc FV no es capaz de revertir el cierre estomático inducido por ABA (20 μM) en las mutantes *myc2* ni *triple anac*. En (A) y (C), los resultados están presentados como el promedio del largo de 30 de raíces de plántulas de 7 días por tratamiento, colectados de dos experimentos independientes. En (A), los datos marcados con asteriscos son significativamente diferentes del control no tratado según el Test de Student, $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 2 factores) en (B) y $p < 0,05$ (ANOVA de 1 factor) en (C). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento en (B) y (D)

Estos resultados concuerdan con hallazgos previos que demuestran un efecto del MeJA sobre los estomas independiente del receptor COI1, y sugieren que esta hormona ejerce su efecto en los estomas en forma independiente también de otros componentes de la señalización de JA.

3.1.f. El bacteriofitocromo de *Xcc*, *XccBphP*, modula la respuesta inmune de las plantas

Con el fin de explorar si la mutante de *Xcc* en el bacteriofitocromo, *XccBphP*, posee algún rol biológico durante el proceso de colonización, realizamos un ensayo de infección en plantas de *A. thaliana*. Nuestros resultados muestran que, tres días post-infección, la cepa mutante *XccBphP*

alcanza un mayor nivel de crecimiento que la cepa silvestre (Figura 25A), mientras que la cepa complementada con el gen completo (pXccBphP) que expresa dicho fitocromo, muestra un nivel de infección atenuado, similar al de la cepa silvestre. A la luz de este resultado, decidimos continuar con el estudio de este fenotipo más virulento, observando qué sucedía con el cierre y apertura de estomas inducido por esta cepa. Quisimos investigar si la mayor virulencia de la cepa mutante, durante la infección, se debía a una mayor capacidad de penetrar por los estomas. Es por ello que medimos la capacidad de promover el cierre estomático y luego su capacidad de reabrir los estomas, habida cuenta que *Xcc* es capaz de producir *Xcc* FV como ya fue mencionado anteriormente.

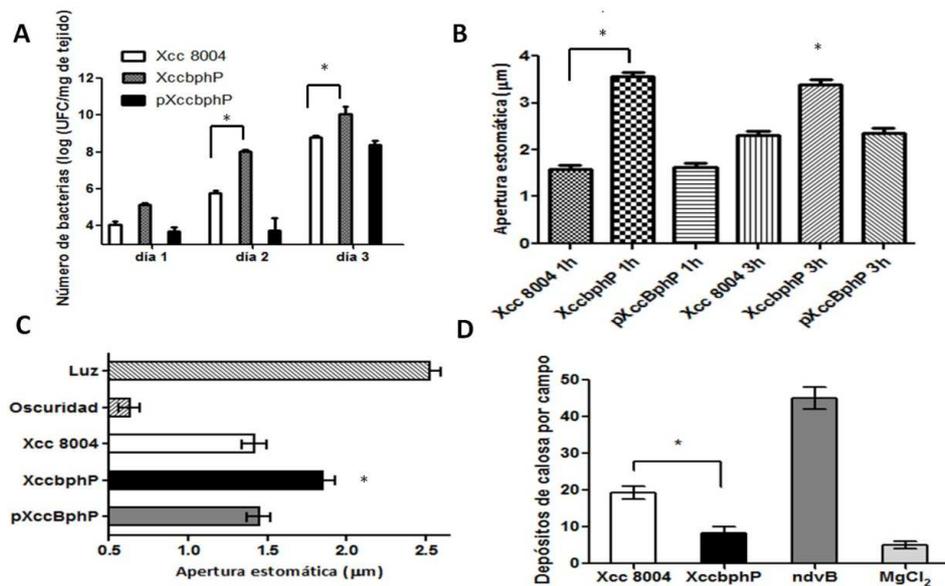


Figura 25. La mutante del fitocromo, XccbphP, posee características más virulentas que la cepa silvestre. **A**, Curva de infección a 1, 2 y 3 días post infección de plantas de *A. thaliana* con las cepas *Xcc* 8004, *XccbphP* y la complementada pXccbphP. Las plantas fueron infectadas por spray a una $OD_{600} = 0,1$. **B**, Apertura estomática de epidermis incubadas a 1 y 3 horas con las cepas *Xcc* 8004, *XccbphP* y la complementada pXccbphP. **C**, Aperturas estomáticas de epidermis inicialmente incubadas en oscuridad (salvo control con luz) e incubadas en presencia de las cepas *Xcc* 8004, *XccbphP* y la complementada pXccbphP para evaluar su capacidad de reapertura estomática luego de 3 horas de incubación. **D**, Medición de deposición de calosa en hojas de plántulas de *A. thaliana* 24 horas post incubación con las cepas *Xcc* 8004, *XccbphP* y la complementada pXccbphP y *ndvB* como control. $MgCl_2$ representa el control con sin tratar. En (A) y (B) los asteriscos indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 2 factores). En (C) y (D) los asteriscos indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (ANOVA de 1 factor). Las barras de error representan ES de tres experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento, en todos los experimentos.

Sorprendentemente, los estomas de las epidermis incubadas con *XccbphP*, permanecían más abiertos respecto de aquellas epidermis incubadas con la cepa silvestre (Figura 25B). Vimos

también que, al igual que en el ensayo de infección, la cepa complementada, pXccBphP, recuperaba el fenotipo de la cepa silvestre. A las 3 horas de incubación, vemos que Xcc 8004 revierte el cierre estomático, como la cepa complementada, mientras que XccbphP no presenta diferencias en apertura respecto de 1 hora post-incubación (Figura 25B). En este sentido, quisimos explorar si ese fenotipo de no inducción del cierre de estomas a 1 hora, se debe a un exceso en la producción de Xcc FV. Por ello, realizamos un ensayo de inhibición de cierre estomático inducido por oscuridad. Colocamos a todas las epidermis en condiciones de oscuridad (salvo el control con luz) solas o en presencia de las distintas cepas de Xcc, con el fin de ver la capacidad de éstas, de interferir con el cierre estomático inducido por oscuridad, en un intento por recrear las condiciones naturales de cierre de estomas nocturno (aunque el cierre estomático nocturno también se debe al reloj biológico y no sólo a la oscuridad). En la Figura 25C, vemos que la cepa XccbphP interfiere con el cierre en mayor grado que la cepa silvestre y la complementada, sugiriendo que tal vez esta mutación desreprime algunos genes involucrados en la síntesis de este Xcc FV, haciendo que produzca mayor cantidad de esta toxina, lo cual pudiera enmascarar el cierre estomático inducido por sus MAMPs a 1 hora post-incubación. Dado que esta estimación de cantidad de Xcc FV no es del todo rigurosa porque no podemos cuantificar su masa y por ende no podemos estar seguros de que el fenotipo observado se deba a cantidad de toxina producida, otra explicación posible es que esta mutante pueda producir en mayores cantidades la proteasa de flagelina, AprA, que pudiera estar degradando al flagelo y así enmascarar la flg22. También vimos que, al incubar las epidermis en presencia de XccbphP y flg22, los estomas se cierran a 1 y 3 horas (no mostrado), lo que sugiere que quizás sea más factible que XccbphP esté produciendo alguna proteasa y no produciendo más Xcc FV. Complementando estas observaciones, evaluamos la capacidad de esta cepa mutante más virulenta de suprimir la deposición de calosa, como otra estrategia de patogenicidad. Como controles utilizamos la cepa silvestre y la cepa ndvB, la cual ya ha sido descrita y se ha reportado su incapacidad para suprimir la deposición de calosa (Rigano *et al.*, 2007a). XccbphP exhibe un fenotipo de supresión de calosa mayor al detectado para la cepa silvestre, lo que refuerza sus características más virulentas (Figura 25D).

3.1.g. Sensibilidad diferencial a coronatina en variantes naturales de *A. thaliana*

A. thaliana es una especie nativa de Eurasia pero hoy dispersa por todo el mundo. Su habilidad para propagarse fácilmente y su alta variabilidad fenotípica vuelve a esta especie un modelo ideal para estudios evolutivos funcionales y genéticos (Horton *et al.*, 2012). A la fecha, existen más de 1300 variantes naturales de *A. thaliana* secuenciadas gracias al proyecto “1001 genomas” llevado adelante en consorcio entre varios laboratorios del mundo (Cao *et al.*, 2011). La secuenciación de todos estos genomas de *A. thaliana* se convierte en una herramienta muy poderosa para analizar los patrones de variabilidad genética y posibles blancos de selección natural (Horton *et al.*, 2012).

En este contexto, quisimos estudiar si la sensibilidad a coronatina en diferentes variantes naturales (ecotipos) poseía una base adaptativa. Si hubiera habido presión de selección, sería esperable encontrar variabilidad natural. Dado que *coi1-16* es sensible a flg22 y ABA en estomas (Melotto *et al.*, 2006), no queda del todo claro, *a priori*, cuál sería la ventaja adaptativa de expresar *COI1* en estomas para la planta, percibiendo a la coronatina producida por *Pst* DC 3000 que permite un mayor grado de colonización del tejido a través de estomas. Por lo tanto hipotetizamos que durante la evolución podrían haberse seleccionado variantes alélicas de *COI1* (o quizás también de otros elementos de señalización de JA) que reduzcan la sensibilidad estomática a la coronatina sin disminuir la respuesta contra patógenos necrótrofos o herbívoros en otros tejidos. Para examinar esta posibilidad, examinamos el gen *COI1* (At2G39940) y su región promotora en diferentes variantes naturales. Para ello, decidimos hacer una pre-selección de variantes naturales que presentaran variación con respecto a Col-0 (dentro de las que teníamos en el banco de semillas propio). Elegimos 7 ecotipos (incluido Col-0, de referencia, ver Sección 2.17).

Con el grupo integrado por 7 ecotipos, decidimos realizar experimentos de apertura estomática, utilizando como control de sensibilidad a coronatina a nuestro ecotipo Col-0 para analizar sensibilidad diferencial a estas toxinas. A ese grupo de 7 ecotipos le sumamos un conjunto de 145 ecotipos, elegidos al azar dentro de la base de datos, para posteriores análisis evolutivos, totalizando un n=152 variantes naturales.

Como ya fue descrito, *Pst* DC 3000 y *Xcc* 8004 son capaces de interferir con el cierre estomático inducido por MAMPs (Gudesblat *et al.*, 2009; Melotto *et al.*, 2006) ya que producen coronatina y *Xcc* FV respectivamente. Para evaluar si alguna de las variantes naturales elegidas era menos sensible a la coronatina o al *Xcc* FV, realizamos un ensayo de promoción de cierre estomático en las distintas variantes por *Pst* DC 3000 y *Xcc* 8004 y durante 1 y 3 horas. Como puede verse en la Figura 26, las variantes naturales evaluadas cierran los estomas de manera similar a Col-0 en respuesta a *Pst* DC 3000 y *Xcc* 8004 al cabo de 1 hora, sin embargo a las 3 horas post incubación con las bacterias, las accesiones Mv-0 y ICE-75 mostraron ser insensibles a la coronatina y al *Xcc* FV, ya que no pudieron reabrir sus estomas, al revés del resto de los ecotipos (Figura 26A). Sin embargo, al mirar los experimentos con cada bacteria por separado (Figura 26 A,B), notamos que hay mucha variabilidad en la sensibilidad a *Pst* Dc 3000 con respecto a *Xcc* 8004 en todos los ecotipos analizados a las 3 horas post-incubación, salvo Mv-0 y ICE-75.

Para asegurarnos que la incapacidad de reapertura de los estomas de estas dos variantes naturales se deba efectivamente a la insensibilidad a coronatina y/o al *Xcc* FV, decidimos evaluar la respuesta estomática de estos ecotipos en respuesta a ABA, en presencia de coronatina pura. Observamos que, a diferencia de lo visto en presencia de las bacterias, los ecotipos Kondara, Bur-0, Kas-2, también resultaron insensibles a la coronatina, además de Mv-0 y ICE-75 (Figura 26C).

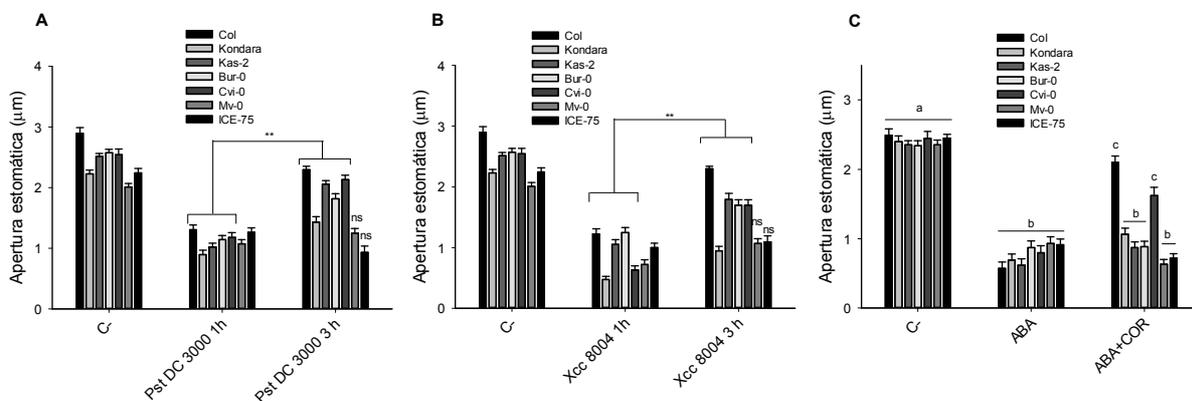


Figura 26. Insensibilidad estomálica de diferentes ecotipos en *A. thaliana* a *Pst* DC 3000, *Xcc* 8004 y coronatina. **A.** Las accesiones Mv-0 y ICE-75 son insensibles a la modulación estomálica por *Pst* DC 3000 (10^8 UFC/ml) luego de tres horas de incubación. **B.** Los ecotipos Mv-0 y ICE-75 son insensibles a la modulación estomálica por *Xcc* 8004 (10^8 UFC/ml) luego de tres horas de incubación. **C.** La coronatina (COR, $1,56 \mu\text{M}$) es incapaz de inhibir el cierre estomático inducido por ABA ($20 \mu\text{M}$) en los ecotipos Kondara, Kas-2, Bur-0, Mv-0 y ICE-75. En (C) la COR fue agregada a la solución tampón de incubación 10 minutos antes del agregado de ABA ($20 \mu\text{M}$). En (A) y (B) las aperturas estomáticas fueron medidas a 1 y 3 h post-incubación con las bacterias respectivas. En (C) las aperturas de estomas fueron medidas 1,5 h luego de los tratamientos. Las letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,01$ en C (ANOVA de 2 factores). Los asteriscos indican diferencias significativas según $p < 0,01$ en A y B (ANOVA de 2 factores). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, $n=40$ por tratamiento (A y B) y un solo experimento en (C).

Dado que los ecotipos que mostraron variabilidad en la sensibilidad a *Pst* DC 3000, *Xcc* 8004 y coronatina de forma consistente en los experimentos fueron Mv-0 y ICE-75, decidimos quedarnos con dichos ecotipos como candidatos para futuros experimentos.

A la vista de estos resultados, quisimos examinar si estas variantes naturales de *A. thaliana* eran todas igualmente sensibles a MeJA, hormona vegetal cuyo receptor es COI1, en ensayos de inhibición de crecimiento de la raíz. Para poder realizar este ensayo, crecimos plántulas de *A. thaliana* en medio líquido en presencia y ausencia de MeJA y evaluamos el crecimiento de la raíz 7 días post tratamiento.

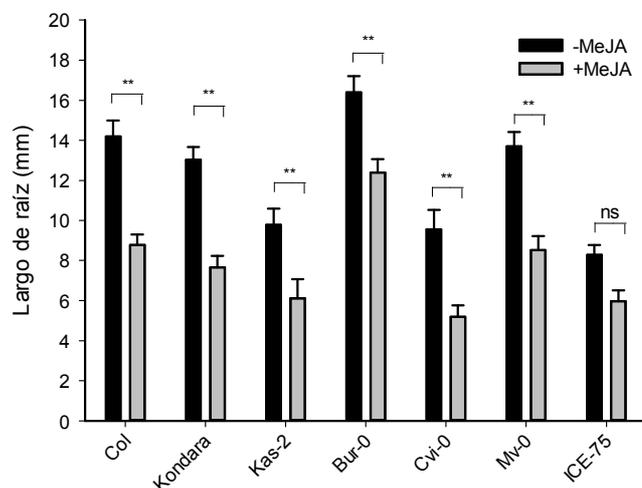


Figura 27. Ensayo de largo de raíz en plántulas de distintas accesiones de *A. thaliana* en respuesta a MeJA. El ecotipo ICE-75 presenta insensibilidad a MeJA ($50 \mu\text{M}$). Semillas estériles de *A. thaliana* fueron germinadas en medio MS ágar. Dos días post germinación, fueron seleccionadas aquellas plántulas que se mostraron parejas en su crecimiento y se traspasaron en esterilidad a medio líquido $\text{MS} \frac{1}{2} \times$ durante 5 días en presencia o ausencia de MeJA ($50 \mu\text{M}$). A la semana de comenzado el experimento, las raíces de las plántulas fueron medidas utilizando el software Image J. Los resultados muestran el promedio de dos ensayos independientes donde el $n = 10$ en cada tratamiento. Dos asteriscos indican diferencias significativas con $p < 0,01$ (ANOVA de 2 factores). NS, no significativo.

Como puede verse en la Figura 27, el único ecotipo insensible al agregado de MeJA fue ICE-75, que a su vez, fue una de las dos variantes naturales que siempre mostraron insensibilidad tanto a bacterias como a coronatina en su respuesta estomática. Dado que ICE-75 parece ser insensible también a MeJA, parecería que esta variante natural puede poseer algún problema en la percepción tanto de MeJA como de coronatina a través de su receptor COI1, o en su señalización río abajo. Estos resultados sugieren que el receptor COI1 de este ecotipo, podría estar afectado en general y no de modo específico en la percepción de coronatina, como hubiéramos esperado. No sucede lo mismo con el ecotipo Mv-0 que muestra normal sensibilidad a MeJA pero insensibilidad a coronatina a nivel estomático. Por lo tanto la o las mutaciones responsables de la insensibilidad a coronatina de Mv-0 serían de potencial utilidad para transferirlas a especies de interés agronómicos de manera de hacerlas resistentes a *Pst* DC3000.

Habiendo encontrado variabilidad en la sensibilidad a coronatina en algunos ecotipos de *A. thaliana*, hipotetizamos que la causa de este fenotipo podía deberse a alguna presión de selección, durante la evolución, del gen *COI1* ejercidas por bacterias productoras de coronatina o de toxinas de modo de acción similar.

Para poner a prueba esta hipótesis, decidimos realizar tests evolutivos para evaluar si la variación presente en el gen *COI1* de distintos ecotipos, comparadas con Col-0, se podía atribuir al efecto de la selección natural. Dado que nuestro análisis está circunscripto a variantes naturales dentro de una misma especie, elegimos una prueba que nos brinde información acerca de la neutralidad o no de los polimorfismos encontrados: Test de Tajima (Simonsen *et al.*, 1995; Tajima, 1989). La prueba de Tajima consiste en un test estadístico que analiza si la variación nucleotídica que se observa en un conjunto de secuencias de ADN puede explicarse por una evolución neutral, es decir por un equilibrio entre la mutación y la deriva génica. Si la hipótesis nula de la prueba es rechazada, pueden plantearse diferentes escenarios para explicar los patrones de variación tales como la selección natural, ya sea positiva, equilibradora o negativa y aspectos relacionados con la demografía de las poblaciones naturales. Para realizar esta prueba se necesitan, al menos, 3 secuencias homólogas de ADN a comparar. El estadístico de Tajima computa la relación entre el número total de polimorfismos de todas las muestras a evaluar

(estimador θ , que es independiente de las frecuencias alélicas y del tamaño de la muestra) y el número promedio de mutaciones entre pares de secuencias dentro del total de la muestra (estimador π). El resultado permite apoyar o no la hipótesis de que la secuencia de interés evaluada ha sufrido algún proceso de selección.

Decidimos entonces realizar el test de Tajima en una muestra conteniendo la secuencia del gen *COI1*, incluyendo sus intrones y exones y su región promotora. Utilizamos las secuencias de *COI1* de 152 accesiones, utilizando Col-0 como nuestra referencia e incluyendo en el análisis las accesiones ensayadas experimentalmente. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos de secuenciación del proyecto "1001 genomas". El Software utilizado en este análisis se detalla en la Sección 2.17.

La salida del programa, al analizar las secuencias de *COI1* en los mencionados ecotipos, se muestra en la Figura 28.

```

Tajima's Test
Input Data File: C:\...FASTA archivos\Maia.fas
Population used: Italiana
Number of sequences used: 152
Selected region: 1-5000 Number of sites: 5000
Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 4927
Number of polymorphic (segregating) sites, S: 110
Total number of mutations, Eta: 110
Average number of nucleotide differences, k: 19,26847
Nucleotide diversity, Pi: 0,00391
Theta (per sequence) from Eta: 19,65057
Theta (per site) from Eta: 0,00399
Tajima's D: -0,06181 Statistical significance: Not significant, P > 0.10
Sliding Window Option
Sites with alignment gaps were not counted in the window length (and slide)
Window length: 100 Step size: 25
n.d., not determined; # P<0.10; * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001

===== Synonymous and NonSynonymous Substitutions =====
Total number of sites in coding regions: 1779
Total number of sites excluding complex codons or codons with gaps: 1779
Total number of sites in noncoding regions: 3221
Total number of sites in noncoding regions excluding gaps/missing data: 3148
Coding region: Tajima's D: 0,07282 Not significant, P > 0.10
Total number of polymorphic sites: 22
Synonymous sites: Tajima's D(Syn): -0,61210 Not significant, P > 0.10
Total number of polymorphic sites: 9
NonSynonymous sites: Tajima's D(NonSyn): 0,33296 Not significant, P > 0.10
Total number of polymorphic sites: 17
Silent sites: Tajima's D(Sil): -0,14420 Not significant, P > 0.10
Total number of polymorphic sites: 93
Tajima's D (NonSyn/Syn) ratio: -0,54396

```

Figura 28. Tabla de salida de la ejecución de la prueba Tajima. El valor del estadístico Tajima D es -0,06181 y en consecuencia la prueba no permite rechazar la hipótesis nula de modelo neutro o al azar.

Viendo el valor del estadístico (Tajima D: -0,06181), muy cercano a cero y no significativo (NS) (Figura 28), podríamos decir que la variación total observada en estas secuencias de *COI1* no se desvía de lo esperado bajo un modelo de evolución neutral. A continuación mostramos la distribución del estadístico D de Tajima a lo largo de toda la secuencia nucleotídica analizada de *COI1*.

En la Figura 29 se muestra la distribución del estadístico D de Tajima en toda la secuencia nucleotídica analizada de *COI1*.

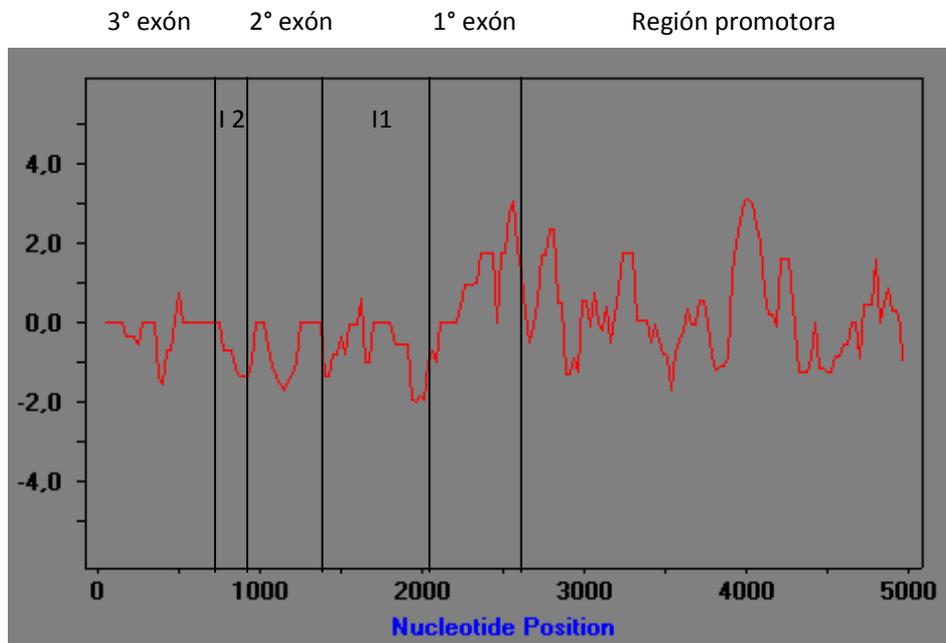


Figura 29. Distribución de estadístico D en función de la posición nucleotídica. Distribución del estadístico D (en rojo) a lo largo del locus *COI1*. Las barras verticales negras indican la separación entre exones, intrones (I1 e I2) y la región promotora del gen.

Al observar la distribución del estadístico D, vemos que existen zonas del *locus* con valores de D máximos por encima de cero (en el 1º exón, en la región promotora) y valores mínimos negativos en el intrón 1. Estos resultados nos condujeron a estrechar las porciones del *locus* a analizar, si bien la prueba no es significativa para el *locus* completo. Analizamos cada posición nucleotídica y su valor de D en las zonas en las cuales hay mayores diferencias respecto de 0, y vimos que la prueba de Tajima es significativa ($p < 0,01$ **) en las zonas 2485-2584 pb, 2510-2609 pb, correspondientes al 1º exón y a las regiones 3339-4038 pb, 3130-4080 pb, correspondientes a la región promotora, todos con valores máximos de D. Una posible interpretación de este resultado es que este valor positivo de D en esas regiones esté indicando selección equilibradora. Este tipo de selección favorece que se mantengan los polimorfismos dentro de cada población y existen diferentes modelos tales como el de ventaja del heterocigota, la selección dependiente de las frecuencias y la selección episódica. Otra posibilidad es que esto refleje la estructuración poblacional de las muestras (dado que las mismas provienen de distintas poblaciones) o un

cuello de botella reciente. Sin embargo estas últimas opciones parecen menos probables porque la estructuración y demografía afectan por igual a todas las regiones génicas y aquí vemos un efecto sobre un exón y la región promotora.

Finalmente, aplicamos otra prueba estadística para ver si la variación observada en el gen *COI1* podría explicarse por selección natural. Para ello realizamos la prueba de Mc Donald and Kreitman, que tiene en cuenta sólo las regiones codificantes del *locus* y utiliza una especie cercanamente emparentada con nuestro taxón de interés, preferentemente la especie hermana. En este caso utilizamos a *A. lyrata*. Esta prueba permite comparar el polimorfismo dentro de una especie y divergencia entre especies (sustituciones) que bien pueden ser sinónimas o no sinónimas. Las sustituciones sinónimas son aquellas que en las cuales una mutación puntual en una posición en el ADN, no cambia el aminoácido codificado por el codón, de modo que la mutación es silenciosa y el fenotipo es el mismo, mientras que una sustitución no sinónima es aquella en la cual un cambio en un nucleótido en el ADN da por resultado un cambio de aminoácido y el fenotipo puede ser diferente. La prueba se basa en estudiar si la proporción de variación no sinónima a sinónima es igual dentro y entre especies mediante una tabla de 2x2. La hipótesis nula de esta prueba es que la relación entre sustituciones no sinónimas y sinónimas dentro de la misma especie y la relación de la variación no sinónima y sinónima entre especies es la misma. Esto es lo que se espera si la evolución para este *locus* es neutral.

```
===== McDonald and Kreitman Table =====
Silent Substitutions:
  Fixed differences between species: 2680   Polymorphic sites: 93
Nonsynonymous Substitutions:
  Fixed differences between species: 938   Polymorphic sites: 17

Neutrality Index, NI: 0,522
Alfa value: 0,478

Fisher's exact test. P-value (two tailed): 0,010900*

G test. G value: 6,818   P-value: 0,00902**
G value with Williams' correction: 6,775
  P-value: 0,00925**
G value with Yates' correction: 6,187
  P-value: 0,01287*

* 0.01<P<0.05; ** 0.001<P<0.01; *** P<0.001
```

Figura 30. Tabla de salida de la prueba de McDonald and Kreitman. La tabla muestra las sustituciones sinónimas y no sinónimas entre las especies *A. thaliana* y *A. lyrata*. El resultado de la prueba es significativo con $0,01 < p < 0,05$.

Como vemos en la Figura 30, esta prueba arroja un resultado significativo, es decir que se rechaza la hipótesis nula de neutralidad.

Una forma sencilla de ver hacia donde se produce el desvío es mediante el índice de neutralidad (IN). Este se calcula como:

$$IN = \frac{\frac{\text{Polimorfismo no sinónimo}}{\text{Polimorfismo sinónimo}}}{\frac{\text{Sustituciones no sinónimas}}{\text{Sustituciones sinónimas}}}$$

El IN cuantifica el grado de desvío respecto de la neutralidad, en el cual se asume que las sustituciones sinónimas son neutrales, ya que no tienen un efecto sobre el fenotipo. Un IN >1 indica un exceso de polimorfismo no sinónimo y, por lo tanto, selección negativa. Un IN < 1 muestra un exceso de divergencia no sinónima, indicando que las mutaciones no sinónimas se han fijado más rápido que lo esperado por deriva génica y, por lo tanto, un efecto de la selección positiva.

Nuestros resultados muestran que el IN para el gen COI1 es de 0,522 sugiriendo que a lo largo de la historia evolutiva de este gen han ocurrido fijaciones adaptativas de variantes aminoacídicas.

3.2. PARTE II Estudio de los mecanismos de acción del glucano β -(1,2) cíclico como supresor de la respuesta inmune vegetal.

3.2.a. El glucano β -(1,2)-cíclico interfiere en la respuesta inmune inducida por flg22

Previamente en la literatura había sido reportado por nuestro grupo, que hojas de *N. benthamiana* y *A. thaliana*, pre-infiltradas con glucano β -(1,2)-cíclico 24 horas antes de la infección, recuperaban síntomas severos de enfermedad en respuesta a *Xcc ndvB*, cepa defectiva en la producción de glucano β -(1,2)-cíclico y muy poco infectiva *per se* (Rigano *et al.*, 2007a). Sin embargo, el rol del glucano β -(1,2)-cíclico en la respuesta inmune inducida por flg22 no había sido hasta aquí estudiado. Ha sido descrito que el pre-tratamiento de hojas de *A. thaliana* con flg22, induce la defensa de la planta frente a la infección con *Pst* DC 3000 (Zipfel *et al.*, 2004). Con el propósito de determinar si el glucano β -(1,2)-cíclico interfiere con la defensa estimulada debido al tratamiento con flg22, llevamos adelante un ensayo de infección en plantas de *A. thaliana* de 4 semanas (Figura 31). Pre-infiltramos las hojas con una solución de flg22 (100nM),

glucano β -(1,2)-cíclico (50 μ g/ml), solas o en combinación, 24 horas antes de llevar a cabo la inoculación con la mutante *Xcc ndvB*, comprometida en la producción de glucano β -(1,2)-cíclico. Utilizamos esta cepa mutante en las infecciones ya que deseábamos examinar el rol del glucano β -(1,2)-cíclico purificado. Como controles, utilizamos la cepa silvestre *Xcc* 8004, que sintetiza glucano β -(1,2)-cíclico normalmente, pre-tratada con agua o con una solución de flg22. Como esperábamos, el pre-tratamiento con flg22, redujo significativamente los niveles de infección de *Xcc ndvB* y de *Xcc* 8004 (Figura 31 A, B). Asimismo, el pre-tratamiento de glucano β -(1,2)-cíclico, restauró los síntomas de infección y colonización dentro de la planta infectada con *Xcc ndvB*. Interesantemente, la co-infiltración de flg22 y glucano β -(1,2)-cíclico en las hojas, inhibió este nivel de protección conferido por el tratamiento con flg22, dando por resultado una colonización bacteriana más extensa y síntomas severos de infección (Figura 31 A,B) y sugiriendo una interferencia del glucano cíclico sobre el efecto inductivo de la respuesta inmune vegetal por parte de la flg22.

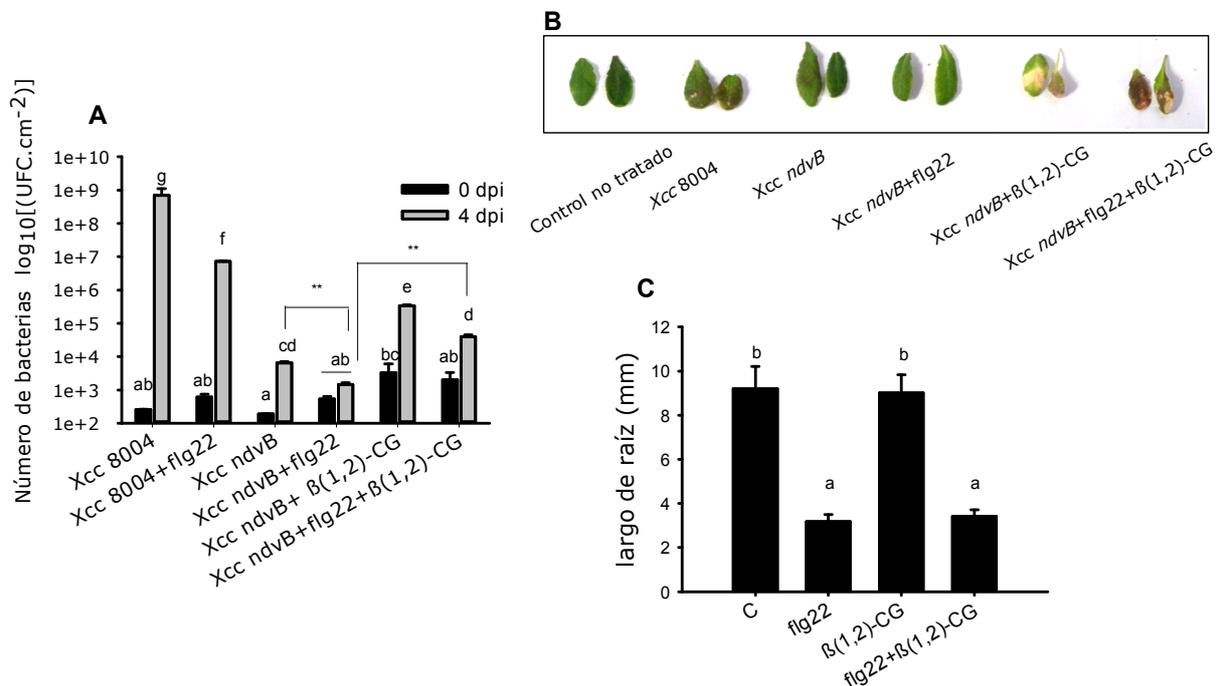


Figura 31. El glucano β -(1,2) cíclico interfiere con la defensa inducida por flg22. **A**, Crecimiento de *Xcc* 8004 y *Xcc* *ndvB* (OD_{600} =0,1) en plantas Col-0 inoculadas por spray a 0 y 4 días post infección (dpi). H₂O, flg22 (100nM) y glucano β -(1,2)-cíclico (50 μ g/ml) fueron infiltrados 24 horas previo a la infección bacteriana. Los valores mostrados corresponden a valores \pm ES (n = 2). Las letras diferentes indican diferencias significativas con un p < 0,05 (ANOVA 2 factores). Las barras de error representan el ES de dos experimentos independientes. UFC, unidades formadoras de colonias. **B**, Síntomas 5 días post-infección con *Xcc* 8004, *Xcc* *ndvB* y los tratamientos indicados, en hojas de *A. thaliana*. **C**, Inhibición del

crecimiento de raíz en plántulas de 7 días tratadas con H₂O, flg22 (100nM), glucano β-(1,2)-cíclico(50μg/ml) o una combinación de compuestos. La longitud de la raíz fue medida utilizando el software Image J. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un p < 0,01 (ANOVA 1 factor).

Otro de los fenotipos de la flg22 muy estudiados es la inhibición del crecimiento de la raíz (Boller and Felix, 2009; Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Dado que el glucano β-(1,2)-cíclico altera la protección a la infección que ejerce la flg22, quisimos examinar si también este compuesto evitaba la inhibición del crecimiento de la raíz, mediado por flg22, en plántulas de *A. thaliana*. En la Figura 31 C, podemos observar que, tanto las plántulas control sin tratar como aquellas tratadas con glucano β-(1,2)-cíclico purificado, son indistinguibles, indicando que este compuesto no posee ningún efecto tóxico *per se*. En presencia de flg22, el glucano β-(1,2)-cíclico tampoco tuvo efecto sobre la inhibición del crecimiento mediada por flg22. Estos resultados indican que el glucano β-(1,2)-cíclico es capaz de suprimir la defensa inducida por flg22 en *A. thaliana* pero no contraresta el efecto inhibitorio en el crecimiento de raíz mediado por flg22.

3.2.b. El glucano β-(1,2)-cíclico suprime la deposición de calosa inducida por flg22 y disminuye la expresión de PR1 estimulada por flg22 y SA

Hojas de *N. benthamiana* infectadas con *Xcc ndvB*, exhiben niveles considerablemente mayores de deposición de calosa que aquellas infectadas con la cepa silvestre *Xcc 8004* o con *Xcc ndvB* pre-tratadas con glucano β-(1,2)-cíclico (Rigano *et al.*, 2007a). La flg22 dispara una cascada de señalización que incluye la deposición de calosa (Clay *et al.*, 2009) y la expresión de genes relacionados con la defensa (Navarro *et al.*, 2004), como *PR1*. Para profundizar en el estudio del efecto del glucano β-(1,2)-cíclico sobre las respuestas mediadas por la flg22, decidimos testear la capacidad del glucano β-(1,2)-cíclico de inhibir la deposición de calosa y la expresión de *PR1*, ambos procesos mediados por flg22. Encontramos que el glucano β-(1,2)-cíclico reduce fuertemente la deposición de calosa inducida por flg22 y nuevamente vemos que no tiene efecto por sí solo (Figura 32 A, B).

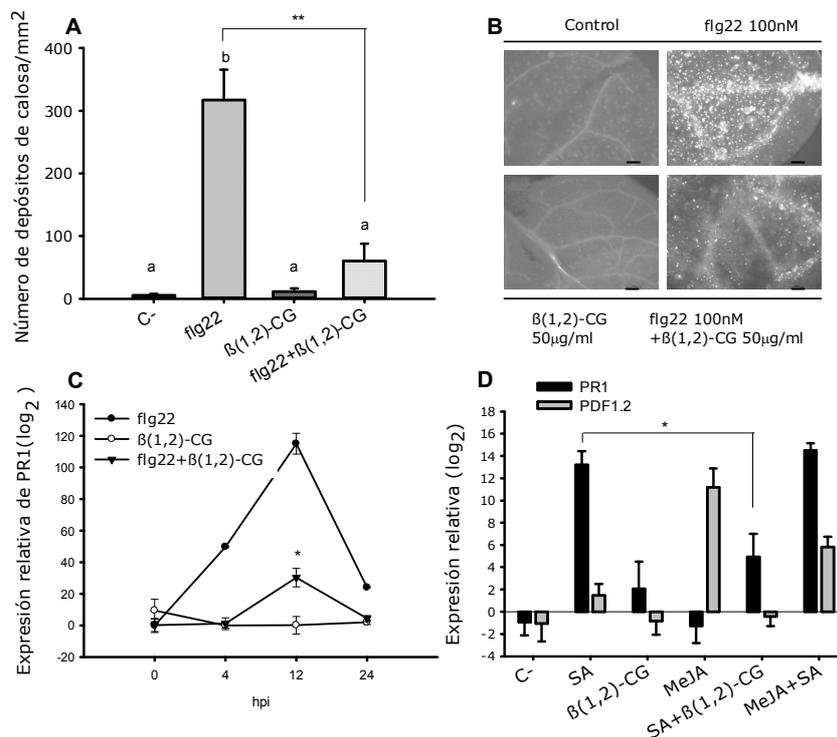


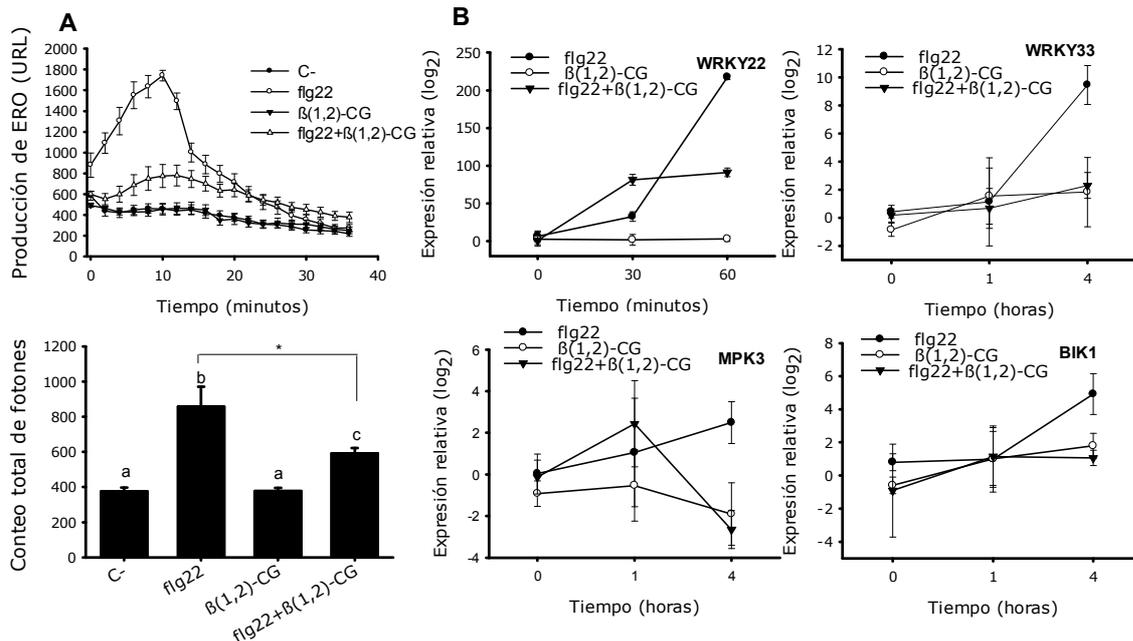
Figura 32. El glucano cíclico suprime la deposición de calosa inducida por flg22 y disminuye la expresión de PR1 promovida por flg22 y SA. **A**, Número promedio de depósitos de calosa/mm². La tinción de calosa fue llevada a cabo 24 horas post-incubación de las plántulas con flg22 100nM y glucano β-(1,2)-cíclico (50μg/ml). Las barras de error representan valores de ES de dos experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,01$ (ANOVA 1 factor). **B**, Imágenes representativas de hojas de *A. thaliana* se muestran en la figura. Los depósitos de calosa (puntos blancos brillantes) fueron observados utilizando microscopía de fluorescencia. Escala= 20μm. **C**, Los niveles de expresión de PR1 fueron determinados por qRT-PCR. Se exhiben los niveles relativos de expresión de PR1 a diferentes tiempos (0, 4, 12 y 24 h) luego del agregado de flg22 (100nM) y glucano β-(1,2)-cíclico (50μg/ml). **D**, qRT-PCR para monitorear la expresión de PR1 y PDF1.2 a 24 horas post-incubación con 1mM SA, 0,1mM MeJA, glucano β-(1,2)-cíclico (50μg/ml) o una combinación de los compuestos detallada en la figura. En (C) y (D), los valores de expresión obtenidos están relativizados al gen de referencia endógena EF1α (At1g18070) y normalizados a plantas no tratadas. Se muestran valores \pm ES (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas (* = p valor < 0,05).

Al estudiar si el glucano β-(1,2)-cíclico modulaba, en plántulas de *A. thaliana*, la expresión de *PR1*, inducida por flg22 a diferentes tiempos post-inoculación con los compuestos, observamos que, luego de 12 y 24 horas post co-incubación de flg22 y glucano β-(1,2)-cíclico, éste último redujo los niveles de expresión de *PR1* inducidos por flg22, de modo significativo (Figura 32 C). Nuevamente, y de modo consistente con los ensayos previos, el glucano β-(1,2)-cíclico no tuvo efecto alguno sobre la expresión de *PR1*. En un reporte previo, se mostró evidencia del efecto supresor de SA, a través de la modulación de PR1, sobre la expresión de *PDF1.2*, un gen inducido por MeJA, antagonizando de este modo la señalización de la vía hormonal del JA (Van der Does *et al.*, 2013). Dado que el glucano β-(1,2)-cíclico inhibe algunas respuestas mediadas por

flg22, incluyendo la expresión de *PR1*, nos preguntamos si este compuesto era capaz de interferir con la expresión de este gen, cuya inducción fuera mediada por SA esta vez. Con este objetivo, monitoreamos la expresión de *PR1* y *PDF1.2* luego de 24 horas de tratamiento con SA, glucano β -(1,2)-cíclico o una combinación de ambos. Como controles usamos MeJA y MeJA en combinación con SA. Observamos que el glucano β -(1,2)-cíclico suprime significativamente la expresión de *PR1* mediada por SA, 24 horas post-incubación con ambos compuestos (Figura 32 D), pero no tiene efecto por sí solo en la expresión de *PDF1.2*. Estos resultados sugieren que la supresión ejercida por el glucano β -(1,2)-cíclico sobre los niveles de *PR1*, inducidos por SA, no se debe, en principio, al establecimiento de un antagonismo entre el SA y el JA sino que el glucano β -(1,2)-cíclico es capaz de suprimir la inducción de *PR1* mediada por SA, y con ello, la defensa asociada a esta respuesta hormonal, sin activar la vía del JA.

3.2.c. El glucano β -(1,2)-cíclico modula la expresión de genes de respuesta temprana y la producción de ERO inducida por flg22

La percepción de flg22 por parte de la planta activa rápidamente la cascada de señalización de defensa, que incluye la producción de ERO (Torres *et al.*, 2005), activación de MAPK (Asai *et al.*, 2002) y expresión temprana y tardía de genes (Denoux *et al.*, 2008). Tanto la supresión de la deposición de calosa como la expresión de *PR1* por acción del glucano β -(1,2)-cíclico, nos llevó a investigar si este compuesto era capaz de interferir con la producción de ERO y/o modular la expresión temprana de genes inducidos por flg22. Con este objetivo, realizamos un ensayo de luminiscencia para testear el efecto de glucano β -(1,2)-cíclico en la producción de ERO inducida por flg22 en discos de hoja de *A. thaliana*. Como puede observarse en la figura 33 A, cuando se los aplica de manera simultánea el glucano β -(1,2)-cíclico reduce significativamente la inducción de ERO, gatillada por flg22, en un lapso de 40 minutos post-incubación mientras que por sí solo, el glucano β -(1,2)-cíclico no induce su acumulación.



Figur

Figura 33. El glucano β -(1,2)-cíclico modula la producción de ERO y suprime la expresión temprana de WRKY22, WRKY33, MPK3 y BIK1, todas respuestas inducidas por flg22. **A**, La producción de ERO fue inducida con $1\mu\text{M}$ flg22 y el glucano β -(1,2)-cíclico fue añadido simultáneamente con flg22. La producción de ERO fue medida por el método de quimioluminiscencia basado en el dúo peroxidasa (HRP) y luminol y los resultados están expresados como unidades relativas de luz (URL). Los valores presentados son promedios \pm ES ($n = 24$). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, $n=12$ por ensayo. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ (ANOVA 1 factor). **B**, La expresión relativa de los genes WRKY22, WRKY33, MPK3 y BIK1 fue determinada por qRT-PCR. Expresión relativa de los niveles de WRKY22, WRKY33 y BIK1 a diferentes tiempos (0, 30 and 60 min para WRKY22; 1 and 4 h para WRKY33, MPK3 y BIK1) luego del agregado de flg22 100nM y glucano β -(1,2)-cíclico (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La expresión de estos genes es relativa al gen de referencia endógeno EF1a y normalizados respecto de plantas no tratadas. Los valores mostrados son valores promedio \pm ES ($n = 4$). Los asteriscos indican diferencias significativas (* = p valor $< 0,05$).

Decidimos investigar si el glucano β -(1,2)-cíclico inhibe la expresión de los genes WRKY22, WRKY33, MPK3 y BIK1, que se sabe son inducidos en respuesta a flg22 como parte de la inmunidad inducida por MAMPs/patógenos (PTI). Encontramos que el glucano β -(1,2)-cíclico contrarresta, en todos los casos, la expresión temprana de estos genes, inducida por flg22 (Figura 33 B), sugiriendo que este compuesto tienen la capacidad de suprimir de modo temprano y tardío varios de los eventos que tienen lugar durante la respuesta inmune PTI.

3.2.d. La virulencia de *Xcc* mediada por el glucano β -(1,2)-cíclico requiere dos proteínas quinasas con dominio LysM en *A. thaliana*, LYK3 y LYK4

Recientemente, se ha reportado que la proteína de membrana con dominio LysM, LYK3, está involucrada en la supresión por acción de los factores NOD sobre la producción de ERO y la fosforilación de MAPK, inducida por flg22 (Liang *et al.*, 2013). Dado que el glucano β -(1,2)-

cíclico, como los factores NOD, afectan varias respuestas tempranas durante la respuesta PTI, particularmente en respuesta a flg22, y dada la naturaleza parcialmente glucosídica de estos factores, quisimos estudiar si el glucano β -(1,2)-cíclico requería de alguno de los miembros de la familia de las proteínas con dominio LysM (LYK) para ejercer su acción supresora. Para contestar esta pregunta, utilizamos un abordaje de genética reversa, aprovechando la existencia de mutantes *lyk* de pérdida de función, involucradas en la percepción/ señalización de los factores NOD. Para testear si el glucano β -(1,2)-cíclico requiere alguno de estos elementos genéticos para lograr que *Xcc* colonice exitosamente el tejido vegetal, realizamos un ensayo de infección utilizando la cepa silvestre *Xcc* 8004 y la cepa *Xcc ndvB*. La infección fue llevada a cabo en los genotipos silvestre de *A. thaliana* (Col-0) y en las mutantes *lyk1*, *lyk2*, *lyk3* y *lyk4*. Dado que las mutantes *lyk* exhiben una normal percepción y respuesta a flg22, ya que poseen intacto el complejo FLS2-BAK1, es posible evaluar el rol del glucano β -(1,2)-cíclico en las respuestas a flg22 en estas mutantes. Observamos que, 4 días post-infección, mientras *Xcc* 8004 alcanzó niveles altos de colonización en la planta salvaje y en las mutantes *lyk1* y *lyk2*, las mutantes *lyk3* y *lyk4* exhibieron resistencia a la infección con *Xcc* 8004, mostrando que el efecto supresor de la respuesta inmune ejercido por el glucano β -(1,2)-cíclico requiere de las proteínas LYL3 y LYK4 (Figura 34 A).

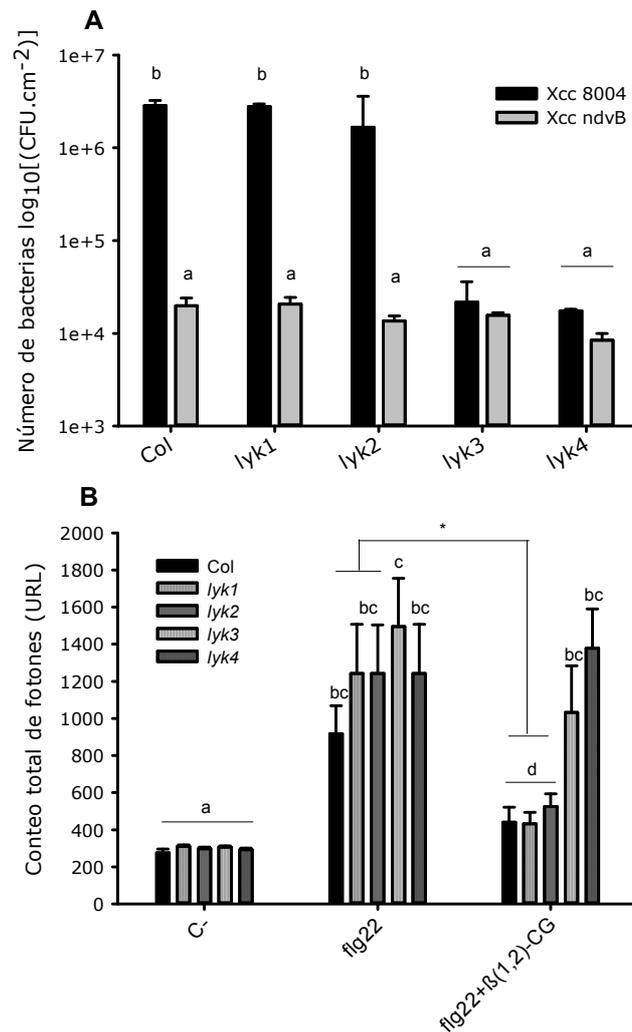


Figura 34. El glucano β -(1,2)-cíclico requiere los elementos LYK3 y LYK4 para ejercer la virulencia de Xcc 8004 y para suprimir la producción de ERO inducida por flg22. **A**, Crecimiento de Xcc 8004 y Xcc ndvB ($OD_{600}=0,1$) en plantas Col-0 y en las mutantes *lyk1*, *lyk2*, *lyk3* y *lyk4* 4 d post-inoculación (dpi). Los valores mostrados corresponden a promedios \pm ES (n = 2). Letras diferentes indicant diferencias significativas con un $p < 0,05$ (ANOVA 2 factores). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes. UFC, unidades formadoras de colonias. **B**, Producción de ERO inducida por 1 μ M flg22. El glucano-(1,2)-cíclico fue añadido simultáneamente con la flg22 en Col, y mutantes *lyk1*, *lyk2*, *lyk3* y *lyk4*. La producción de ERO fue medida utilizando el método de quimioluminiscencia basado en el dúo de peroxidasa (HRP) y luminol y los resultados se expresan en unidades relativas de luz (URL). Los valores se expresan como promedios \pm ES (n = 24). Las barras de error representan ES de dos experimentos independientes, n=12 por ensayo. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ (ANOVA 2 factores).

Como esperábamos, *Xcc ndvB*, exhibió menores niveles de infección en plantas Col y también este fenotipo fue observado en todas las mutantes *lyk*. A la luz de este resultado, decidimos ver si el glucano β -(1,2)-cíclico también requiere de estos genes para suprimir la producción de ERO inducida por flg22. Para ello, medimos, mediante un ensayo de luminiscencia, la producción de

ERO en presencia de flg22 y glucano β -(1,2)-cíclico, en las mutantes *lyk* y en Col-0, como control. Encontramos que, aunque *lyk1* y *lyk2* fueron tan sensibles como Col-0 al efecto del glucano β -(1,2)-cíclico sobre la producción de ERO mediada por flg22, *lyk3* y *lyk4* fueron insensibles a este compuesto en su rol supresor de ERO sobre la flg22. (Figura 34 B). Estos resultados sugieren que, tanto LYK3 como LYK4 podrían estar actuando como componentes genéticos capaces de percibir al glucano β -(1,2)-cíclico o como partícipes de la cascada de señalización que este compuesto desencadena para ejercer su acción.

3.2.e. Las membranas de *A. thaliana* poseen sitios de unión específicos a glucano β -(1,2)-cíclico

Dada la evidencia de la afinidad del glucano β -(1,2)-cíclico de *B. japonicum* a membranas de soja (*G. max*) (Bhagwat *et al.*, 1999) y, en concordancia con la evidencia de que el glucano β -(1,2)-cíclico de *Xcc* cumple un rol en la modulación de las respuestas tempranas inducidas por flg22, decidimos investigar si el glucano β -(1,2)-cíclico de *Xcc* se une a membranas de *A. thaliana*, lo cual implicaría que sería percibido a través de un receptor específico. En estos ensayos, utilizamos el glucano β -(1,2)-cíclico marcado radiactivamente con el isótopo ^{14}C . Para poner a prueba esta hipótesis, realizamos, en primer lugar, un ensayo de cinética para evaluar la posible unión de este compuesto a las membranas durante un período de tiempo. La incubación de membranas de *A. thaliana* en presencia de [^{14}C] glucano β -(1,2)-cíclico a diferentes tiempos durante 90 minutos mostró que la unión de este compuesto a las membranas ocurre rápidamente (Figura 35A), alcanzando un *plateau* dentro los primeros 20 minutos, en concordancia con la posibilidad de uniones específicas ligando-receptor.

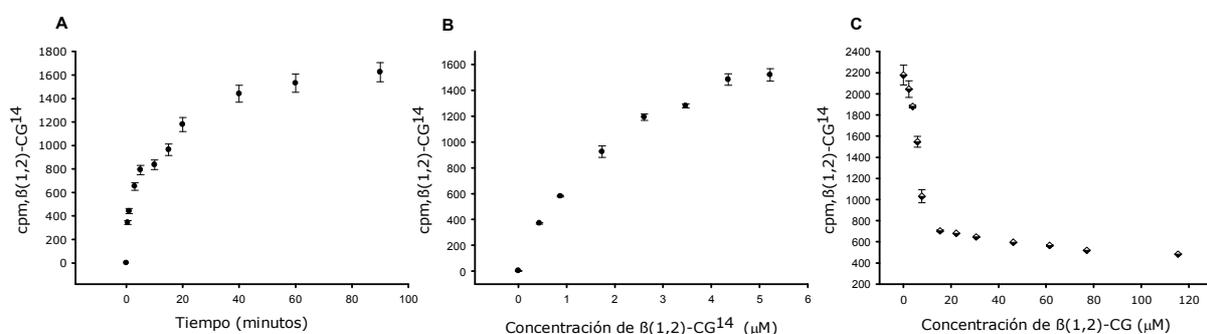


Figura 35. Extractos de plantas de *A. thaliana* tienen sitios de afinidad por glucano-(1,2)-cíclico. **A**, Cinética de unión de [¹⁴C] glucano-(1,2)-cíclico (4.76.10⁶ cpm/μmol) a membranas de *A. thaliana* por 90 minutos. **B**, Curva de binding (curva de saturación) de [¹⁴C] glucano-(1,2)-cíclico a membranas de *A. thaliana*. Los extractos fueron incubados con diferentes concentraciones de de [¹⁴C] glucano-(1,2)-cíclico (4.76.10⁶ cpm/μmol) como se indica en la figura, por 1 hora a 28°C. La radiactividad retenida en los extractos fue medida en un contador de centelleo, luego del lavado de los extractos en filtros. Los valores de *binding* fueron ajustados de acuerdo a la ecuación de una hipérbola rectangular, obteniendo una K_d de 2.397 μM (software GraphPad Prism). Los resultados mostrados son el promedio de cuatro experimentos independientes. **C**, Ensayo de desplazamiento de una concentración constante y saturante de [¹⁴C] glucano-(1,2)-cíclico (4.76.10⁶ cpm/μmol) en presencia de diferentes concentraciones de glucano-(1,2)-cíclico no marcado (frío). Los resultados se expresan como el promedio de dos experimentos independientes.

Luego, realizamos una curva de saturación, con concentraciones crecientes de [¹⁴C] glucano β-(1,2)-cíclico, a un tiempo fijo (60 minutos), correspondiente al tiempo de saturación obtenido de la Figura 35 A. Los valores obtenidos de unión específica ajustan bien a una hipérbola rectangular, resultando una constante de afinidad K_d de 2,397μM (Figura 35 B). Finalmente, llevamos adelante un ensayo de desplazamiento de la marca radioactiva, usando glucano β-(1,2)-cíclico frío en concentraciones crecientes. Trabajamos con una concentración saturante [¹⁴C] glucano β-(1,2)-cíclico para asegurarnos que todos los presuntos sitios de unión estén ocupados por el compuesto de interés y fuimos desplazando con concentraciones crecientes de glucano β-(1,2)-cíclico frío. Encontramos en este ensayo que el 50% de la marca radioactiva fue desplazada por una concentración de, aproximadamente, 7μM de glucano β-(1,2)-cíclico frío (Figura 35 C), sugiriendo que el glucano β-(1,2)-cíclico se uniría a membranas de *A. thaliana* con relativa afinidad.

3.3. PARTE III Rol de los componentes estructurales del xantano en la virulencia de *Xcc*

3.3.a. Caracterización preliminar de cepas de *Xcc* productoras de distintas variantes estructurales de xantano

Para estudiar qué componentes de la molécula de xantano son esenciales para que este EPS pueda actuar como factor de virulencia, analizamos cuatro cepas de *Xcc* defectivas en proteínas involucradas en la biosíntesis de las unidades repetitivas del xantano, utilizando como controles la cepa salvaje y una cepa no productora de xantano, como se detalla en la Tabla N°3.

Cepa	Deficiente en:	Características
XcFC2	-	Cepa silvestre. Control positivo.

Xc1231	Operón <i>gum</i>	No produce xantano. Control negativo.
XcI	<i>gumI</i>	Sintetiza un polisacárido compuesto por unidades repetitivas tretrasacarídicas o poli-tetra-sacárido. La cantidad de poli-tetrasacárido producida por esta cepa es de aproximadamente un 10-15% comparada con la producción de xantano por la cepa silvestre.
XcF	<i>gumF</i>	Sintetiza un xantano carente de sustitución por grupos acetilo en la manosa interna de la unidad repetitiva. La cantidad de xantano producido por esta cepa respecto a sintetizado por la cepa silvestre se ve afectado.
XcG	<i>gumG</i>	Sintetiza un xantano carente de sustitución por grupos acetilo en la manosa externa de la unidad repetitiva. La cantidad de xantano producido por esta cepa respecto a sintetizado por la cepa silvestre se ve afectado.
XcL	<i>gumL</i>	Sintetiza un xantano carente de sustitución por grupos cetal-piruvato en la manosa externa de la unidad repetitiva. La cantidad de xantano producido por esta cepa respecto a sintetizado por la cepa silvestre se ve afectado.

Tabla N° 3. Resumen de las características de las cepas mutantes de xantano

En primer lugar, quisimos examinar si alteraciones o modificaciones de la estructura molecular del xantano afectan la producción de este EPS o bien algunas de sus propiedades como la viscosidad. En primera instancia, analizamos la cantidad de EPS producida por cada una de las mutantes de *Xcc*, respecto de la cepa salvaje. Asimismo, evaluamos cómo se ve afectada la viscosidad de este polisacárido cuando las unidades repetitivas que lo componen carecen de algún componente.

Observamos que, con respecto a la producción de EPS de cada cepa, *XcF*, *XcG* y *XcL* producen menor cantidad de EPS que la cepa silvestre, en un porcentaje cercano al 80% respecto de dicha cepa control, mientras que la cantidad del EPS producido por la cepa *XcI*, es aproximadamente del 10% respecto a la cantidad de xantano producida por *XcFC2*, indicando que esta cepa es la más comprometida en la producción de EPS (Figura 36A). Como ya ha sido descrito, el xantano posee una alta viscosidad, propiedad que lo caracteriza y que está estrechamente relacionada con su estructura. Para determinar en qué grado la ausencia de alguno de los componentes de la molécula de xantano afecta la viscosidad, analizamos cada uno de los EPS producidos por las distintas mutantes.

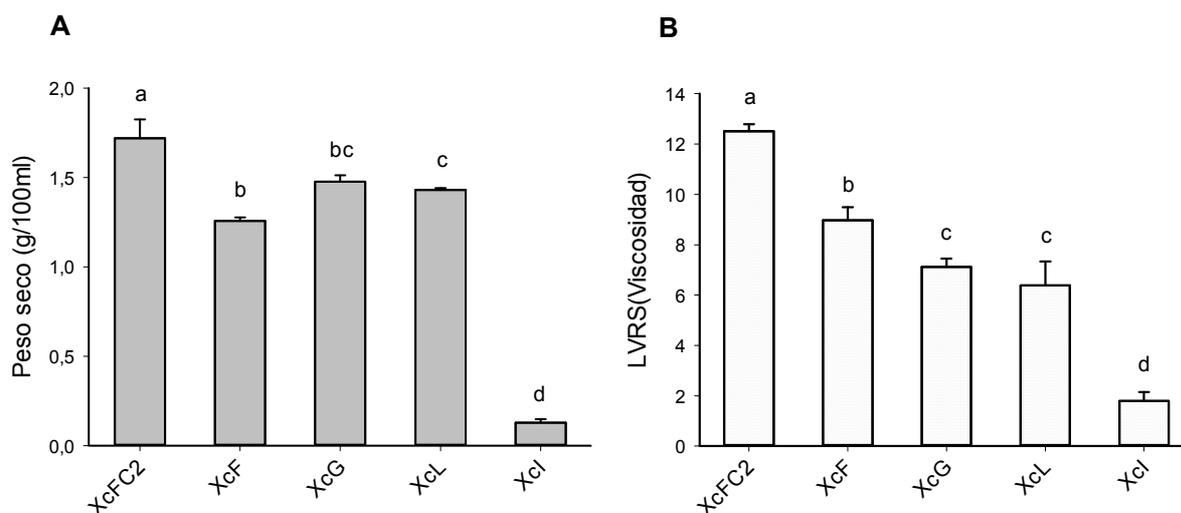


Figura 36. Las cepas de Xcc productoras de distintos EPS poseen diferencias en la producción de xantano y la viscosidad. A, Producción de xantano. Las mutantes de Xcc fueron crecidas en medio MC durante 5 días y el EPS fue aislado por precipitación con isopropanol. Los datos se expresan como el peso seco por cada 100 ml de medio de cultivo y este valor está relativizado respecto de la cepa silvestre (XcFC2). Las barras de error representan un promedio de 3 ensayos independientes, cada uno con tres réplicas. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,01$ (ANOVA 1 factor). **B,** Viscosidad de los distintos EPS. La viscosidad de los distintos EPS fue determinada como un cociente de viscosidad (LRSV) de soluciones de 0,45% (m/v) usando un viscosímetro de Brookfield. Los datos fueron relativizados a la viscosidad del xantano nativo. Cada barra de error representa la media y ES de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,01$ (ANOVA 1 factor).

Observamos que los EPS sintetizados por las cepas XcF, XcG y XcL presentan una viscosidad entre un 40% y un 50% (Figura 36B) menor que el xantano producido por la cepa silvestre. En tanto, el EPS proveniente de la cepa XcI sólo presenta una viscosidad del 15% respecto a la acusada por el xantano nativo. Estos resultados confirman que cambios en la composición del EPS afectan de modo importante su viscosidad.

3.3.b. Adhesión bacteriana de las distintas variantes de EPS

Con el objetivo de estudiar la capacidad de las distintas mutantes de adherirse a una superficie abiótica, realizamos ensayos en microplacas de poliestireno, utilizando el método de tinción de cristal violeta.

Para estos experimentos las distintas cepas fueron crecidas toda la noche en medio PYM y luego diluidas en medio mínimo. Registramos el crecimiento y la adhesión a las 24, 48 y 72 h post-incubación. La comparación entre las distintas cepas se realizó a las 72 h post-incubación.

Observamos que la mutante *XcI*, que sintetiza un politetrasacárido en vez de un polipentasacárido como la cepa silvestre, así como aquella mutante incapaz de producir xantano (*Xc1231*), presentan un número muy bajo de bacterias adheridas respecto de la cepa silvestre (*XcFC2*) (Figura 37 A). Por su parte, la ausencia de grupos cetil-piruvatos (*XcL*) o grupos acetilos (*XcF* y *XcG*) afectaron la adhesión en menor grado y no tan drásticamente (Figura 37 A).

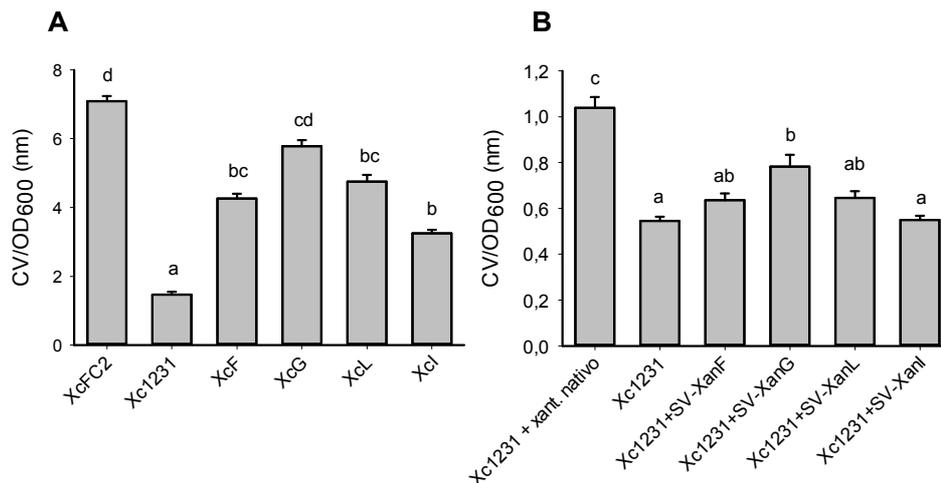


Figura 37. Las cepas de *Xcc* productoras de distintos EPS poseen diferencias en la adhesión y los distintos EPS comprometen la recuperación de la adhesión de la cepa *Xc1231*. **A**, Adhesión de las distintas cepas a las 24 horas de incubación con las distintas cepas. **B**, Adhesión de la cepa *Xc1231* en presencia de 200 µg/ml de los distintos EPS de cada cepa mutante, luego de 24 horas de incubación. Las barras de error (ES) representan un promedio de 6 ensayos independientes, cada uno con 10 réplicas. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,01$ (ANOVA 1 factor). Los valores están expresados como la relación entre la absorbancia de Cristal Violeta (CV) y el crecimiento de la bacteria a OD_{600nm} .

De todos modos, puede verse que las cepas mutantes presentaron menor adhesión que la cepa silvestre. Con el fin de analizar qué efecto sobre la adhesión bacteriana poseen las distintas variantes del xantano, decidimos evaluar la adhesión de la cepa *Xc1231*, incapaz de producir EPS, en presencia del xantano nativo y de las distintas variantes estructurales del xantano. En la Figura 37B, vemos que el xantano le permite a *Xc1231* recuperar parte de su adhesión al sustrato (aunque no a los niveles de la cepa *XcFC2* de la Figura 37 A), mientras que los xantanos provenientes de las cepas *XcF*, *XcL* y *XcI* son los más comprometidos para restaurar la adhesión de la cepa *Xc1231* (Figura 37 B), indicando que la integridad del xantano es importante para que la bacteria se adhiera correctamente al sustrato. Para la evaluación de la adhesión de las distintas cepas mutantes, mostramos los valores a las 72 h post-incubación ya que, como puede verse en

la Figura 38, si bien existen diferencias en las curvas de crecimientos de las bacterias, a las 72 h, todas han ingresado en la fase estacionaria, momento en donde la adhesión es analizada.

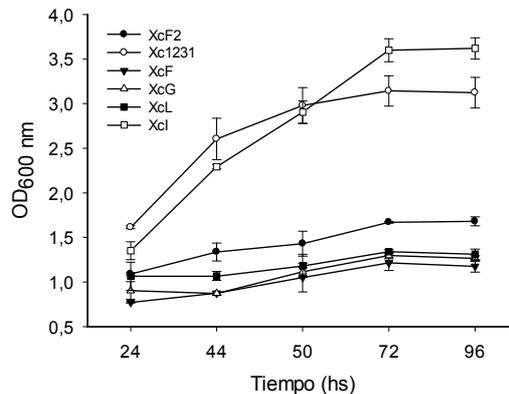


Figura 38. Curvas de crecimiento de las distintas cepas de *Xcc*. Las barras de error corresponden a la media y al desvío estándar de tres experimentos independientes.

3.3.c. Formación de *biofilm* de las distintas cepas

Para analizar la formación de *biofilm* de las distintas cepas de *Xcc*, utilizamos un microscopio confocal invertido mediante el cual registramos durante 72 h la formación de *biofilm* en cámaras de cultivo de borosilicato. Para observar la formación de *biofilm*, utilizamos en estos ensayos, las cepas de *Xcc* marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP). Es importante mencionar que las curvas de crecimiento de las cepas de *Xcc*, marcadas con GFP, no se alteraron respecto de las mostradas en la Figura 38 (datos no mostrados). Analizamos la habilidad de desarrollar microcolonias, agregados celulares y la formación de *biofilm* tridimensional. Luego de 72 h, observamos que la cepa silvestre había sido capaz de desarrollar un *biofilm* maduro (Figura 39), que exhibe una estructura característica con canales de agua conectando los agregados celulares. En la vista en Z pueden verse dichos canales y la altura que alcanza el *biofilm* maduro. Esto contrasta a simple vista con las imágenes de la cepa Xc1231, la cual no forma microcolonias ni agregados celulares más complejos, la altura de la estructura que forma es muy menor respecto de la cepa silvestre y no se observan canales de agua en forma organizada.

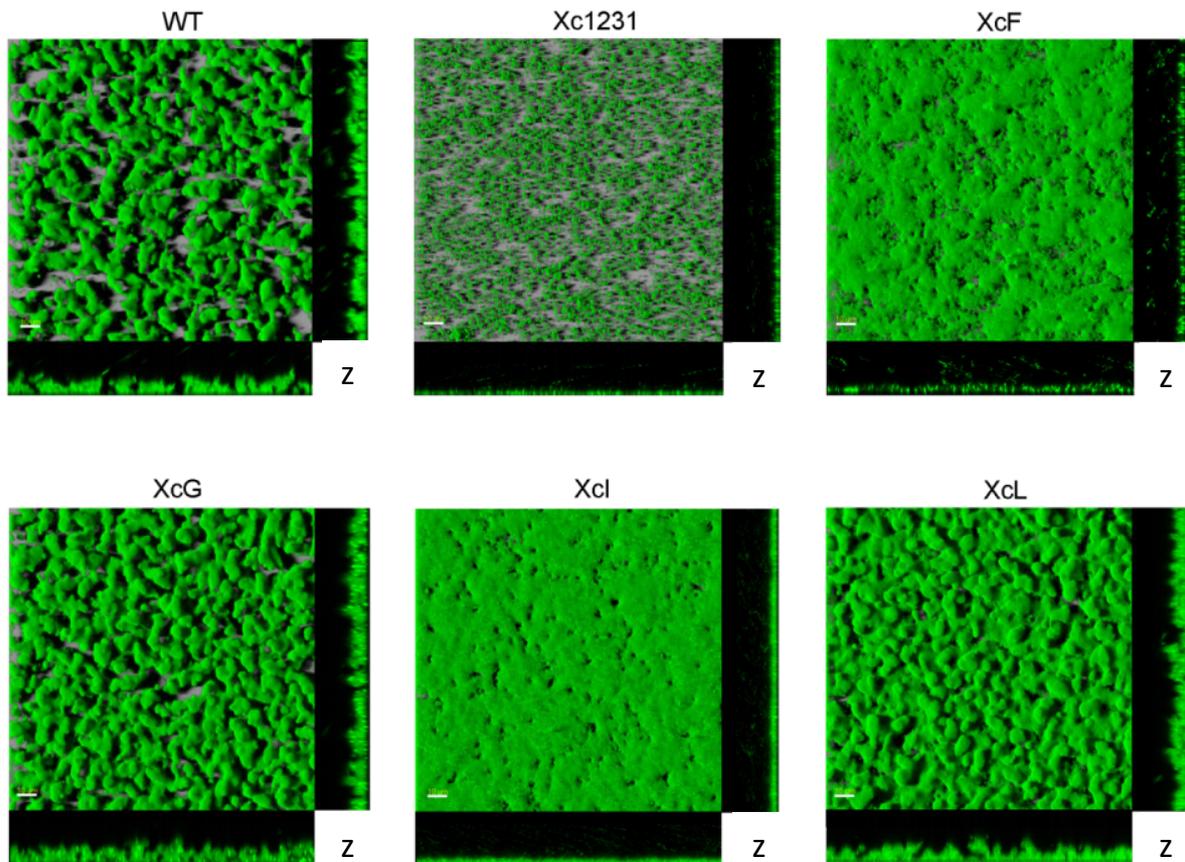


Figura 39. Formación de *biofilm* de las distintas cepas productoras de variantes de xantano, a 72 horas del inicio de la incubación. Las imágenes corresponden a planos XY y Z de estas estructuras. Análisis de imágenes realizado con el software Image J.

Al evaluar las distintas cepas mutantes, notamos que la cepa *XcF*, que no posee las manosas internas acetiladas, exhibe un *biofilm* con una arquitectura muy distinta a la que presenta el *biofilm* producido por la cepa silvestre, no se observan canales definidos, así como tampoco los agregados celulares característicos de un *biofilm* maduro. Debido a que 90% de las manosas internas pueden estar acetiladas en la cepa silvestre, lo cual confiere orden a la hebra de xantano, es de esperar que la estructura de ese *biofilm*, sin manosas acetiladas, muestre una estructura distinta, que se asemeja más a un césped bacteriano que a un *biofilm* característico. En el caso de *XcG*, mutante carente de acetilación de las manosas externas, vemos que su *biofilm* se parece al *biofilm* formado por la cepa silvestre, aunque posee una estructura algo más desordenada, con mayor agrupamiento celular en colonias que parecen ser más grandes y con menor cantidad de canales de agua. En este caso, la ausencia de los grupos acetilo en las

manosas externas del xantano, parece no afectar demasiado la estructura del *biofilm* formado por XcG. Por otra parte, la cepa XcL, deficiente en grupos cetil piruvato en las manosas externas del xantano, presenta un *biofilm* con una arquitectura más “apretada” o compacta que el *biofilm* de la cepa silvestre. En este caso, puede observarse menor cantidad de canales de agua y mayor superficie cubierta por aglomerados bacterianos que cubren casi toda la superficie. Finalmente, la cepa XcI, que forma un politetrasacárido sin la manosa externa, exhibe un *biofilm* “liso” con un bajo grado de rugosidad, con ausencia de canales y formación microcolonias. Estos resultados sugieren que la composición y, por ende, la estructura del xantano es esencial para el desarrollo de un *biofilm* maduro, con una arquitectura característica, capaz de permitir la formación de microcolonias y aglomerados celulares, con canales que permitan la difusión de nutrientes y otros componentes.

Para confirmar estas observaciones, realizamos un análisis cuantitativo de algunas propiedades del *biofilm*, utilizando el programa de análisis de imágenes COMSTAT. Como puede observarse en la Tabla N°4, se evaluaron cuatro variables (espesor promedio, biomasa, coeficiente de rugosidad y distancia promedio de difusión) para evaluar la arquitectura del *biofilm*.

Cepa	Espesor promedio (µm)	Biomasa (µm ³ /µm ²)	Coficiente de rugosidad (unidades arbitrarias)	Distancia promedio de difusión (µm)
XcFC2	11,025 ± 0,29 (ab)	8,590 ± 0,156 (ab)	0,560 ± 0,014 (a)	2,850 ± 0,212 (c)
XcF	8,660 ± 0,933 (b)	7,985 ± 0,690 (b)	0,125 ± 0,007 (c)	5,100 ± 0,424 (b)
XcG	13,705 ± 0,997 (a)	10,885 ± 0,884 (a)	0,265 ± 0,007 (b)	3,320 ± 0,453 (bc)
XcI	10,535 ± 1,082 (ab)	10,210 ± 0,976 (ab)	0,084 ± 0,002 (c)	7,765 ± 0,898 (a)
XcL	9,465 ± 0,403 (b)	8,755 ± 0,134 (ab)	0,240 ± 0,057 (b)	4,250 ± 0,495 (bc)

Tabla N°4. Evaluación de las propiedades del *biofilm* de las distintas cepas de xantano (Software COMSTAT). Las mediciones de espesor promedio, biomasa, coeficiente de rugosidad y distancia promedio de difusión corresponde a

un *biofilm* de 4 días. Todos los datos son presentados como el promedio y el desvío estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$) basado en el test de Tukey.

Los valores de espesor promedio y biomasa de los *biofilms* producidos por las diferentes cepas no difieren significativamente de aquellos exhibidos por la cepa XcFC2. Sin embargo, las cepas mutantes muestran diferencias significativas al evaluar tanto el coeficiente de rugosidad como la distancia promedio de difusión, comparadas con la cepa XcFC2.

El coeficiente de rugosidad es un indicador de la heterogeneidad del *biofilm*, valores bajos sugieren menor heterogeneidad, consistente con *biofilms* más compactos, chatos y uniformes (Murga *et al.*, 1995). Todas las mutantes presentaron un coeficiente de rugosidad menor, siendo mucho más bajo en el caso de las mutantes XcI y XcF, dando lugar a *biofilms* más homogéneos que los que exhibe la cepa silvestre. Es así como mutantes con muy bajos valores de rugosidad presentaron una baja tendencia a formar micro-colonias (XcF, XcG, XcL y XcI). Por otra parte, la distancia promedio de difusión, definida como la mínima distancia entre un pixel que contiene biomasa y un pixel en el cual hay un espacio vacío, que podría ser la distancia que un nutriente requiere para alcanzar el centro de la microcolonia. Altos valores de este parámetro indican mayores agregados de biomasa, *clusters* celulares más cercanos y, por ende, un *biofilm* más compacto, menos poroso y menos heterogéneo. Esto se observó en las cepas XcF y XcI, las cuales presentaron valores de distancia promedio de difusión significativamente mayores que los de la cepa silvestre, mientras que las cepas XcG y XcL, si bien mostraron valores mayores en este parámetro respecto de la cepa XcFC2, no resultaron significativas, lo cual se ve claramente en la Figura 39, donde puede apreciarse lo homogéneo y compacto de dichos *biofilms* en el caso de XcF y XcI, algo que no es tan pronunciado en XcG y XcL.

3.3. d. La composición del xantano y la virulencia de Xcc

A continuación, decidimos estudiar si la composición del xantano y, por ende, su estructura, afectan la virulencia de Xcc durante la infección de plantas de *A. thaliana*. Para ello, primero realizamos una infección de plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad con las distintas cepas de Xcc, productoras de distintas variantes de EPS. En la figura 40A, vemos que, a los 4 días post infección, la cepa no productora de xantano tiene enormes dificultades para colonizar el tejido

foliar, respecto de la cepa silvestre, lo cual coincide con resultados previamente publicados (Aslam *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2006). Cuando las plantas fueron infectadas por las cepas XcF y XcG, observamos que las lesiones exhibidas son mayormente clorosis (Figura 40D); sin embargo, el crecimiento bacteriano en el interior de la planta no da diferencias significativas respecto de la cepa silvestre (Figura 40A). Por su parte, las cepas más afectadas en la colonización endofítica del tejido foliar fueron XcL y XcI, las cuales tuvieron un comportamiento muy similar al de la cepa no productora de xantano, siendo las más comprometidas para evadir la respuesta de la planta (Figura 40A). Consistentemente, estas cepas no alcanzaron a desarrollar síntomas de gran importancia (Figura 40D).

Previamente, se ha descrito que el xantano posee la capacidad de suprimir la respuesta inmune de la planta (Yun *et al.*, 2006) y que, este compuesto, cuando es pre-inoculado en hojas, es capaz de revertir el fenotipo poco infectivo de la cepa no productora de xantano. Es por ello que, a partir de estos resultados, decidimos examinar si la menor habilidad de infección de las cepas productoras de variantes de EPS eran capaces de recuperar su patogenicidad debido al pre-tratamiento de hojas de *A. thaliana* con xantano silvestre. Observamos que, tanto la cepa Xc1231 como las cepas XcF, XcG, XcL y XcI recuperaron la infectividad y virulencia debido al pre-tratamiento con el xantano proveniente de la cepa silvestre (Figura 40B, E). Sin embargo, la recuperación de la infectividad por parte de las cepas mutantes de *Xcc* no alcanzó los mismos valores que la cepa salvaje pre-tratada con xantano nativo. Como se desprende de estos resultados, el xantano en su estructura nativa, es capaz de recuperar un fenotipo menos infectivo de estas cepas e incluso incrementar el fenotipo de la cepa silvestre, siendo el responsable del retorno de los síntomas de infección como puede observarse en la Figura 40E.

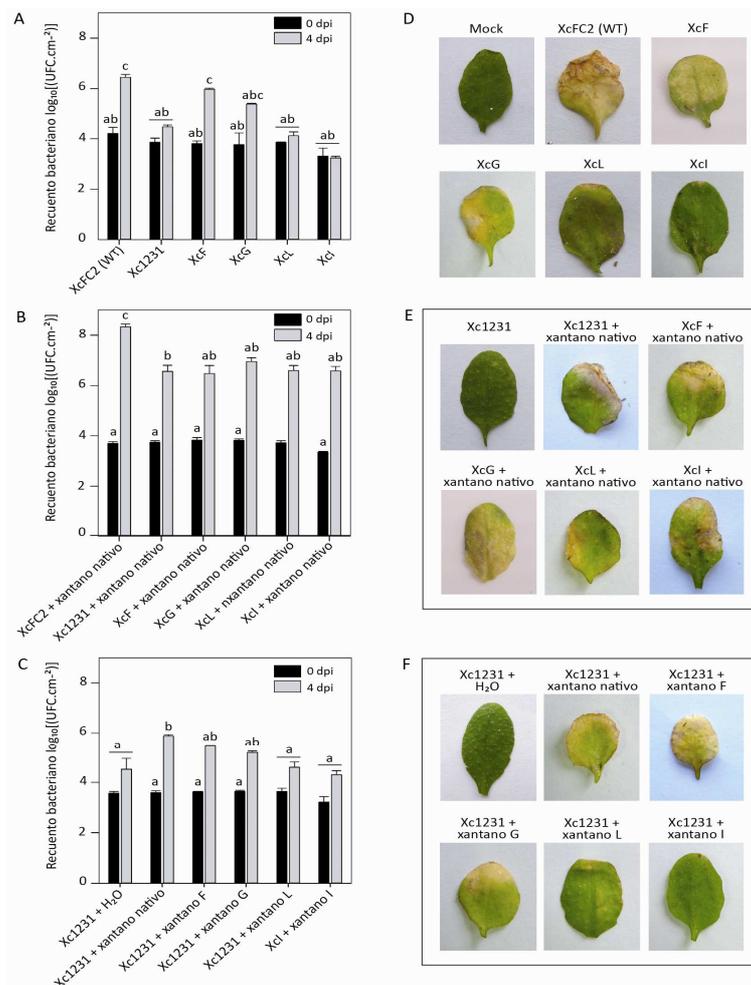


Figura 40. Crecimiento de distintas cepas de *Xcc* en plantas de *A. thaliana*. **A**, Crecimiento de las distintas cepas de *Xcc* ($OD_{600} = 0,1$) en plantas Col-0, 0 y 4 d post-inoculación (dpi). Los valores mostrados corresponden a promedios \pm ES ($n = 2$). UFC, unidades formadoras de colonias. **B**, Crecimiento de las distintas cepas de *Xcc* ($OD_{600} = 0,1$) en plantas Col-0, 0 y 4 d post-inoculación (dpi), previo tratamiento de infiltración con xantano nativo (200 μ g/ml) 24 hs antes de la infección. Los valores mostrados corresponden a promedios \pm ES ($n = 2$). **C**, Crecimiento de Xc1231 ($OD_{600} = 0,1$) en plantas Col-0, 0 y 4 d post-inoculación (dpi), previo tratamiento de infiltración con los distintos EPS de cada cepa de *Xcc* (200 μ g/ml) 24 hs antes de la infección. Los valores mostrados corresponden a promedios \pm SE ($n = 2$). Las barras de error representan SE de dos experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA 2 factores) en (A), (C) y (E). **D**, Imágenes representativas de hojas de *A. thaliana* infectadas según **A**, 5 dpi. **E**, Imágenes representativas de hojas de *A. thaliana* infectadas según **B**, 5 dpi. **F**, Imágenes representativas de hojas de *A. thaliana* infectadas según **C**, 5 dpi.

A continuación, decidimos investigar si los distintos xantanos producidos por las distintas cepas de *Xcc* eran capaces de revertir el fenotipo no infectivo de la cepa Xc1231, la cual no produce xantano. Para ello, realizamos un pre-tratamiento con los distintos EPS 24 h antes de la infección con la cepa Xc1231 y observamos el crecimiento endofítico a los 0 y 4 días post-infección. Como control negativo utilizamos un pre-tratamiento con H₂O y como control positivo el pre-

tratamiento con xantano nativo. Mientras que la cepa Xc1231 recuperó parcialmente la virulencia en respuesta al tratamiento con xantano nativo, el pre-tratamiento con EPS de las cepas XcF y XcG, si bien parece inducir mayor capacidad de infección, no alcanza a ser significativa la diferencia con respecto al día 0 post-infección (Figura 40C, F). Los EPS producidos por las cepas XcL e XcI fueron incapaces de recuperar el fenotipo de XcFC2, siendo éste bastante parecido al registrado en el tratamiento de H₂O en la cepa Xc 1231. Este resultado puede observarse también en los síntomas de las plantas (Figura 40F), donde puede verse cómo los EPS de las cepas silvestre, XcF y XcG promueven el desarrollo de síntomas cloróticos mientras que el EPS de XcL, y aún más la cepa XcI, casi no alteran los síntomas de la infección causada por Xc1231. Estos resultados sugieren, en conjunto, que la ausencia de los grupos cetil-piruvatos así como de la manosa externa (y por ende, del grupo cetil piruvato) en la unidad repetitiva afectan drásticamente el rol del xantano como factor de virulencia de Xcc durante el proceso infectivo.

3.3.e. Los grupos cetil piruvato y la manosa externa de la unidad repetitiva del xantano son necesarios para la deposición de calosa mediada por xantano

Como fue anteriormente mencionado, la deposición de calosa es una de las respuestas gatilladas por las plantas durante su defensa contra patógenos, como barrera de ingreso para atenuar la infección. Esta respuesta puede ser iniciada por la percepción, por parte de la planta, de MAMPs (Adam and Somerville, 1996; Bestwick *et al.*, 1995; Clay *et al.*, 2009; Hann and Rathjen, 2007). Asimismo, se ha reportado la supresión de la respuesta inmune de la planta por acción del xantano, impidiendo la deposición de este glucano lineal (Yun *et al.*, 2006).

Con el fin de examinar la habilidad de las variantes estructurales del xantano para interferir con la deposición de calosa, realizamos un ensayo mediante el cual evaluamos la capacidad de estos distintos EPS de suprimir la deposición de calosa inducida por flg22 en plántulas de *A. thaliana*. Observamos que, mientras el xantano nativo y los EPS provenientes de las cepas XcF y G lograban suprimir la inducción de la deposición de calosa, los EPS de las cepas XcL y XcI no fueron capaces de ejercer dicho efector supresor (Figura 41). Para descartar algún posible efecto de cada EPS sobre las plántulas solas, realizamos los controles con todos los EPS y observamos

que en ningún caso hay diferencias con el control tratado con H₂O, lo que indicaría que este polisacárido por sí solo ni es tóxico ni tampoco altera esta respuesta en la planta. De estos resultados, podemos decir que la ausencia de los grupos cetil piruvatos y/o de una manosa de la unidad repetitiva, la cual lleva grupos cetil piruvatos importantes en la quelación de cationes Ca²⁺ (debido a que aportan carga negativa a la molécula de xantano), altera la capacidad del xantano de suprimir la deposición de calosa. Como vemos en la Figura 41, las cargas negativas aportadas por el ácido glucurónico no parecen ser suficientes para inhibir la actividad de la calosa sintasa.

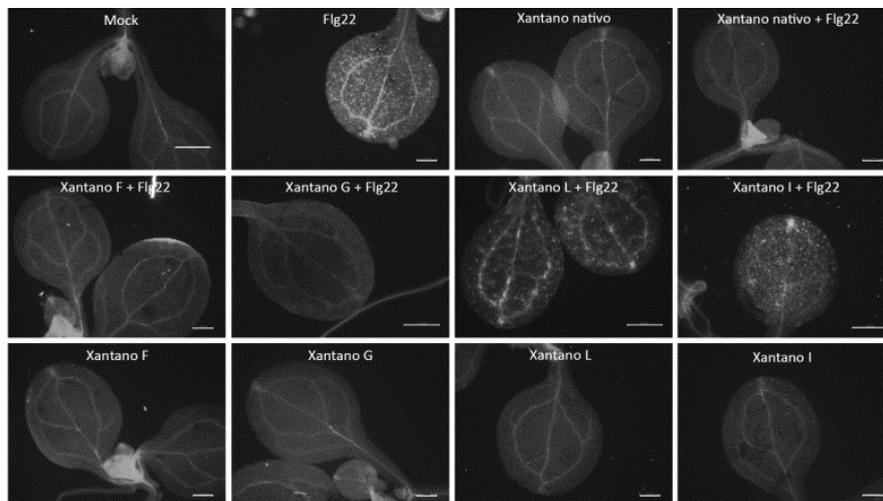


Figura 41. Los EPS que no portan los grupos piruvato y la manosa externa de la unidad repetitiva no pueden suprimir la deposición de calosa inducida por flg22. Plántulas de *A. thaliana* de 9 días en medio líquido fueron pre-tratadas con los distintos EPS de las distintas cepas de *Xcc* (200µg/ml), 24 horas después, fue agregada la flg22 (1µM). El revelado de los depósitos de calosa fue llevado a cabo 24 horas post-incubación de la flg22. El experimento fue realizado dos veces de modo independiente. Se muestran imágenes representativas de hojas de *A. thaliana*. Los depósitos de calosa (puntos blancos brillantes) fueron observados utilizando microscopía de fluorescencia. Escala= 20µm.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. PARTE I. Mecanismo de inhibición del cierre estomático por *Xcc* y *Pst* DC 3000

4.1.a. Purificación del factor de virulencia estomático *Xcc* FV

Uno de los objetivos del presente trabajo fue lograr purificar a homogeneidad el *Xcc* FV con el propósito de caracterizarlo químicamente y conocer su estructura. Si bien logramos desarrollar una metodología de purificación del compuesto, habiendo probado distintas condiciones de

medio de cultivo, pH y fuerza iónica en la extracción orgánica, y también seguir su actividad en ensayos biológicos a medida que obteníamos fracciones parcialmente purificadas de cromatografías de exclusión molecular y a través de HPLC, no logramos que esa fracción activa nos brinde información de su fórmula molecular ya que la cantidad de la fracción activa no fue suficiente para realizar la espectrometría de masas. Luego de consultas con especialistas en elucidación estructural de compuestos naturales, concluimos que el escollo que normalmente obstruye el objetivo es que este tipo de compuestos a menudo están en trazas y por ello, aun con grandes volúmenes de cultivo, es difícil obtener cantidades suficientes como para alcanzar una buena relación señal : ruido. En el futuro, esperamos poder conocer su estructura química y eso seguramente permitirá conocer más acerca de los mecanismos moleculares de su acción como modulador estomático. Sin embargo, de los experimentos realizados, pudimos estimar su peso en valores alrededor de 1KDa, ya que este compuesto eluía en un volumen (y tiempo) intermedio en una cromatografía de exclusión molecular cuyo corte era de 2kDa. Asimismo, debido a una mayor eficiencia en la extracción ácida de los sobrenadantes de cultivo, podemos estimar que dicho compuesto, a pH neutro, es probable que posea cargas negativas y que, por la mezcla de solventes utilizados durante la extracción orgánica, el compuesto es medianamente polar. Asimismo, es importante destacar que el T_R al cual eluye del HPLC el compuesto de nuestro interés coincide, dentro del programa de corrida, con un porcentaje de 40% de acetonitrilo, 40% H_2O y 10% de metanol, lo que también nos sugiere que el compuesto es bastante polar.

4.1. b. Efecto de Xcc FV y coronatina en la producción de ERO en células de la guarda

En el presente trabajo mostramos un mecanismo a través del cual tanto el Xcc FV como la coronatina, una fitotoxina producida por la bacteria patogénica *Pst* DC3000, inhiben la inmunidad estomática, a través de la inhibición de la producción de ERO dependiente de las enzimas NADPH oxidasas. Tanto el Xcc FV como la coronatina inhiben el cierre estomático inducido por flg22, ABA y oscuridad (cuya producción de ERO es mediado por NADPH oxidasas) pero no por SA, hormona que induce peroxidasas de pared celular para gatillar ERO. Si bien su efecto sobre la inhibición de ERO en células de la guarda es muy claro, observamos que estas toxinas no afectan el estallido oxidativo inducido por flg22 en discos de hoja. Por estas

evidencias, es razonable pensar que estas toxinas inhiban específicamente a algún regulador estomático de la actividad de las NADPH oxidasas. Por otra parte, dado que estas toxinas no fueron capaces de evitar el cierre estomático inducido por H_2O_2 , y que la coronatina no pudo impedir la autooxidación de la epinefrina por radicales superóxido, no pareciera que dichos compuestos pudieran actuar como *scavengers* del anión superóxido ni del H_2O_2 . La coronatina tampoco actuaría por inhibición de la superóxido dismutasa, que oxida aniones superóxido generados por la NADPH oxidasa a H_2O_2 . Estos resultados contribuyen a comprender el mecanismo de acción del *Xcc* FV, el cual sirve de herramienta a la bacteria para mejorar su tasa de ingreso a través de estomas y así colonizar con mayor éxito a sus plantas hospedadoras según ha sido reportado previamente por nuestro grupo (Gudesblat *et al.*, 2009). Por su parte la coronatina también facilita la invasión de *Pst* DC3000 a través de estomas (Melotto *et al.*, 2006), inhibiendo la inmunidad estomática, y de otras maneras previamente descritas como la promoción, multiplicación y persistencia de la bacteria dentro de la planta, inducción de síntomas de enfermedad, aumento de la susceptibilidad a la enfermedad en partes no infectadas de la planta y un retraso en la respuesta hipersensible (Lee *et al.*, 2013; Xin and He, 2013). Sin embargo, y, aquí lo novedoso, ninguno de estos efectos de la coronatina han sido relacionados con la inhibición de la síntesis de ERO dependiente de NADPH oxidasas. De hecho, plantas tratadas con coronatina mostraron un aumento en la producción de ERO luego de 24 horas tanto en tomate (Ishiga *et al.*, 2009) como en *A. thaliana* (Camanes *et al.*, 2012). También es interesante destacar que el rol inhibitorio de *Xcc* FV sobre las NADPH oxidasas requiere, al igual que la coronatina, del receptor COI1, y de los factores de transcripción MYC2 y ANAC019, ANAC055 y ANAC072 para impedir el cierre estomático, lo cual sugiere que podría existir entre estos dos compuestos alguna similitud estructural.

Las ERO actúan como importantes nodos en la señalización estomática (Baxter *et al.*, 2013; Kollist *et al.*, 2014), y es por ello que su concentración dentro de la célula está finamente regulada. Se ha demostrado que las NADPH oxidasas AtRBOHD y AtRBOHF son reguladas de múltiples maneras, incluyendo la unión directa de Ca^{2+} (Ogasawara *et al.*, 2008) y ácido fosfatídico (Zhang and Du, 2009), por fosforilación mediada por las quinasas OST1/SnRK2.6 (Sirichandra *et al.*, 2009a), CIPK26 (interactora de la proteína calcineurina tipo B) (Drerup *et al.*,

2013), CDPK5 (Dubiella *et al.*, 2013) y BIK1, la cual es parte del complejo receptor de varios MAMPs (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Sería, en este contexto, razonable pensar que tanto Xcc FV como la coronatina podrían interferir con algunos de estos mecanismos regulatorios sobre la actividad de la NADPH oxidasa en células de la guarda. Sin embargo, nuestro hallazgo de una sensibilidad normal de mutantes en BIK1 y OST1 a coronatina, parece descartar la posibilidad de que el efecto de esta toxina sea mediada al menos por estas quinasas. De modo consistente con lo mostrado en este trabajo, se ha reportado que la coronatina revierte el efecto inhibitorio de la flg22 sobre los canales rectificadores de entrada de K⁺ en estomas (Zhang *et al.*, 2008), que a su vez son regulados negativamente por H₂O₂ (Kohler *et al.*, 2003).

4.1.c. Efecto de la coronatina en la regulación de componentes de la señalización de ABA en estomas a través de ERO

De manera consistente con el efecto inhibitorio de la coronatina sobre la producción de ERO mediada por NADPH oxidasas, la doble mutante afectada en la síntesis de ERO, *atrbohdf* es insensible a coronatina para el cierre inducido por ABA y por oscuridad. Sin embargo, el hecho de que la simple mutante *atrboh*, afectada en la respuesta estomática a flg22 y oscuridad pero no a ABA, sea también insensible a coronatina para la promoción de cierre mediada por ABA, nos sorprendió y nos hizo sospechar de anomalías en la señalización de ABA en esta mutante dado que esperábamos que la coronatina pudiera actuar sobre la AtRBOHF y, de ser así, la coronatina debería haber mostrado un efecto de inhibición parcial del cierre inducido por ABA. Esta mutante posee otros fenotipos inesperados, ya que exhibe activación constitutiva o sobre-activación de la inmunidad (Kadota *et al.*, 2015), aún cuando su incapacidad de sintetizar ERO en respuesta a MAMPs haría predecir el fenotipo opuesto. Las mutantes *mpk3 mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* que, como *atrboh*, están afectadas en la sensibilidad a flg22 pero no a ABA, también mostraron insensibilidad a coronatina para la promoción de cierre por ABA, indicando que la disrupción de la señalización de MAMPs de algún modo afecta la señalización de ABA. De modo interesante, a pesar de cerrar los estomas de dichas mutantes de manera normal en presencia de coronatina, este compuesto fue capaz de inhibir la síntesis ERO en sus estomas. El cierre estomático inducido por ABA también ocurrió normalmente en estas mutantes en presencia del inhibidor de NADPH oxidasas DPI, el cual bloquea la inducción estomática de

ERO e impide el cierre de estos poros (Kwak *et al.*, 2003). Además, estas cuatro mutantes también exhibieron sensibilidad reducida al cierre inducido por H₂O₂, sugiriendo que estos elementos genéticos cumplirían en la señalización del ABA río abajo de la síntesis de ERO. Pareciera, a la luz de estos resultados, que algunos componentes de la señalización de ABA en células de la guarda independientes de ERO pueden compensar defectos en la producción de ERO o su señalización (Figura 42).

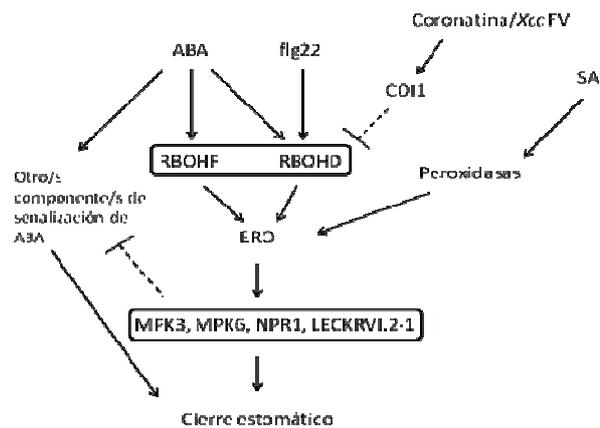


Figura 42 Modelo propuesto de la inhibición de ROS mediada por coronatina y Xcc FV en el contexto de la señalización del ABA. La coronatina y el Xcc FV inhiben la cierre estomático mediado por ABA y flg22 a través de la inhibición de la síntesis de ERO catalizada por las NADPH oxidasas AtRBOHD y AtRBOHF. Estas toxinas no afectan la promoción de cierre inducida por SA, hormona que induce la síntesis de EROs a través de peroxidasas. En las mutantes *atrbohhd*, *mpk3*, *mpk6*, *npr1-3* y *lecrkVI.2.1* la sensibilidad a ABA no sería afectada por coronatina, y posiblemente tampoco por Xcc FV. Esto podría deberse a la regulación negativa de ERO por parte de otros componentes de la señalización de ABA, los cuales podrían estar más activos en estas mutantes. En consecuencia en estas mutantes el cierre estomático en respuesta a ABA sería normal aun en ausencia de la señalización de ERO.

La síntesis de tales componentes de señalización podría ser regulada negativamente por ERO a plazos largos y por lo tanto estaría potenciada en las mutantes *mpk3 mpk6*, *npr1-3* and *lecrkVI.2-1* y posiblemente también en *atrbohhd*. Asimismo, la mutante *coi1-16*, al igual que el resto, es insensible al inhibidor DPI, lo que indicaría que este gen estaría involucrado en la regulación de ERO inducido por ABA. Previamente, había sido reportado que mutantes antisentido MPK3 específicas de estomas eran insensibles al Xcc FV en el cierre de estomas mediado por ABA, con un efecto similar a la coronatina (Gudesblat *et al.*, 2009). Esta similitud entre ambas toxinas podría estar relacionada con la dependencia de COI1 por parte de ambas para ejercer su efecto inhibitorio. La coronatina inhibe tanto la promoción de cierre como la inhibición de apertura mediada por flg22 (Melotto *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Observamos que esto también es

válido en el caso del ABA, incluso cuando existe clara evidencia de que la señalización de esta hormona difiere entre los dos procesos (Yin *et al.*, 2013). Mientras *npr1-3* y *lecrkVI.2-1* exhiben una sensibilidad similar a ABA, como las plantas silvestres, para la inhibición de apertura, las mutantes *mpk3* y *mpk6* son parcialmente insensibles a esta hormona, un fenotipo previamente reportado en mutantes antisentido MPK3 específicas de estomas (Gudesblat *et al.*, 2007). En ambas mutantes la coronatina puede reducir aún más la sensibilidad a ABA, sugiriendo que la menor sensibilidad de *mpk3* y *mpk6* a ABA sería en parte independiente de las NADPH oxidasas, posible blanco de la coronatina.

Previamente, ha sido postulado que el SA y, por ello, NPR1, un factor de transcripción esencial en la señalización de SA en defensa, actúa genéticamente río arriba de ABA, dado que la biosíntesis de ABA es necesaria para el cierre estomático mediado por SA (Zeng and He, 2010). También se ha propuesto que la coronatina impide el cierre estomático a través de la inhibición de la síntesis de SA a nivel de la planta entera (Zheng *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis, dado que la coronatina en nuestros ensayos es capaz de inhibir la inducción de ERO inducida por ABA aun cuando la señalización de SA está interrumpida en mutantes *npr1-3* en células de la guarda. Como mencionamos en la introducción, LECRK-VI.2 es un receptor quinasa tipo L de lectinas requerido para la activación de las MPK3 y MPK6 inducidas por flg22 y para la resistencia de la planta frente a patógenos (Singh *et al.*, 2012). Cómo LECRKVI.2 podría actuar precisamente en la señalización río debajo de ERO es una pregunta que aún requiere más estudios para poder ser respondida. Las mutantes de pérdida de función, *lecrk-V.5*, afectadas en un gen que codifica otro receptor de la misma familia, son menos sensibles a coronatina. Esto podría deberse a su fenotipo de producción de ERO constitutivamente aumentada (Desclos-Theveniau *et al.*, 2012), la cual puede compensar la inhibición de la producción de ERO causada por esta toxina en estomas. Recientemente, ha sido demostrado que tanto la sobreexpresión del receptor de ABA, RCAR3, como la mutación del gen que cifra la fosfatasa interactora PP2CA causa una sensibilidad aumentada a ABA y pérdida de sensibilidad a coronatina para el cierre estomático mediado por ABA (Lim *et al.*, 2014). Es tentador especular con que las manipulaciones en la señalización del

ABA reportadas en este trabajo causen un efecto similar sobre la señalización del ERO que las causadas por las mutantes *mpk3 mpk6*, *npr1-3* and *lecrkVI.2-1*.

4.1.d. MeJA y coronatina: diferentes mecanismos de inhibición del cierre estomático inducido por flg22

La capacidad de antagonizar el cierre estomático mediado por MAMPs a través de la estimulación de la señalización de JA no es privativa de la coronatina o del Xcc FV. El efector de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* HopX1, inhibe el cierre estomático a través de la activación de la señalización de JA, promoviendo la degradación de las proteínas represoras JAZ y puede complementar a una cepa de *Pst* deficiente en la producción de coronatina (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). Recientemente, se ha demostrado también que la proteína efectora AvrB de *Pst* puede rescatar la capacidad de reabrir los estomas en la cepa de *Pst* deficiente en la producción de coronatina de una manera dependiente del receptor COI1 (Zhou *et al.*, 2015). Sin embargo, aunque es evidente que la coronatina inhibe el cierre estomático inducido por ABA y flg22, la evidencia con respecto al efecto de otros jasmonatos sobre los estomas es conflictiva. Mientras algunos reportes muestran que el MeJA promueve el cierre estomático (Gehring *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2011; Savchenko *et al.*, 2014; Suhita *et al.*, 2004), nuestros resultados concuerdan con reportes previos que muestran que esta hormona no tiene efecto alguno sobre el cierre estomático y, en cambio, sí posee un efecto inhibitorio del cierre inducido por flg22 y en bacterias y de un modo independiente de COI1 (Montillet *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). Aunque existen diferentes formas de jasmonatos en plantas, solo el conjugado JA-Ile es biológicamente activo (Wasternack and Hause, 2013). Tanto JA-Ile como su análogo estructural coronatina, pero no la mezcla racémica (\pm) JA, son capaces de promover la apertura de los estomas de *Ipomoea tricolor* previamente cerrados por oscuridad (Okada *et al.*, 2009). No es fácil explicar cómo el MeJA causa efectos distintos a los de la coronatina en estomas, cuando ambos inducen respuestas similares en otros tejidos. Una explicación posible sería que, bajo condiciones medioambientales diferentes, el MeJA sea conjugado de modo diferente dentro de la célula, dando compuestos con diferentes actividades, algunos de los cuales actuarían de modo independiente de COI1. Es interesante que la coronatina misma es capaz de causar efectos independientes de COI1 (Geng *et al.*, 2012). El estudio del efecto de otros jasmonatos sobre los

estomas podría ayudar a clarificar la evidencia conflictiva en este punto. Durante los ensayos realizados, también consideramos la posibilidad de que el MeJA comercial utilizado pudiera estar contaminado. Por ello, este compuesto fue purificado por HPLC según una técnica ya descrita (Segarra *et al.*, 2006). La purificación no eliminó la capacidad de reapertura del MeJA con lo cual, que el MeJA no posea verdaderamente esa actividad biológica de reapertura del cierre mediado por flg22 parece remota.

4.1.e. Variantes naturales de *A. thaliana* con sensibilidad diferencial a coronatina

Con doble el fin de comprender mejor el mecanismo de acción de la coronatina y del *Xcc* FV, y de lograr plantas con mayor resistencia a las bacterias que los producen a través de reducir la sensibilidad estomática a dichas toxinas, investigamos si existe variación natural en *A. thaliana* en la sensibilidad a estas toxinas. De los ensayos de apertura estomática realizados en algunas variantes naturales de *A. thaliana*, surge que algunas de ellas presentan insensibilidad a la modulación estomática ejercida por *Pst* o *Xcc* a través de sus toxinas. Asimismo, en un ensayo de sensibilidad a coronatina, en presencia de ABA, observamos que el fenotipo de insensibilidad se confirmaba para dos variantes: Mv-0 y ICE-75. Sin embargo, pese que hipotetizábamos que dichas variantes podían tener una sensibilidad diferencial debido a la presión de selección sobre el receptor de JA y coronatina, *COI1*, no encontramos evidencia estadística mediante la prueba de Tajima que indicara que este gen y su región promotora pudiera haber sido sometido a presión de selección. Sin embargo, si bien la prueba global de Tajima arrojó un resultado que no permite rechazar la hipótesis de modelo neutro, examinando el valor del estadístico a lo largo de toda la secuencia del gen y su promotor, notamos que, tanto en la región promotora como en el primer exón, era posible encontrar variaciones significativas que sugirieran que podía haberse producido alguna selección positiva sobre dicho *locus*. Más allá del análisis de la variabilidad dentro un set de ecotipos, evaluamos también la variabilidad de este grupo de ecotipos respecto de la especie hermana *A. lyrata*, mediante la prueba de Mc Donald and Kreitman. El resultado del análisis de las regiones codificantes de *COI1*, arrojó un resultado significativo que indicaría que ha habido alguna presión de selección. En cualquier caso, si bien las pruebas estadísticas permiten apoyar con mayor o menos fuerza algunas hipótesis, no es concluyente ni tampoco exclusivo de otras posibilidades que pudieran haber tenido lugar en la evolución. Respecto del

análisis de la sensibilidad a MeJA de estos ecotipos en raíz, es interesante que Mv-0 mostró variación en la sensibilidad a coronatina en estomas pero normal sensibilidad a MeJA en raíz, a diferencia de ICE-75, ecotipo que resultó ser insensible tanto para coronatina en estomas como para MeJA en raíz. El fenotipo exhibido por Mv-0 resulta interesante ya que, si bien no es capaz de percibir a la coronatina y por ende, esperaríamos que se infecte menos con *Pst* DC 3000, percibe normalmente al MeJA, lo cual indicaría que a nivel de la planta entera podría gatillar normalmente la respuesta a necrótrofos. Si esto, fuera así, la planta tendría una ventaja respecto de otros ecotipos ya que no estaría afectada en la defensa a necrótrofos pero sí frenaría de modo más eficiente la entrada de patógenos por estomas. Tan interesante es este fenotipo en términos agronómicos que recientemente se reportó la modificación del receptor COI1 en plantas de *A. thaliana* de modo que perciba al JA normalmente pero que sea incapaz de unir coronatina (Zhang *et al.*, 2015). Es por ello que el fenotipo de Mv-0 amerita un estudio más exhaustivo en términos experimentales y evolutivos, ya que de identificarse la mutación responsable podría ser transferida a especies de interés agronómico mediante ingeniería genética.

4.2. PARTE II. Estudios de los mecanismos de acción del glucano β -(1,2) cíclico como supresor de la respuesta inmune vegetal

4.2.a. El glucano β -(1,2) cíclico interfiere con la respuesta inmune inducida por flg22

Este trabajo muestra varios aspectos del rol del glucano β -(1,2) cíclico en la modulación de la inmunidad de las plantas. El pre-tratamiento con glucano β -(1,2) cíclico en hojas de *A. thaliana* da por resultado la supresión de la respuesta de defensa inducida por flg22 contra *Xcc*, aumentando los síntomas de enfermedad y mejorando la colonización del tejido vegetal por parte de la bacteria. Los MAMPs como la flg22, Ef-Tu, quitina, peptidoglicano entre otros, son percibidos por PRRs y, entre otras respuestas de defensa, disparan la deposición de calosa con el propósito de fortalecer las paredes celulares (Boller and Felix, 2009; Tateda *et al.*, 2014). La supresión de la deposición de calosa es un mecanismo muy extendido en el quiebre de la capa de inmunidad por parte de los patógenos de plantas. El xantano, el más abundante EPS secretado por *Xanthomonas*, induce la susceptibilidad de la planta suprimiendo la deposición de calosa (Yun *et al.*, 2006) por un mecanismo de quelación de calcio a través de las cargas negativas

del polisacárido (Aslam *et al.*, 2008). Sin embargo, el glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* es neutro, de modo que la inhibición de la deposición de calosa debe deberse a otro mecanismo. Adicionalmente, el efector proteico de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, XopJ, también inhibe la deposición de calosa en la pared celular como estrategia de colonización (Bartetzko *et al.*, 2009). El glucano β -(1,2) cíclico también disminuye dramáticamente la deposición de calosa en plántulas luego de 24 horas de tratamiento con flg22, indicando que el compuesto activamente interfiere con las repuestas tardías de la flg22, lo que facilitaría la entrada del patógeno. Este resultado se encuentra de acuerdo con hallazgos previos en *N. benthamiana* (Rigano *et al.*, 2007a). Vale la pena mencionar que el glucano β -(1,2) cíclico de *Sinorizobium meliloti* (que difiere del de *Xcc* en el número de residuos de glucosa) también exhibe el mismo comportamiento en la supresión de la deposición de calosa inducida por flg22 (no mostrado). Este resultado echa luz sobre el mecanismo de infección de la bacteria, mostrando cómo el glucano β -(1,2) cíclico actúa sobre respuestas de flg22. El tratamiento con flg22 conduce a la acumulación de la fitohormona y molécula señal SA (Mishina and Zeier, 2007; Tsuda *et al.*, 2008b). SA aumenta la acumulación de ERO inducida por flg22 (Sato *et al.*, 2010; Tateda *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Sumado a esto, la flg22 induce la expresión de *PR1*, un gen dependiente de la vía hormonal de SA a 12 y 24 horas post-inducción con este MAMP (Denoux *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que el glucano β -(1,2) cíclico inhibe la inducción del gen *PR1* inducido por flg22 y por SA, indicando que el glucano β -(1,2) cíclico modula genes relacionados con SA, dejando a la planta más vulnerable a la infección. Este resultado sugiere que el glucano β -(1,2) cíclico, probablemente, pueda antagonizar la señalización de SA, a través de la modulación de *PR1*, como parte de la respuesta tardía. Aún resta determinar si el glucano β -(1,2) cíclico es capaz de modular directamente los niveles de SA en la planta o si regula al menos la sensibilidad de la planta a dicha hormona. A la luz de este resultado, hipotetizamos que tal vez el glucano β -(1,2) cíclico pudiera antagonizar la señalización dependiente de SA debido a una estimulación del antagonismo SA-JA (Van der Does *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque el glucano β -(1,2) cíclico antagoniza SA a través de la expresión de *PR1*, este compuesto no tiene efecto alguno en la expresión de un gen de respuesta a JA, *PDF1.2*. Estos resultados sugieren que el glucano β -(1,2) cíclico no modularía la defensa de la planta a través de la señalización de JA.

Estos hallazgos difieren del modelo de acción propuesto para otro supresor sistémico de la defensa, la coronatina, el cual sugiere que dicha toxina alcanza su efecto supresor disparando la cascada de señalización de JA, lo que lleva a la supresión de los genes de síntesis de SA (Zheng *et al.*, 2012). La flg22 rápidamente induce genes que cifran proteínas como factores de transcripción, fosfatasa y quinasas, entre otros que regulan el recambio de proteínas (Navarro *et al.*, 2004). La flg22 también induce la producción de ERO en pocos minutos, como parte de la cascada de señalización de la PTI (Torres and Dangl, 2005). En este trabajo, mostramos que el glucano β -(1,2) cíclico reduce la inducción de los genes *WRKY22*, *WRKY33*, *MPK3* y *BIK1*, todos inducidos por flg22 a muy cortos tiempos luego de la inducción, lo que indica que esta molécula es capaz de interferir con los componentes tempranos de la cascada de señalización de la PTI y que su acción está involucrada desde el inicio de la respuesta de defensa. La inhibición rápida llevada a cabo por el glucano β -(1,2) cíclico, sobre la producción de ERO inducida por flg22 añade evidencia acerca del rol del glucano β -(1,2) cíclico en la respuesta temprana de defensa. La glicosilación, como modificaciones post-traduccionales, puede ser utilizada por los patógenos para enmascarar sus propios MAMPs, como la glicosilación de la flagelina en la bacteria *Acidovorax avenae*. Estas modificaciones post-traduccionales inhiben la producción de ERO y la expresión de genes de defensa (Hirai *et al.*, 2011). De modo interesante, en un trabajo previo fue reportado que la producción de ERO inducida por flg22 era suprimida por xantano, de un modo dependiente de la concentración, con una completa inhibición a una concentración de 5 mg/ml (Aslam *et al.*, 2008). Basada en la evidencia provista en este trabajo, es probable que el glucano β -(1,2) cíclico afecte otras respuestas tempranas de la defensa como fosforilación de algunas proteínas como MAPKs, etc.

4.2.b. La acción del glucano β -(1,2) cíclico requiere dos proteínas con dominios LysM en plantas de *A. thaliana*

Dada la supresión que los factores NOD causan sobre la producción de ERO inducida por flg22, cuya percepción requiere de la proteína LYK3 (Liang *et al.*, 2013), nos preguntamos si el glucano β -(1,2) cíclico podría requerir para ejercer su acción de los elementos genéticos involucrados en la percepción o señalización de los factores NOD, llamados receptores con dominios LysM, o proteínas LYK. Estos receptores en *A. thaliana* están caracterizados por la presencia de uno o más

motivos ricos en lisina en su dominio extracelular (Zhang *et al.*, 2007). Las proteínas con dominios LysM no están presentes únicamente en plantas sino que han sido reportados en otras formas de vida, desde bacterias hasta vertebrados (Laroche *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2015). Nuestro experimento de infección muestra que, a diferencia de lo que ocurre en plantas silvestres Col y las mutantes *lyk1* y *lyk2*, el glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* no es capaz de inhibir la inmunidad de las mutantes *lyk3* y *lyk4*, las cuales son más resistentes a la invasión bacteriana. Esta evidencia nos llevó a examinar el rol de estas proteínas LYK en la supresión ejercida por el glucano β -(1,2) cíclico en la producción de ERO inducida por flg22. Mostramos que, en plantas defectivas en las proteínas LYK3 y LYK4, pero no en LYK1 y LYK2, el glucano no suprime la producción de ERO inducida por flg22. Todos juntos, estos resultados sugieren que LYK3 y LYK4 estarían involucradas en el mecanismo de acción del glucano β -(1,2) cíclico, ya sea en la percepción del mismo o como parte en la cascada de señalización. De modo interesante y como antes mencionamos, los factores NOD de nodulación, los cuales son moléculas señal en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-legumbres, fueron reportados como supresores de la producción de ERO inducida por flg22 en plantas de *A. thaliana* Col, *lyk1*, *lyk2* y *lyk4* pero estos compuestos no consiguieron ejercer su acción supresora en la mutante *lyk3* (Liang *et al.*, 2013), sugiriendo que la proteína LYK3 es requerida por los factores NOD para la supresión de la inmunidad inducida por MAMPs. Así, el glucano β -(1,2) cíclico y los factores NOD comparten algunas características similares, no solo por su naturaleza sacarídica parcial, sino también por rol supresor de la producción de ERO inducida por flg22. Se ha descrito que el glucano β -(1,2) cíclico de *B. abortus*, la bacteria patógena causante de la brucelosis en animales, desempeña un rol clave como supresor en el primer paso de la invasión, interactuando con los *lipid rafts* de la célula hospedadora y permitiendo la posterior colonización (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Sin embargo, el glucano β -(1,2) cíclico de *B. abortus* también ha sido descrito como un inductor de la respuesta inmune en células dendríticas animales (Martirosyan *et al.*, 2012). Sería muy interesante en el futuro descifrar el mecanismo exacto que subyace a este efecto supresor.

Más allá de las características comunes, los glucanos muestran una enorme diversidad estructural y funcional. El glucano β -1,3 lineal, laminarina, derivado del alga marrón *Laminaria digitata*, fue descrito, contrariamente al glucano β -(1,2) cíclico, como un eficiente inductor de las

respuestas de defensa en células y en plantas de uva, efectivamente reduciendo el desarrollo de las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea* y *Plasmopara viticola* en plantas de uva (Aziz *et al.*, 2003). La pared celular del hongo *Magnaporthe oryzae* está formada por un glucano β -1,3 lineal y por quitina, MAMPs que inducen la respuesta de defensa en plantas de arroz. Este patógeno, a su vez, sintetiza un glucano α -1,3 lineal, el cual es crucial para una eficiente infección del hongo a través del enmascaramiento de la quitina y el glucano β -1,3 lineal, protegiéndolos de la degradación y permitiendo que el hongo evada exitosamente la activación de la defensa vegetal (Fujikawa *et al.*, 2012). Sin embargo, una cepa de *Rhizoctonia* produce un glucano α -1,3 lineal que posee la propiedad de inducir la respuesta de defensa en plantas y tubérculos de papa, sugiriendo que el mismo tipo de molécula puede ejercer roles opuestos (Wolski, 2006).

4.2.c. El glucano β -(1,2) cíclico es capaz de unirse con relativa afinidad a membranas de *A. thaliana*

Para profundizar en el mecanismo de acción del glucano β -(1,2) cíclico, investigamos si dicho compuesto podría ser percibido por un posible receptor de *A. thaliana*. Los glucano cíclicos de *B. japonicum* son capaces de unirse a membranas de soja de modo específico (Bhagwat *et al.*, 1999). Encontramos que glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* exhibe una unión rápida, específica y saturable a membranas de *A. thaliana*, alcanzando un *plateau* dentro de los 20 minutos, sugiriendo que existiría un receptor de membrana para este compuesto. Más aún, la curva de ajuste para la unión ligando-receptor del glucano β -(1,2) cíclico arrojó un valor de constante de disociación de K_d 2,397 μ M. Esta K_d es al menos un orden de magnitud mayor que las típicas K_d de ligandos proteicos, como el Ef-Tu (Zipfel *et al.*, 2006). La comparación de este valor con la menor de concentración de glucano β -(1,2) cíclico requerida para observar un efecto supresor a nivel sistémico (Rigano *et al.*, 2007a), 30 μ g/ml o \sim 10 μ M, indica que la afinidad del glucano β -(1,2) cíclico por un potencial receptor de superficie no es tan alta pero dicho valor es inferior al valor de glucano β -(1,2) cíclico utilizado en los ensayos. En el ensayo de desplazamiento, observamos que el glucano [14 C] β -(1,2) cíclico puede ser desplazado por glucano β -(1,2) cíclico no radiactivo, alcanzando el 50% de desplazamiento a una concentración de 7 μ M. Este valor acuerda con el valor de K_d , en el orden de magnitud, ambas por debajo de la concentración de glucano β -(1,2) cíclico requerida para ver un efecto supresor sistémico. También este valor está en concordancia

con los resultados de los ensayos de desplazamiento en ensayos de unión realizados con glucanos cíclicos de *B. japonicum* y membranas de soja, en los cuales el 50% de desplazamiento es alcanzado a una concentración de 10 μM (Bhagwat *et al.*, 1999). Adicionalmente, estudios recientes han identificado un receptor quinasa con tres motivos LysM en *L. japonicus*, EPR3, capaz de percibir directamente el EPS de *Mesorhizobium loti*, y la K_a para la unión entre el EPS y el ectodominio de EPR3 fue de 2,1 μM (Kawaharada *et al.*, 2015), valor en concordancia con nuestros resultados. En resumen, este trabajo muestra que el glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* suprime la inmunidad de la planta afectando las respuestas montadas por la PTI inducidas por flg22 y, posiblemente, por otros MAMPs. Este efecto es alcanzado a través de la supresión de eventos tempranos y tardíos inducidos por este MAMP. El glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* impide la expresión de factores de transcripción de la familia WRYK, genes como *MPK3*, *BIK1* y, tardíamente, *PR1*. El glucano β -(1,2) cíclico también interfiere con el estallido oxidativo inducido por flg22, inhibe la deposición de calosa y, para este objetivo, requiere de componentes de señalización como LYK3 y LY4, dos receptores con motivos ricos en lisina en plantas de *A. thaliana*. Asimismo, también demostramos que es probable que el glucano β -(1,2) cíclico ejerza su efecto supresor a través de la unión a un potencial receptor de superficie, cuya identidad molecular es materia de estudios futuros. Dado que los estudios de dispersión de rayos X han demostrado la unión intermolecular entre dominios LysM y quitohexosa (Wong *et al.*, 2015), sería razonable especular que el glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* pudiera ser sentido por este tipo de proteínas con dominios LysM en *A. thaliana*.

4.3. PARTE III Estudios de los dominios estructurales activos del xantano

4.3.a. Efecto de los sustituyentes y alteraciones en la unidad repetitiva del xantano en la adhesión y formación de *biofilm* de *Xcc*

El xantano es el mayor exopolisacárido producido por *Xcc* y posee un rol muy importante en la virulencia de esta bacteria, disminuyendo la deposición de calosa (Yun *et al.*, 2006), a través del secuestro de cationes Ca^{2+} (Aslam *et al.*, 2008). Se sabe que los grupos cetil piruvato de las manosas externas del xantano los principales responsables de la quelación de cationes (Aslam *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2008) y no los grupos carboxilo del ácido glucorónico. Sin embargo,

poco se sabía acerca de qué parte de la molécula del xantano es crítica o indispensable para la correcta formación de *biofilm*. Tampoco se conocía si los grupos sustituyentes tenían un rol en la formación de dichas organizaciones bacterianas. En este trabajo, hemos podido avanzar en el conocimiento de cómo los grupos acetilos y piruvato afectan en distinto grado la adhesión y formación de *biofilm* sobre superficies abióticas. La falta de grupos acetilos en la manosa interna confiere al xantano mayor grado de desorden ya que en su ausencia dejan de establecerse uniones de tipo puente hidrógeno o hidrofóbicas con el *backbone* de celulosa. Esto confiere al EPS carente de grupos acetilos mayor flexibilidad y radio hidrodinámico. Por ello, el *biofilm* resultante tiene menor organización interna, con canales de agua difusos o nulos. La ausencia de acetilación en las manosas externas no tiene un efecto tan drástico en el *biofilm* resultante; eso puede deberse a que el porcentaje de acetilación de las manosas externas en general es mucho menor al grado de acetilación de las manosas internas, de modo que esto no afectaría dramáticamente su estructura, que aún cuenta con las manosas internas acetiladas. La falta de las manosas externas (y por ende de grupos cetil piruvato) da lugar a un EPS con moléculas más ordenadas, compactas y rígidas, y menos cargadas negativamente. La estructura de este EPS evidentemente repercute drásticamente en la adhesión y formación de *biofilm*, el cual acusa una arquitectura chata, sin agrupamientos muy claros ni canales de agua definidos.

Estos resultados muestran que la integridad de la molécula de xantano repercute en la formación de *biofilm* y las modificaciones más drásticas se evidencian ante la ausencia de grupos cetil piruvato y de la manosa externa de la unidad repetitiva.

4.3.b. Efecto de la estructura de EPS en la virulencia de *Xcc*

La formación de *biofilm* afecta aspectos de la vida de la bacteria no sólo en su vida libre o epifítica sino cuando ya se encuentra en el interior de la planta. Así fue reportado en plantas de limón, en las cuales se observó la formación de estructuras de *biofilm* dentro de los canchros producidos por *X. citri* (Rigano *et al.*, 2007b), poniendo en evidencia que el *biofilm* cumple un rol en la patogenicidad y supervivencia de las bacterias dentro de sus hospedadores. Hasta la fecha no se han reportado estudios acerca de qué tan crítica pueda ser la estructura del xantano en la virulencia de la bacteria. En el presente trabajo quisimos abordar el estudio de la relación entre

la estructura y la función del EPS como factor de virulencia de *Xcc*. A la luz de los resultados, podemos concluir que, en la capacidad de virulencia, la cepa cuyo EPS carece de grupos cetal piruvato (XcL) y la cepa cuyo EPS no posee la manosa externa en su unidad repetitiva (XcI) son las más afectadas en el crecimiento endofítico, lo que se ve muy claramente en los síntomas de la enfermedad. La sustitución de las manosas acetiladas no parece ser clave en la patogenicidad de la bacteria, más allá de alterar parcialmente su estructura de *biofilm*. Ahora bien, la cepa no productora de xantano (Xc1231) que tiene serias dificultades para infectar exitosamente la planta y sobrevivir dentro de la misma, revierte parte de su fenotipo en presencia de xantano nativo (como ya fue descrito) (Yun *et al.*, 2006) y de los EPS que carecen de grupos acetilo, tanto en la manosa interna como en la externa. Esto sugiere que la función del xantano como supresor de la respuesta inmune no se ve afectada significativamente por la falta de acetilación en su estructura. Sin embargo, los EPS que no poseen grupos cetal piruvatos o la manosa externa, no logran revertir el fenotipo poco infectivo. Este patrón se corresponde con la habilidad de estos EPS de suprimir la deposición de calosa en plántulas de *A. thaliana*. Los EPS incapaces de suprimir la deposición de calosa inducida por *flg22* son aquellos que no poseen los grupos cetal piruvato ni la manosa externa completa. Es así como queda demostrado que la estructura del xantano cumple un rol muy importante en la virulencia de la bacteria y en su colonización endofítica, lo que la hará más o menos ventajosa en su lucha por proliferar. Es importante destacar que, hasta la actualidad, poco se conoce acerca de cómo es sentido el xantano en la planta, cómo son los mecanismos moleculares que se inician luego de su reconocimiento. Recientemente, y como ya fue mencionado, fue reportado en *Lotus japonicus*, un locus, *epr3*, responsable de la percepción directa del EPS de *Mesorhizobium loti* y que este locus regula el pasaje de las bacterias a través de la pared celular y luego controla la virulencia dentro de la planta (Kawaharada *et al.*, 2015). Este resultado abre una puerta del estudio de cómo los carbohidratos sintetizados por las bacterias y que funcionan como factores de virulencia son reconocidos por las plantas y evaden la respuesta inmune. Esta temática es por demás interesante para poder arbitrar en el futuro estrategias de control más eficientes contra *Xcc* y *X. citri*.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo de tesis tuvo por objetivo realizar una contribución en el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales moléculas sintetizadas por *Xcc*, y también por *Pst*, actúan como factores de virulencia, logrando ayudar a estas bacterias evadir parcialmente la respuesta de defensa edificada por las plantas, usando como modelo *A. thaliana*. En la primera parte de este trabajo, logramos optimizar el método de purificación del *Xcc* FV así como también pudimos conocer en mayor profundidad el mecanismo de acción de este compuesto y de la coronatina, encontrando que estas toxinas son capaces de inhibir, a nivel estomático, la producción de ERO inducida por NADPH oxidasas. Como mencionamos a lo largo de esta tesis, los estomas forman parte activa de la inmunidad de una planta y también la vía natural de ingreso de bacterias patógenas aunque también beneficiosas. Como estrategia de control, sería deseable obtener plantas que exhibieran un fenotipo de resistencia al ingreso por estomas de bacterias, sin que eso vaya en perjuicio de su inmunidad sistémica. Una posibilidad para lograr esto puede hallarse en la búsqueda de variantes naturales de las plantas de interés que tengan menor sensibilidad a MAMPs en estomas pero que exhiban normal percepción de los mismos en el resto de la planta. La otra posibilidad sería desarrollar plantas afectadas en el receptor COI1 sólo en estomas, de modo que la planta tenga normal sensado de toxinas y JA y entonces pueda disparar normal respuesta de defensa, como fue recientemente publicado (Zhang *et al.*, 2015).

En la segunda parte de este trabajo, estudiamos el mecanismo del glucano β -(1,2) cíclico de *Xcc* en la inmunidad inducida por flg22 y hallamos que este compuesto actúa como un supresor de la respuesta inmune inducida por este MAMP, disminuyendo la producción de ERO, la expresión de genes tempranos y tardíos de la defensa, inhibiendo la deposición de calosa y que su acción como supresor requiere de dos proteínas de *A. thaliana*, LYK3 y LYK4, las cuales podrían estar involucradas en la percepción o señalización de este compuesto. Finalmente, pudimos demostrar que el glucano β -(1,2) cíclico es capaz de unirse de modo saturable, reversible y específico a membranas de *A. thaliana*, apoyando la hipótesis de que existan receptores de azúcares que unan este tipo de moléculas.

En la tercer parte de este trabajo, estudiamos cómo la estructura del EPS más abundante de *Xcc* afecta la arquitectura del *biofilm* que forma la bacteria, su adhesión a superficies abióticas, su virulencia durante el proceso infectivo y su capacidad para inhibir la deposición de calosa. Encontramos que los cambios más drásticos en la patogenicidad de la bacteria en plantas de *A. thaliana*, ocurre cuando el xantano carece de sus grupos cetil-piruvatos y de la manosa externa que conforma el pentasacárido típico de este EPS.

En relación a los polisacáridos producidos por *Xcc*, xantano y glucano β -(1,2) cíclico, resulta muy interesante continuar explorando el campo molecular de la percepción de estos azúcares por parte de putativos receptores en plantas, ya que hoy en día la evidencia publicada a este respecto, parece apoyar esta hipótesis, poniendo a los azúcares como actores de relevancia en la interacción planta-patógeno. Otro aspecto interesante a explorar, como posibles herramientas para mitigar los efectos de estos factores de virulencia, sería buscar exhaustivamente enzimas que degraden específicamente a estos polisacáridos (en el caso del xantano han sido descritas liasas (Hashimoto *et al.*, 1998; Ruijssenaars *et al.*, 1999) pero en el caso del glucano β -(1,2) cíclico no hay casi antecedentes (Patente Kitahara (1990) N° JP02049583) y así dotar a las plantas de enzimas que puedan robustecer su sistema de defensa.

6. ANEXOS

ANEXO I. Listado de ecotipos de *A. thaliana* utilizados en el análisis evolutivo de la Sección 3.1. g. Los asteriscos indican los ecotipos ensayados experimentalmente.

Ecotipo	Ecotipo	Ecotipo	Ecotipo
C24	Bil	Sp-0	Wkse6
Cats69937	Br-0	Sparta1	Udul6390
CIBC5	ESP1119908	Sprrr12	Ulies1
Cyr88	Eden1	Spro1	Ulla1
Can-0	Eden7	Spro3	Ullapool8
Castelfeld421	Edi-0	Sr3	Uod2
Chaba29624	En-2	Star8	Uod7
Col-0 *	Epidauros	Stara1	Ved10
Cvi-0 *	Hap139786	Staro1	Vaar1
Dr-0	HosB9800	Ste2	Vash1
BRE149919	Had2	Ste3	WAR7477
Bak2	Haes198791	Ste4	WestKar4
Basta1	Hag2	Stilo1	Wil2
Bor4	MNFche21925	Sus1	Wu-0
Bur-0 *	Mv-0 *	T1000	An1
ENC219907	MARCE19655	T1070	Yeg2
Eden-1	Mitterberg218	T1090	Yeg7
Erg26	Demoe21	T110	Xan1
Filet-1	Orast19741	T470	Zupan-1
Fondi-1	Ove	T480	Grivo
Geo	Qui-0	T530	Gol2
Geg14	Rak2	T570	Groen14
Hsm	Rakit1	T790	Pber-0
Hel3	Rd0	T800	Had2
Hov17	Rhen1	T990	Bro
Hov41	Rio	TAA04	Kondara *
ICE102	SAUL249918	TAA18	Kas-2*
ICE104	SLSP31	TB001	
ICE152	Sakata	Tdr13	
ICE36	San2	Tdr2	
ICE60	Sanna2	TEDEN03	
ICE75 *	Sap-0	TFAE07	
ICE92	Schip1	Tom6	
PBER0	Set1	Tom7	
ARR179927	Sever1	Trae1	
Aa0	Sf1	TV30	
Aedal3	Sg1	Tamm27	
Basta	Sio	Teiu2	
Benk1	Sha	Try4	
Berg1	Sim1	Tomegap2	
Bg2	Smolj1	Ukse6	
Bijisk4	Sorbo	Tub2	

ANEXO II. Secuencias nucleotídicas de *COI1* (región codificante y promotor) en las siete variantes naturales utilizadas experimentalmente. Se muestra el alineamiento de dichas secuencias.

Bur0	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
Col	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
Cvi	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
ICE-75	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
Kas2	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
Kondara	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
Mv-0	1	GG TG CCT AAC AT CAA AGG TT GTC AGG TC CCA TC FCC TG ATT CAT CAT CA TCT TCT GG CT T
Bur0	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G T A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA CG G
Col	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G C A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA C T G
Cvi	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G C A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA C G G
ICE-75	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G C A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA C T G
Kas2	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G C A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA C G G
Kondara	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G C A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA C T G
Mv-0	61	TT CT GAA ACA GCT GA TTC CT CCT CG AGT G T A TC ATC AAA AT CTC TT AGA GCA CG CCA CG G
Bur0	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
Col	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
Cvi	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
ICE-75	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
Kas2	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
Kondara	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
Mv-0	121	TG GG ACT CAA CA GAC AAA GA CCC AA GGA AGC CT CAG CC CTA GAG CA AGC TCC TT CAA AGA
Bur0	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
Col	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
Cvi	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
ICE-75	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
Kas2	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
Kondara	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
Mv-0	181	AA AC ACA CTG AG AAA TGC TT CTC TA CGT ATC TC CTC TA GAG ATA AA TCA AAG GG ACA CAG
Bur0	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
Col	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
Cvi	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
ICE-75	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
Kas2	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
Kondara	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
Mv-0	241	TG AA GGCC AT TT CTC AAT CT TTG AT AAT TCA TC CAT TA CCT CTA TCC CC ACC AA TGT AGA
Bur0	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
Col	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
Cvi	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
ICE-75	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
Kas2	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
Kondara	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
Mv-0	301	GG GT TTT ATC CAG TC AGA AG GAG AA GTT GAA GA AGC TA CTG AGA AT TAT AAT GGA AT CAG
Bur0	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
Col	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
Cvi	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
ICE-75	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
Kas2	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
Kondara	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
Mv-0	361	AC AA ATT ATT GCT TTT TGA AGA AG CA GAG TCA AC ACC AA GTA CAA TG ACC GGA CCT TCC CC C
Bur0	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC
Col	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC
Cvi	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC
ICE-75	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC
Kas2	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC
Kondara	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC
Mv-0	421	AT TT CCT TTG AAG AT GGG TC CAC CA GTC TTT TC FCC TT ATT ATT GCT GG TG CCCTCC AAC

Bur0	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
Col	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
Cvi	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
ICE-75	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
Kas2	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
Kondara	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
Mv-0	481	CACTTCA TCGCT TCA CGCAC CAT CT GCC TCT TA TCA GT TCC CTC CA CTA TCCAT TGA GC T
Bur0	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
Col	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
Cvi	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
ICE-75	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
Kas2	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
Kondara	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
Mv-0	541	ACCTTCCCTTCCGCCACTTTCTCC TTA TTA CCAGC AT CGG GAT CA GAT GGA TT CTT GA T
Bur0	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
Col	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
Cvi	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
ICE-75	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
Kas2	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
Kondara	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
Mv-0	601	CCCGTCA TCA CC GCT CGA TC TCT CT GAC ATC CCTCC AT TAC CAT TAG TC CAC CA CAT AC C
Bur0	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
Col	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
Cvi	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
ICE-75	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
Kas2	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
Kondara	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
Mv-0	661	CATTCAGGC TC ATC ATC AT CAT CA TCC CAG CA ACA GA TGA TGA TT CCT ATA AT GTG CGA
Bur0	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
Col	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
Cvi	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
ICE-75	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
Kas2	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
Kondara	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
Mv-0	721	CCCTATTGTTCA TAT TCCAG TTA TC GAT ATC TT CTC TT CAG GTC AA AGC TAT CT GGT AA G
Bur0	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
Col	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
Cvi	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
ICE-75	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
Kas2	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
Kondara	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
Mv-0	781	CGCTGGA CCC AC CGG GAT AA TAT CC ACG GGC AT CCC TC CGC TCC CA GTG GAG AA TGA TT C
Bur0	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
Col	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
Cvi	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
ICE-75	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
Kas2	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
Kondara	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
Mv-0	841	GCTGGTC GAG AA AGG TGC AA GAG AA ACA CTA CG ATT GC TCA TAA GC GGA GCC AA TGC AA C
Bur0	901	AA CA TCT ACA CC TTT GAA CC ATC AT GGA AGC AG AGG TC TAT ACA GT GTG AGC CG GGA TG T
Col	901	AA CA TCT ACA CC TTT GAA CC ATC AT GGA AGC AG AGG TC TAT ACA GT GTG AGC CG GGA TG T
Cvi	901	AA CA TCT ACA CC TTT GAA CC ATC AT GGA AGC AG AGG TC TAT ACA GT GTG AGC CG GGA TG T
ICE-75	901	AA CA TCT ACA CC TTT GAA CC ATC AT GGA AGC AG AGG TC TAT ACA GT GTG AGC CG GGA TG T
Kas2	901	AA CA TCT ACA CC TTT GAA CC ATC AT GGA AGC AG AGG TC TAT ACA GT GTG AGC CG GGA TG T

Bur0	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
Col	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
Cvi	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
ICE-75	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
Kas2	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
Kondara	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
Mv-0	961	GA GT GGT GTG AG CTT GTT TG CAC CT ATT GGG CT GCA AC AAC CGA GT TCA GTT GA GGG AG G
Bur0	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
Col	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
Cvi	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
ICE-75	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
Kas2	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
Kondara	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
Mv-0	1021	AG AT GGT GGT GG TGA GAG TG TGA GC TCA AGC GA AGC AG TGC CTG CG CCT CCC AG AGA GA C
Bur0	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
Col	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
Cvi	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
ICE-75	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
Kas2	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
Kondara	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
Mv-0	1081	TT CT GGT TAA TT TTT TT GGT TCT TT GTA AGT GT GGT CC GAG TTA AGT GT ATAGA AAA CT C
Bur0	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
Col	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
Cvi	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
ICE-75	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
Kas2	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
Kondara	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
Mv-0	1141	AT CT CTC GCC TAG TT TTT GG TTT TG TTC AGC CCA AG TC TTT TGG TT TCA GGT GT AAT TA G
Bur0	1201	TC GG TT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
Col	1201	TC GG GTT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
Cvi	1201	TC GG GTT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
ICE-75	1201	TC GG GTT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
Kas2	1201	TC GG GTT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
Kondara	1201	TC GG GTT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
Mv-0	1201	TC GG TT TTT TG TAG CTT GC TTA TA TTA CCT TT GTT AT TTC CGA GT TTC AAA TG AAG CT A
Bur0	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
Col	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
Cvi	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
ICE-75	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
Kas2	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
Kondara	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
Mv-0	1261	AG AAA TAC GA TC ATA A TAAA AAA GT TCT TTT GC AGT AT TCA TTT TC TTT CAT GG TTCCC T
Bur0	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
Col	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
Cvi	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
ICE-75	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
Kas2	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
Kondara	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
Mv-0	1321	CC TT ATT CAT AG TCA TTG TT GTT CT TTC TAA TACTT TT CCT GAG CT TTT TTT TT CTA TT G
Bur0	1381	GA AAA AAC TTT TG TCA CTG AA AGA AA TTT CAA TG TGA TT GGT TCT TT TCG CAA CT GTA AT A
Col	1381	GA AAA AAC TTT TG TCA CTG AA AGA AA TTT CAA TG TGA TT GGT TCT TT TCG CAA CT GTA AT A
Cvi	1381	GA AAA AAC TTT TG TCA CTG AA AGA AA TTT CAA TG TGA TT GGT TCT TT TCG CAA CT GTA AT A
ICE-75	1381	GA AAA AAC TTT TG TCA CTG AA AGA AA TTT CAA TG TGA TT GGT TCT TT TCG CAA CT GTA AT A
Kas2	1381	GA AAA AAC TTT TG TCA CTG AA AGA AA TTT CAA TG TGA TT GGT TCT TT TCG CAA CT GTA AT A

Bur0 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA
Col 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA
Cvi 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA
ICE-75 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA
Kas2 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA
Kondara 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA
Mv-0 1441 AGCACTAAAAGT TAA TAA TT TGC TG CTT TTT AA GTC TT GTT GCT GAATGATT TAATCCCA

Bur0 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT
Col 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT
Cvi 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT
ICE-75 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT
Kas2 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT
Kondara 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT
Mv-0 1501 AAGACGT TAAAA AAAAGT CA TGT AA ATA GTC TT TGT TC CAA AAG TA CCA TTT TGAGCGCT

Bur0 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA
Col 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA
Cvi 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA
ICE-75 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA
Kas2 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA
Kondara 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA
Mv-0 1561 TTCTTTC GACAA TTGATGTT GAA CT TGT ACC AA ATA AA CCT TGAAA ATCATA CA TCA TTA

Bur0 1621 AATGTAG TCT TTT TGT TAT AT ACT TA TAT TCA TA TGG TC CAT AAT AT ATA GTT AACCA TAT
Col 1621 AATGTAG TTT TT TGT TAT AT ACT TA TAT TCA TA TGG TC CAT AAT AT ATA GTT AACCA TAT
Cvi 1621 AATGTAG TTT TT TGT TAT AT ACT TA TAT TCA TA TGG TC CAT AAT AT ATA GTT AACCA TAT
ICE-75 1621 AATGTAG TTT TT TGT TAT AT ACT T----- AAT AT ATA GTT AACCA TAT
Kas2 1621 AATGTAG TCT TTT TGT TAT AT ACT TA TAT TCA TA TGG TC CAT AAT AT ATA GTT AACCA TAT
Kondara 1621 AATGTAG TTT TT TGT TAT AT ACT TA TAT TCA TA TGG TC CAT AAT AT ATA GTT AACCA TAT
Mv-0 1621 AATGTAG TCT TTT TGT TAT AT ACT TA TAT TCA TA TGG TC CAT AAT AT ATA GTT AACCA TAT

Bur0 1681 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA
Col 1681 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA
Cvi 1681 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA
ICE-75 1664 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA
Kas2 1681 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA
Kondara 1681 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA
Mv-0 1681 FATGGAC CAT AT AAA TTC AT GCA GT CAA CAA CT TTT TTT TCC TC ATT AAA AGCTA CTA

Bur0 1740 ATACTGT AGAAA ATT TTT AT CCT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T
Col 1740 ATACTGT AGAAA ATT TTT AT CTT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T
Cvi 1740 ATACTGT AGAAA ATT TTT AT CCT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T
ICE-75 1723 ATACTGT AG---- TTT AT CTT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T
Kas2 1740 ATACTGT AGAAA ATT TTT AT CCT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T
Kondara 1741 ATACTGT AGAAA ATT TTT AT CCT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T
Mv-0 1740 ATACTGT AGAAA ATT TTT AT CCT AC AAA AGAA GGA GA ATT ATT GT ATT TTT AT TTT AA T

Bur0 1800 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA AAT TT TTT GC T
Col 1800 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA AAT TT TTT GC T
Cvi 1800 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA AAT TT TTT GC T
ICE-75 1778 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA AAT TT TTT GC T
Kas2 1800 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA AAT TT TTT GC T
Kondara 1801 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA TTT TT TTT GC T
Mv-0 1800 CACATAT AAA GC AAC CAA AGATA AC ATA TAC TA GTA TT TAG TAT TT TTA AAT TT TTT GC T

Bur0 1860 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA CTT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C
Col 1860 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA TT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C
Cvi 1860 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA TT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C
ICE-75 1838 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA TT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C
Kas2 1860 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA CTT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C
Kondara 1861 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA TT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C
Mv-0 1860 TAGGATT CAGGT TAT TAA TA CTC TA TAA AGAA TAA CTT AAA TCT AT CCA TCGAA TAAAT C

maa0 2400 CGTCCGACCGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA
 Co1 2400 CGTCCGACCGGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA
 Cyt4 2400 CGTCCGACCGGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA
 zCm-75 2378 CGTCCGACCGGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA
 maa2 2400 CGTCCGACCGGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA
 WOODMAN 2401 CGTCCGACCGGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA
 str-C 2400 CGTCCGACCGGTGTGACGACGCCTATAGAGCAAGGCACGACGCATATAAATCTGACCCGGAAGGA

maa0 2480 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC
 Co1 2480 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC
 Cyt4 2480 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC
 zCm-75 2428 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC
 maa2 2480 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC
 WOODMAN 2481 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC
 str-C 2480 TTTCTGATATCCGCGCTCTTGTGGCGGTGTCAGAGTGGTTCAAGATTGATATCCGAGCCGGAAGC

maa0 2520 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC
 Co1 2520 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC
 Cyt4 2520 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC
 zCm-75 2498 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC
 maa2 2520 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC
 WOODMAN 2521 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC
 str-C 2520 GCACTGCACGATATGGCGCTTTGTCTAAGCTGCGACGCGCTGATGCTTTAGCCGATGACATCC

maa0 2580 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC
 Co1 2580 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC
 Cyt4 2580 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC
 zCm-75 2558 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC
 maa2 2580 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC
 WOODMAN 2581 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC
 str-C 2580 GAUATTTGAGGCCTCTCCAGGCTCAUAGGCGAUGCCATAGAGCAAGCTATAATTTAAATCTGAATCC

maa0 2640 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC
 Co1 2640 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC
 Cyt4 2640 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC
 zCm-75 2618 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC
 maa2 2640 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC
 WOODMAN 2641 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC
 str-C 2640 TTAGGAACTGGGAGGCCTACGCTAACCTCTTGGGCTTACCTGAGATTCTTAAAGAACTTAAAGCC

maa0 2700 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC
 Co1 2700 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC
 Cyt4 2700 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC
 zCm-75 2678 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC
 maa2 2700 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC
 WOODMAN 2701 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC
 str-C 2700 GCTCAAGATCCGTGCATCTCCGACGGAATGATGCTCAAGTGAATGACCTAAGCTAAGATCCGTTAAGC

maa0 2760 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC
 Co1 2760 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC
 Cyt4 2760 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC
 zCm-75 2738 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC
 maa2 2760 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC
 WOODMAN 2761 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC
 str-C 2760 TAAAGCTTAGGCAAGACGACCTGAGAGCTTGGAGCTAGAGCAAGTGTCTCGGTTTAACTAAC

▼ 83 next 1

maa0 2820 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC
 Co1 2820 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC
 Cyt4 2820 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC
 zCm-75 2798 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC
 maa2 2820 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC
 WOODMAN 2821 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC
 str-C 2820 TTAGTAAATCTTTGAAATATGCTAACCAATCTTAAAGTTAACTTTATCAAGATCTTAACTAAC

Bur0	2880	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
Col	2880	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
Cvi	2880	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
ICE-75	2858	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
Kas2	2880	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
Kondara	2881	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
Mv-0	2880	CTACTTTGGCTCGATGCTTTTGAAGTTTAGCGACTCCTTATCATTTCCCTACTTTGACTAG
Bur0	2940	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
Col	2940	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
Cvi	2940	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
ICE-75	2918	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
Kas2	2940	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
Kondara	2941	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
Mv-0	2940	AACTCTAGATGCATTGGCTCTTTTAAAAAACTTAATAAGTCGTCGTTGTACA AAGAAC
Bur0	3000	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
Col	3000	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
Cvi	3000	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
ICE-75	2978	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
Kas2	3000	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
Kondara	3001	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
Mv-0	3000	CATA TCT TGA GT TTG TGT TT GTA AA GAT TTG AT CTT CT TTA GCT CAATT GGG TA AGT TG T
Bur0	3060	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
Col	3060	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
Cvi	3060	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
ICE-75	3038	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
Kas2	3060	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
Kondara	3061	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
Mv-0	3060	AACTTTGGGTGGA TAC TTT TT GTC CT TAA TGAA AAT TG GT GAA CCT TACTT CAT TT GAT TT C
Bur0	3120	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
Col	3120	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
Cvi	3120	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
ICE-75	3098	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
Kas2	3120	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
Kondara	3121	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
Mv-0	3120	TTAGTACACTTTACA CTAAGAGT AA TAT AAGCAGAAACATT TAT TT CAGAAAAGT TTCAGT
Bur0	3180	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
Col	3180	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
Cvi	3180	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
ICE-75	3158	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
Kas2	3180	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
Kondara	3181	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
Mv-0	3180	ATTTAGGCGTTCATGTTTGTCTTATATCCCTAAATGCTTTGCAA CTGTTATGCTTGCTAT
Bur0	3240	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
Col	3240	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
Cvi	3240	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
ICE-75	3218	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
Kas2	3240	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
Kondara	3241	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
Mv-0	3240	TAAA GCA GAA AT TGC AAT GA TCT TC AGT TAT TT CTC AA TTG GGG AAG TA TAA AC TTT GA T
Bur0	3300	CCGGATT TTA TC TACAAC CAATT TT TTCCTCTTTGGGAA CAT TCACT TTGTT TAT GCA
Col	3300	CCGGATT TTA TC TACAAC CAATT TT TTCCTCTTTGGGAA CAT TCACT TTGTT TAT GCA
Cvi	3300	CCGGATT TTA TC TACAAC CAATT TT TTCCTCTTTGGGAA CAT TCACT TTGTT TAT GCA
ICE-75	3278	CCGGATT TTA TC TACAAC CAATT TT TTCCTCTTTGGGAA CAT TCACT TTGTT TAT GCA
Kas2	3300	CCGGATT TTA TC TACAAC CAATT TT TTCCTCTTTGGGAA CAT TCACT TTGTT TAT GCA

Bur0 3360 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT
 Col 3360 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT
 Cvi 3360 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT
 ICE-75 3338 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT
 Kas2 3360 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT
 Kondara 3361 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT
 Mv-0 3360 TAAATAGCAAAAAGATTGATTTCTGACATCTTCAGTCTGTCAGAGTTTATGTGTATTAT

Bur0 3420 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T
 Col 3420 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T
 Cvi 3420 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T
 ICE-75 3398 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T
 Kas2 3420 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T
 Kondara 3421 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T
 Mv-0 3420 TGGT TTT TGAAT CCT TGA TT CGG CT GCT GCT GT TCT TC ATA TTC AG TTT TAG CG GGA A T

Inicio exón 2

Bur0 3480 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA
 Col 3480 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA
 Cvi 3480 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA
 ICE-75 3458 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA
 Kas2 3480 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA
 Kondara 3481 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA
 Mv-0 3480 CCAAATA TCTTGAGT TGT TT CTCAC TTT ATT CA TGC AA CTG TCT GT TGT CTT GT CCA GGA

Bur0 3540 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC
 Col 3540 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC
 Cvi 3540 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC
 ICE-75 3518 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC
 Kas2 3540 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC
 Kondara 3541 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC
 Mv-0 3540 AAATAAA AACTT TGT TAA TG GAA GA GAG TTC TT TTA GT GAA AAG GA TGG TAA GT GGC TTC

Bur0 3600 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG
 Col 3600 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG
 Cvi 3600 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG
 ICE-75 3578 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG
 Kas2 3600 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG
 Kondara 3601 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG
 Mv-0 3600 ATGAGCT TGCTCAGCACAAACACA TC TCT TGA GG TTT TAAAC TTC TA CAT GAC GGAGT TTG

Bur0 3660 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG
 Col 3660 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG
 Cvi 3660 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG
 ICE-75 3638 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG
 Kas2 3660 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG
 Kondara 3661 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG
 Mv-0 3660 CCAAAT CAGTCCCA AAGAC TTG GA AAC CAT AG CTA GA AAT TGCCGCTC TCT GG TAT CTG

Bur0 3720 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C
 Col 3720 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C
 Cvi 3720 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C
 ICE-75 3698 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C
 Kas2 3720 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C
 Kondara 3721 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C
 Mv-0 3720 TGAAGGT CGGTGACT TTGAGATT TTGGA ACTAG TTGGG TTC TTTAAGGC TGC AGCTAAT C

Bur0 3780 TTGAAGAATT TTGTGGTGGC TCC TT GAA TGA GG ATA TTGGAATGCC TGA GAA GT ACA TGA
 Col 3780 TTGAAGAATT TTGTGGTGGC TCC TT GAA TGA GG ATA TTGGAATGCC TGA GAA GT ACA TGA
 Cvi 3780 TTGAAGAATT TTGTGGTGGC TCC TT GAA TGA GG ATA TTGGAATGCC TGA GAA GT ACA TGA
 ICE-75 3758 TTGAAGAATT TTGTGGTGGC TCC TT GAA TGA GG ATA TTGGAATGCC TGA GAA GT ACA TGA
 Kas2 3780 TTGAAGAATT TTGTGGTGGC TCC TT GAA TGA GG ATA TTGGAATGCC TGA GAA GT ACA TGA

Bur0	4320	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
Col	4320	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
Cvi	4320	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
ICE-75	4298	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
Kas2	4320	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
Kondara	4321	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
Mv-0	4320	CAAA GAG GAT TA ATC GCT TT GGC TC AGG GCT GC CAG GA GCT AGA AT ACA TGG CGG TG TA T
Bur0	4380	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
Col	4380	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
Cvi	4380	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
ICE-75	4358	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
Kas2	4380	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
Kondara	4381	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
Mv-0	4380	GT CT CAG ATA TA ACT AAC GAATC TC TTG AAA GC ATA GGC CAC ATA TC TGA AAA AC CTC TG T
Bur0	4440	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
Col	4440	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
Cvi	4440	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
ICE-75	4418	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
Kas2	4440	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
Kondara	4441	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
Mv-0	4440	GACT TCC GCC TT GTC TTA CT CGA CCG GGA AAG AA AGG AT TAC AGA TC TGC CAC TG GAC AAC
Bur0	4500	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
Col	4500	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
Cvi	4500	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
ICE-75	4478	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
Kas2	4500	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
Kondara	4501	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
Mv-0	4500	GGAG TCC GAT CT CTT TTG AT TGG AT GCA AG AAA CTC AG ACG GTT TG CAT TCT AT CTG AGA
Bur0	4560	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
Col	4560	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
Cvi	4560	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
ICE-75	4538	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
Kas2	4560	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
Kondara	4561	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
Mv-0	4560	CAAG GCG GCT TA ACC GAC TT GGG CT TAA GCT AC ATC GG ACA GTA CA GT CCAA AC GTG AGA
Bur0	4620	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
Col	4620	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
Cvi	4620	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
ICE-75	4598	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
Kas2	4620	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
Kondara	4621	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
Mv-0	4620	TG GA TGC TGC TG GGT TAC GT AGG TGA AT CAG AT GAA GG TTT AAT GGA AT TCT CA AGA GG C
Bur0	4680	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
Col	4680	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
Cvi	4680	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
ICE-75	4658	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
Kas2	4680	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
Kondara	4681	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
Mv-0	4680	TG TC CAA ATC TA CAG AAG CT AGA GA TGA GAG GT TGT TG CTT CAG TG AGC GAG CA ATC GC T
Bur0	4740	GCAG CGG TTA CA AAA TTG CCT TC ACT GA GAT AC TTG TGGT ACA AG GTT ACA GA GCA TC G
Col	4740	GCAG CGG TTA CA AAA TTG CCT TC ACT GA GAT AC TTG TGGT ACA AG GTT ACA GA GCA TC G
Cvi	4740	GCAG CGG TTA CA AAA TTG CCT TC ACT GA GAT AC TTG TGGT ACA AG GTT ACA GA GCA TC G
ICE-75	4718	GCAG CGG TTA CA AAA TTG CCT TC ACT GA GAT AC TTG TGGT ACA AG GTT ACA GA GCA TC G
Kas2	4740	GCAG CGG TTA CA AAA TTG CCT TC ACT GA GAT AC TTG TGGT ACA AG GTT ACA GA GCA TC G

Bur0 4800 ATGA CGG GAC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA
 Col 4800 ATGA CGG GAC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA
 Cvi 4800 ATGA CGG GAC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA
 ICE-75 4778 ATGA CGG GTC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA
 Kas2 4800 ATGA CGG GAC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA
 Kondara 4801 ATGA CGG GTC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA
 Mv-0 4800 ATGA CGG GAC AA GAT CTA AT GCA GA TGG CTA GA CCG TA CTG GAA CA TCG AGC TG ATT CCA

Bur0 4860 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T
 Col 4860 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T
 Cvi 4860 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T
 ICE-75 4838 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T
 Kas2 4860 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T
 Kondara 4861 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T
 Mv-0 4860 TC AA GAA GAG TC CCG GAA GT GAA TC AAC AAG GA GAG AT AAG AGA GA TGG AGC AT CCG GC T

Bur0 4920 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA
 Col 4920 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA
 Cvi 4920 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA
 ICE-75 4898 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA
 Kas2 4920 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA
 Kondara 4921 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA
 Mv-0 4920 CATA TAT TGG CT TAC TAC TC TCT GG CTG GCC AGAGA AC AGA TTG TC CAA CAA CT GTT AGA

▼ fin exón 3

Bur0 4980 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA
 Col 4980 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA
 Cvi 4980 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA
 ICE-75 4958 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA
 Kas2 4980 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA
 Kondara 4981 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA
 Mv-0 4980 GTCC TGA AGG AG CCA ATA TGA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adam L, Somerville SC. 1996. Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 9, 341-356.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyon I, Gorvel JP. 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6, 618-625.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.
- Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR, Cooper RM. 2008. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* 18, 1078-1083.
- Atwell S, Huang YS, Vilhjalmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT, Jiang R, Mulyati NW, Zhang X, Amer MA, Baxter I, Brachi B, Chory J, Dean C, Debieu M, de Meaux J, Ecker JR, Faure N, Kniskern JM, Jones JD, Michael T, Nemri A, Roux F, Salt DE, Tang C, Todesco M, Traw MB, Weigel D, Marjoram P, Borevitz JO, Bergelson J, Nordborg M. 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465, 627-631.
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A. 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 1118-1128.
- Ballio A CE, De Leo P, Erlanger BF, Mauri M, Tonolo A. 1964. Fusicoccin: a new wilting toxin produced by *Fusicoccum amygdali*. *Nature* 203, 297.
- Bardoel BW, van der Ent S, Pel MJ, Tommassen J, Pieterse CM, van Kessel KP, van Strijp JA. 2011. *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog* 7, e1002206.
- Barreras M, Salinas SR, Abdian PL, Kempel MA, Ielpi L. 2008. Structure and mechanism of GumK, a membrane-associated glucuronosyltransferase. *J Biol Chem* 283, 25027-25035.
- Bartetzko V, Sonnewald S, Vogel F, Hartner K, Stadler R, Hammes UZ, Bornke F. 2009. The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 655-664.
- Baunsgaard L, Fuglsang AT, Jahn T, Korthout HA, de Boer AH, Palmgren MG. 1998. The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H(+)-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *Plant J* 13, 661-671.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N. 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 65, 1229-1240.
- Baxter I, Brazelton JN, Yu D, Huang YS, Lahner B, Yakubova E, Li Y, Bergelson J, Borevitz JO, Nordborg M, Vitek O, Salt DE. 2010. A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter *AtHKT1;1*. *PLoS Genet* 6, e1001193.
- Becker A, Katzen F, Puhler A, Ielpi L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 145-152.

- Bender CL, Malvick DK, Mitchell RE. 1989. Plasmid-mediated production of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J Bacteriol* 171, 807-812.
- Bender CL, Palmer DA, Penaloza-Vazquez A, Rangaswamy V, Ullrich M. 1998. Biosynthesis and regulation of coronatine, a non-host-specific phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Subcell Biochem* 29, 321-341.
- Bergmann D, Furth G, Mayer C. 2008. Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. *Int J Biol Macromol* 43, 245-251.
- Bertani. 1952. Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*, 293-300.
- Bestwick CS, Bennett MH, Mansfield JW. 1995. Hrp Mutant of *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola Induces Cell Wall Alterations but Not Membrane Damage Leading to the Hypersensitive Reaction in Lettuce. *Plant Physiol* 108, 503-516.
- Bhagwat AA, Mithofer A, Pfeffer PE, Kraus C, Spickers N, Hotchkiss A, Ebel J, Keister DL. 1999. Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1-->3)-beta-glucosyl. *Plant Physiol* 119, 1057-1064.
- Bittel P, Robatzek S. 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 10, 335-341.
- Bohin JP. 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 186, 11-19.
- Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379-406.
- Bonomi HR, Posadas DM, Paris G, Carrica Mdel C, Frederickson M, Pietrasanta LI, Bogomolni RA, Zorreguieta A, Goldbaum FA. 2012. Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12135-12140.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J. 2010. Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature* 464, 418-422.
- Bouwmeester K, Govers F. 2009. Arabidopsis L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles. *J Exp Bot* 60, 4383-4396.
- Brachi B, Faure N, Horton M, Flahauw E, Vazquez A, Nordborg M, Bergelson J, Cuguen J, Roux F. 2010. Linkage and association mapping of Arabidopsis thaliana flowering time in nature. *PLoS Genet* 6, e1000940.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* 45, 113-122.
- Brooks DM, Hernandez-Guzman G, Kloek AP, Alarcon-Chaidez F, Sreedharan A, Rangaswamy V, Penaloza-Vazquez A, Bender CL, Kunkel BN. 2004. Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 162-174.
- Caarls L, Pieterse CM, Van Wees SC. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front Plant Sci* 6, 170.
- Cadmus MC, Rogovin SP, Burton KA, Pittsley JE, Knutson CA, Jeanes A. 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can J Microbiol* 22, 942-948.
- Camanes G, Pastor V, Cerezo M, Garcia-Andrade J, Vicedo B, Garcia-Agustin P, Flors V. 2012. A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiol* 158, 1054-1066.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X. 1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63.

- Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Gunther T, Bender S, Fitz J, Koenig D, Lanz C, Stegle O, Lippert C, Wang X, Ott F, Muller J, Alonso-Blanco C, Borgwardt K, Schmid KJ, Weigel D. 2011. Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nat Genet* 43, 956-963.
- Capage, M. A., Doherty, D. H., Betlach, M. R., & Vanderslice, R. W. 1987. Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum. *International patent application W*, 87.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. 2009. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323, 95-101.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18, 465-476.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500.
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD. 1999. Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286, 2517-2520.
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J. 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol Plant* 1, 423-445.
- Desclos-Theveniau M, Arnaud D, Huang TY, Lin GJ, Chen WY, Lin YC, Zimmerli L. 2012. The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PLoS Pathog* 8, e1002513.
- Desikan R, Cheung M, Clarke A, Golding S, Sagi M, Fluhr R, Rock C, Hancock J, Neill S. 2004. Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Functional Plant Biology* 31, 913-920.
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S. 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16314-16318.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2225-2245.
- Drerup MM, Schlucking K, Hashimoto K, Manishankar P, Steinhorst L, Kuchitsu K, Kudla J. 2013. The Calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. *Mol Plant* 6, 559-569.
- Du L, Chen Z. 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J* 24, 837-847.
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8744-8749.
- Ellis C, Turner JG. 2002. A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* 215, 549-556.
- Enrique R, Siciliano F, Favaro MA, Gerhardt N, Roeschlin R, Rigano L, Sendin L, Castagnaro A, Vojnov A, Marano MR. 2011. Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnol J* 9, 394-407.
- Erbs G, Silipo A, Aslam S, De Castro C, Liparoti V, Flagiello A, Pucci P, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A, Newman MA, Cooper RM. 2008. Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem Biol* 15, 438-448.
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou JM. 2012. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* 485, 114-118.

- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG. 1994. Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* 6, 751-759.
- Flemming. 1993. Biofilms and environmental protection. *Water Science Technology* 27, 1-10.
- Frederik Leyns MDC, Jean-Guy Swings, Jozef De Ley. 1984. The host range of the genus Xanthomonas. *The Botanical Review* 50, 308-356.
- Fu ZQ, Dong X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64, 839-863.
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228-232.
- Fujikawa T, Sakaguchi A, Nishizawa Y, Kouzai Y, Minami E, Yano S, Koga H, Meshi T, Nishimura M. 2012. Surface alpha-1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLoS Pathog* 8, e1002882.
- Gao XQ, Li CG, Wei PC, Zhang XY, Chen J, Wang XC. 2005. The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiol* 139, 1207-1216.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 711-724.
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR. 2003. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11116-11121.
- Gehring CA, Irving HR, McConchie R, Parish RW. 1997. Jasmonates Induce Intracellular Alkalinization and Closure of *Paphiopedilum* Guard Cells. *Annals of Botany* 80, 485-489.
- Geng X, Cheng J, Gangadharan A, Mackey D. 2012. The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense. *Plant Cell* 24, 4763-4774.
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernandez-Barbero G, Chini A, Rathjen JP, Solano R. 2014. The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in Arabidopsis. *PLoS Biol* 12, e1001792.
- Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Ntoukakis V, Petutschnig E, Lipka V, Rathjen JP. 2009a. AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* 19, 423-429.
- Gimenez-Ibanez S, Ntoukakis V, Rathjen JP. 2009b. The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* 4, 539-541.
- Gohre V, Jones AM, Sklenar J, Robatzek S, Weber AP. 2012. Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 1083-1092.
- Gohre V, Spallek T, Haweker H, Mersmann S, Mentzel T, Boller T, de Torres M, Mansfield JW, Robatzek S. 2008. Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* 18, 1824-1832.
- Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T. 2001. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1155-1163.
- Gomez-Gomez L, Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* 5, 1003-1011.
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 18, 277-284.
- Gottwald TR, Sun X, Riley T, Graham JH, Ferrandino F, Taylor EL. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology* 92, 361-377.
- Gough C, Cullimore J. 2011. Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 867-878.
- Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch W, Hetherington AM. 2000. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* 408, 713-716.

- Gudesblat GE, Iusem ND, Morris PC. 2007. Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol* 173, 713-721.
- Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA. 2009. Xanthomonas campestris overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol* 149, 1017-1027.
- Guimaraes RL, Stotz HU. 2004. Oxalate production by Sclerotinia sclerotiorum deregulates guard cells during infection. *Plant Physiol* 136, 3703-3711.
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Gotz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nurnberger T. 2007. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282, 32338-32348.
- Hann DR, Rathjen JP. 2007. Early events in the pathogenicity of Pseudomonas syringae on Nicotiana benthamiana. *Plant J* 49, 607-618.
- Hashimoto W, Miki H, Tsuchiya N, Nankai H, Murata K. 1998. Xanthan lyase of Bacillus sp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from xanthan side chains. *Appl Environ Microbiol* 64, 3765-3768.
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12217-12222.
- Hetherington AM, Woodward FI. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901-908.
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146 (Pt 10), 2395-2407.
- Heyward. 1993. The hosts of Xanthomonas. In: J. G. Swings ELC, ed.
- Hirai H, Takai R, Iwano M, Nakai M, Kondo M, Takayama S, Isogai A, Che FS. 2011. Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by Acidovorax avenae flagellin. *J Biol Chem* 286, 25519-25530.
- Hohmann N, Schmickl R, Chiang TY, Lucanova M, Kolar F, Marhold K, Koch MA. 2014. Taming the wild: resolving the gene pools of non-model Arabidopsis lineages. *BMC Evol Biol* 14, 224.
- Horton MW, Hancock AM, Huang YS, Toomajian C, Atwell S, Auton A, Mulyati NW, Platt A, Sperone FG, Vilhjalmsson BJ, Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J. 2012. Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide Arabidopsis thaliana accessions from the RegMap panel. *Nat Genet* 44, 212-216.
- Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y. 2011. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiol* 156, 430-438.
- I. A. Vos CMJPaCMvW. 2013. Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathology* 62(S1), 43-55.
- Inon de Iannino N, Briones G, Tolmasky M, Ugalde RA. 1998. Molecular cloning and characterization of cgs, the Brucella abortus cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of Rhizobium meliloti ndvB and Agrobacterium tumefaciens chvB mutants. *J Bacteriol* 180, 4392-4400.
- Ishiga Y, Uppalapati SR, Ishiga T, Elavarthi S, Martin B, Bender CL. 2009. Involvement of coronatine-inducible reactive oxygen species in bacterial speck disease of tomato. *Plant Signal Behav* 4, 237-239.
- Jansson PE, Kenne L, Lindberg B. 1975. Structure of extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris. *Carbohydr Res* 45, 275-282.
- Jeong HJ, Kim YJ, Kim SH, Kim YH, Lee IJ, Kim YK, Shin JS. 2011. Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. *Plant Cell Physiol* 52, 2147-2156.
- Jiao Y, Sun L, Song Y, Wang L, Liu L, Zhang L, Liu B, Li N, Miao C, Hao F. 2013. AtrbohD and AtrbohF positively regulate abscisic acid-inhibited primary root growth by affecting Ca²⁺ signalling and auxin response of roots in Arabidopsis. *J Exp Bot* 64, 4183-4192.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C. 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol* 56, 1472-1480.
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, Zipfel C. 2014. Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell* 54, 43-55.
- Kakkar A, Nizampatnam NR, Kondreddy A, Pradhan BB, Chatterjee S. 2015. Xanthomonas campestris cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. *J Exp Bot*.
- Kalde M, Barth M, Somssich IE, Lippok B. 2003. Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 295-305.
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Pühler A, Ielpi L. 1998. Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J. Bacteriology* 180, 1607-1617.
- Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjuler CT, Gysel K, Muszynski A, Carlson RW, Thygesen MB, Sandal N, Asmussen MH, Vinther M, Andersen SU, Krusell L, Thirup S, Jensen KJ, Ronson CW, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J. 2015. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523, 308-312.
- Khokon AR, Okuma E, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y. 2011. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 34, 434-443.
- Khokon MA, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y. 2010. Yeast elicitor-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 51, 1915-1921.
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19, 1065-1080.
- Koch MA, Matschinger M. 2007. Evolution and genetic differentiation among relatives of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6272-6277.
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol* 128, 1046-1056.
- Kohler B, Hills A, Blatt MR. 2003. Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol* 131, 385-388.
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MR. 2014. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* 203, 44-62.
- Kool MM, Schols HA, Delahaije RJ, Sworn G, Wierenga PA, Gruppen H. 2013. The influence of the primary and secondary xanthan structure on the enzymatic hydrolysis of the xanthan backbone. *Carbohydr Polym* 97, 368-375.
- Koplin R, Arnold W, Hotte B, Simon R, Wang G, Puhler A. 1992. Genetics of xanthan production in Xanthomonas campestris: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J Bacteriol* 174, 191-199.
- 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.
- Kraiselburd I, Alet AI, Tondo ML, Petrocelli S, Daurelio LD, Monzon J, Ruiz OA, Losi A, Orellano EG. 2012. A LOV protein modulates the physiological attributes of Xanthomonas axonopodis pv. citri relevant for host plant colonization. *PLoS One* 7, e38226.
- Kramer U. 2015. Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana. *Elife* 4.

- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KA, Becker D, Hedrich R. 2010. Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J Biol Chem* 285, 13471-13479.
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J* 22, 2623-2633.
- Laroche FJ, Tulotta C, Lamers GE, Meijer AH, Yang P, Verbeek FJ, Blaise M, Stougaard J, Spaik HP. 2013. The embryonic expression patterns of zebrafish genes encoding LysM-domains. *Gene Expr Patterns* 13, 212-224.
- Lee S, Ishiga Y, Clermont K, Mysore KS. 2013. Coronatine inhibits stomatal closure and delays hypersensitive response cell death induced by nonhost bacterial pathogens. *PeerJ* 1, e34.
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S. 2009. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21419-21424.
- Leon-Reyes A, Van der Does D, De Lange ES, Delker C, Wasternack C, Van Wees SC, Ritsema T, Pieterse CM. 2010. Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232, 1423-1432.
- Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, Chen S, Zhou JM. 2014. The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329-338.
- Li Y, Huang Y, Bergelson J, Nordborg M, Borevitz JO. 2010. Association mapping of local climate-sensitive quantitative trait loci in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21199-21204.
- Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, Kang C, Qiu J, Stacey G. 2013. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* 341, 1384-1387.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lim CW, Luan S, Lee SC. 2014. A prominent role for RCAR3-mediated ABA signaling in response to Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 infection in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 55, 1691-1703.
- Lin W, Li B, Lu D, Chen S, Zhu N, He P, Shan L. 2014. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3632-3637.
- Long Q, Rabanal FA, Meng D, Huber CD, Farlow A, Platzer A, Zhang Q, Vilhjalmsen BJ, Korte A, Nizhynska V, Voronin V, Korte P, Sedman L, Mandakova T, Lysak MA, Seren U, Hellmann I, Nordborg M. 2013. Massive genomic variation and strong selection in Arabidopsis thaliana lines from Sweden. *Nat Genet* 45, 884-890.
- Lopez-Gomez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T. 2012. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in Lotus japonicus. *J Exp Bot* 63, 393-401.
- Loubens I, Debarbieux L, Bohin A, Lacroix JM, Bohin JP. 1993. Homology between a genetic locus (mdoA) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in Escherichia coli and a genetic locus (hrpM) controlling pathogenicity of Pseudomonas syringae. *Mol Microbiol* 10, 329-340.
- Lugtenberg. 2015. Principles of Plant-Microbe Interactions. In: Lugtenberg, ed: Springer.
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 183-193.
- Ma, S. W., Morris, V. L., & Cuppels, D. A. 1991. Characterization of a DNA region required for production of the phytotoxin coronatine by Pseudomonas syringae pv. tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4, 69-74.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064-1068.
- Macho AP, Boutrot F, Rathjen JP, Zipfel C. 2012. Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant Physiol* 159, 1845-1856.

- Macho AP, Zipfel C. 2015. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol* 23, 14-22.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425, 637-640.
- Malamud F, Conforte VP, Rigano LA, Castagnaro AP, Marano MR, Morais do Amaral A, Vojnov AA. 2012. HrpM is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Mol Plant Pathol* 13, 1010-1018.
- Malamud F, Torres PS, Roeschlin R, Rigano LA, Enrique R, Bonomi HR, Castagnaro AP, Marano MR, Vojnov AA. 2011. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* 157, 819-829.
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S. 2011. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1639-1653.
- Martirosyan A, Perez-Gutierrez C, Banchereau R, Dutartre H, Lecine P, Dullaers M, Mello M, Salcedo SP, Muller A, Leserman L, Levy Y, Zurawski G, Zurawski S, Moreno E, Moriyon I, Klechevsky E, Banchereau J, Oh S, Gorvel JP. 2012. Brucella beta 1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells. *PLoS Pathog* 8, e1002983.
- Masle J, Gilmore SR, Farquhar GD. 2005. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* 436, 866-870.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.
- Melton LD, Mindt L, Rees DA, Sanderson GR. 1976. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydr Res* 46, 245-257.
- Mino Y, Matsushita Y, Sakai R. 1987. Effect of coronatine on stomatal opening in leaves of broadbean and Italian ryegrass. *Jpn. J. Phytopathol.* 53, 53-55.
- Minsavage GV, Mudgett MB, Stall RE, Jones JB. 2004. Importance of *opgHXcv* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 152-161.
- Mishina TE, Zeier J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* 50, 500-513.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19613-19618.
- Monaghan J, Zipfel C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 15, 349-357.
- Montillet JL, Leonhardt N, Mondy S, Tranchimand S, Rumeau D, Boudsocq M, Garcia AV, Douki T, Bigeard J, Lauriere C, Chevalier A, Castresana C, Hirt H. 2013. An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 11, e1001513.
- Murashige T, & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J. 2001. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca(2+) channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13, 2513-2523.
- Murga R, Stewart PS, Daly D. 1995. Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnol Bioeng* 45, 503-510.

- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J. 2002. Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14, 3089-3099.
- Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, Yazaki K, Aoki T, Shibuya N, Kouchi H. 2011. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 65, 169-180.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135, 1113-1128.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 128, 13-16.
- Nicaise V, Joe A, Jeong BR, Korneli C, Boutrot F, Westedt I, Staiger D, Alfano JR, Zipfel C. 2013. Pseudomonas HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *EMBO J* 32, 701-712.
- Nuhse TS, Bottrill AR, Jones AM, Peck SC. 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J* 51, 931-940.
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198, 249-266.
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M, Kuchitsu K. 2008. Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem* 283, 8885-8892.
- Okada M, Ito S, Matsubara A, Iwakura I, Egoshi S, Ueda M. 2009. Total syntheses of coronatines by exo-selective Diels-Alder reaction and their biological activities on stomatal opening. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7, 3065-3073.
- Oldroyd GE, Downie JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59, 519-546.
- Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D. 2008. Sequencing of natural strains of Arabidopsis thaliana with short reads. *Genome Res* 18, 2024-2033.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068-1071.
- Parkinson N, Cowie C, Heeney J, Stead D. 2009. Phylogenetic structure of Xanthomonas determined by comparison of gyrB sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 264-274.
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731-734.
- Pel MJ, van Dijken AJ, Bardoel BW, Seidl MF, van der Ent S, van Strijp JA, Pieterse CM. 2014. Pseudomonas syringae evades host immunity by degrading flagellin monomers with alkaline protease AprA. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 603-610.
- Penalzo-Vazquez A, Sreedharan A, Bender CL. 2010. Transcriptional studies of the hrpM/opgH gene in Pseudomonas syringae during biofilm formation and in response to different environmental challenges. *Environ Microbiol* 12, 1452-1467.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 489-521.

- Posadas DM, Ruiz-Ranwez V, Bonomi HR, Martin FA, Zorreguieta A. 2012. BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cell Microbiol* 14, 965-982.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585-592.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15, 395-401.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339, 62-66.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol* 7, 602-609.
- Ren D, Liu Y, Yang KY, Han L, Mao G, Glazebrook J, Zhang S. 2008. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5638-5643.
- Rigano LA, Payette C, Brouillard G, Marano MR, Abramowicz L, Torres PS, Yun M, Castagnaro AP, Oirdi ME, Dufour V, Malamud F, Dow JM, Bouarab K, Vojnov AA. 2007a. Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell* 19, 2077-2089.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendin L, Filippone P, Torres PS, Questa J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, Marano MR. 2007b. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 1222-1230.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC. 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 837-858.
- Roelfsema MR, Hedrich R. 2005. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* 167, 665-691.
- Ruijsenaars HJ, de Bont JA, Hartmans S. 1999. A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. *Appl Environ Microbiol* 65, 2446-2452.
- Salinas SR, Bianco MI, Barreras M, Ielpi L. 2011. Expression, purification and biochemical characterization of GumI, a monotopic membrane GDP-mannose:glycolipid 4- β -D-mannosyltransferase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Glycobiology* 21, 903-913.
- Sato M, Tsuda K, Wang L, Coller J, Watanabe Y, Glazebrook J, Katagiri F. 2010. Network modeling reveals prevalent negative regulatory relationships between signaling sectors in *Arabidopsis* immune signaling. *PLoS Pathog* 6, e1001011.
- Savchenko T, Kolla V, Wang CQ, Nasafi Z, Hicks D, Phadungchob B, Chehab W, Brandizzi F, Froehlich J, Dehesh K. 2014. Functional convergence of oxylipin and ABA pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol* 164, 1151-1160.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Urich MA, Nery JR, Pelizzola M, Libiger O, Alix A, McCosh RB, Chen H, Schork NJ, Ecker JR. 2013. Patterns of population epigenomic diversity. *Nature* 495, 193-198.
- Schneeberger K, Ossowski S, Ott F, Klein JD, Wang X, Lanz C, Smith LM, Cao J, Fitz J, Warthmann N, Henz SR, Huson DH, Weigel D. 2011. Reference-guided assembly of four diverse *Arabidopsis thaliana* genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10249-10254.
- Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D. 2010. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem* 285, 9444-9451.
- Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, Zipfel C. 2011. Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet* 7, e1002046.
- Segarra G, Jauregui O, Casanova E, Trillas I. 2006. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry* 67, 395-401.

- Segonzac C, Feike D, Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Zipfel C, Rathjen JP. 2011. Hierarchy and roles of pathogen-associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 156, 687-699.
- Segonzac C, Zipfel C. 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14, 54-61.
- Sherwood MT. 1970. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J Appl Bacteriol* 33, 708-713.
- Simonsen KL, Churchill GA, Aquadro CF. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics* 141, 413-429.
- Singh P, Kuo YC, Mishra S, Tsai CH, Chien CC, Chen CW, Desclos-Theveniau M, Chu PW, Schulze B, Chinchilla D, Boller T, Zimmerli L. 2012. The lectin receptor kinase-VI.2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Plant Cell* 24, 1256-1270.
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Kwak JM. 2009a. Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* 583, 2982-2986.
- Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J. 2009b. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *J Exp Bot* 60, 1439-1463.
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR. 2005. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* 43, 520-529.
- Song S, Qi T, Wasternack C, Xie D. 2014. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Curr Opin Plant Biol* 21, 112-119.
- Speth EB, Melotto M, Zhang W, Assmann SM, He SY. 2009. *Signal Crosstalk in Plant Stress Responses*: Wiley-Blackwell, 96-112.
- Strange RN. 2007. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Nat Prod Rep* 24, 127-144.
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* 134, 1536-1545.
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF. 2006. Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* 18, 764-779.
- Swartz TE, Tseng TS, Frederickson MA, Paris G, Comerchi DJ, Rajashekara G, Kim JG, Mudgett MB, Splitter GA, Ugalde RA, Goldbaum FA, Briggs WR, Bogomolni RA. 2007. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317, 1090-1093.
- Swings JGC, E. L. 1993. *Xanthomonas*. In: Swings JGC, E. L., ed.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tanaka K, Nguyen CT, Liang Y, Cao Y, Stacey G. 2013. Role of LysM receptors in chitin-triggered plant innate immunity. *Plant Signal Behav* 8, e22598.
- Tateda C, Zhang Z, Shrestha J, Jelenska J, Chinchilla D, Greenberg JT. 2014. Salicylic acid regulates *Arabidopsis* microbial pattern receptor kinase levels and signaling. *Plant Cell* 26, 4171-4187.
- Ton J, Mauch-Mani B. 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J* 38, 119-130.
- Torres MA, Dangl JL. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8, 397-403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. 2002. *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 517-522.

- Torres MA, Jones JD, Dangl JL. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 37, 1130-1134.
- Torres PS, Malamud F, Rigano LA, Russo DM, Marano MR, Castagnaro AP, Zorreguieta A, Bouarab K, Dow JM, Vojnov AA. 2007. Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol* 9, 2101-2109.
- Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F. 2008a. The interplay between MAMP and SA signaling. *Plant Signal Behav* 3, 359-361.
- Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD, Katagiri F. 2008b. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* 53, 763-775.
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL. 2007. The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 955-965.
- Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang YS, Lindgren O, Salojarvi J, Loog M, Kangasjarvi J, Kollist H. 2010. Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 62, 442-453.
- Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Korbes AP, Memelink J, Ritsema T, Van Wees SC, Pieterse CM. 2013. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* 25, 744-761.
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, Abuqamar S, Chen X, Salmeron J, Dietrich RA, Hirt H, Mengiste T. 2006. The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* 18, 257-273.
- Vojnov AA, Slater H, Daniels MJ, Dow JM. 2001. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 768-774.
- Vorholter FJ, Schneiker S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, Patschkowski T, Ruckert C, Schmid J, Sidhu VK, Sieber V, Tauch A, Watt SA, Weisshaar B, Becker A, Niehaus K, Puhler A. 2008. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* 134, 33-45.
- Wan J, Tanaka K, Zhang XC, Son GH, Brechenmacher L, Nguyen TH, Stacey G. 2012. LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 160, 396-406.
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G. 2008. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 471-481.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* 2, e123.
- Wang JBJ, George W, Sundin, Frank White, Saskia Hogenhout, Caroline Roper, Leonardo De La Fuente, and Jong Hyun Ham. 2015. Virulence Mechanisms of Plant-Pathogenic Bacteria. In: Nian Wang JBJ, George W. Sundin, Frank White, Saskia Hogenhout, Caroline Roper, Leonardo De La Fuente, and Jong Hyun Ham ed, 492.
- Wang W, Xie ZP, Staehelin C. 2014. Functional analysis of chimeric lysin motif domain receptors mediating Nod factor-induced defense signaling in *Arabidopsis thaliana* and chitin-induced nodulation signaling in *Lotus japonicus*. *Plant J* 78, 56-69.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J. 2008. An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* 1, 198-217.

- Wasternack C, Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111, 1021-1058.
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman MA, Kolb D, Tsuda K, Katagiri F, Fliegmann J, Bono JJ, Cullimore JV, Jehle AK, Gotz F, Kulik A, Molinaro A, Lipka V, Gust AA, Nurnberger T. 2011. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19824-19829.
- Wolski EA, Maldonado, S., Daleo, G. R., & Andreu, A. B. . 2006. A novel α -1, 3-glucan elicits plant defense responses in potato and induces protection against *Rhizoctonia solani* AG-3 and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*. *Physiological and molecular plant pathology* 69, 93-103.
- Wong JE, Midtgaard SR, Gysel K, Thygesen MB, Sorensen KK, Jensen KJ, Stougaard J, Thirup S, Blaise M. 2015. An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates carbohydrate recognition by an endopeptidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71, 592-605.
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J. 2005. The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA Res* 12, 9-26.
- Wu L, McGrane RS, Beattie GA. 2013. Light regulation of swarming motility in *Pseudomonas syringae* integrates signaling pathways mediated by a bacteriophytochrome and a LOV protein. *MBio* 4, e00334-00313.
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Despres C. 2012. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep* 1, 639-647.
- Xin XF, He SY. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol* 51, 473-498.
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D. 2008. Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283, 26996-27006.
- Xu J, Xie J, Yan C, Zou X, Ren D, Zhang S. 2014. A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *Plant J* 77, 222-234.
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA. 2006. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10104-10109.
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D. 2009. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21, 2220-2236.
- Yin Y, Adachi Y, Ye W, Hayashi M, Nakamura Y, Kinoshita T, Mori IC, Murata Y. 2013. Difference in abscisic acid perception mechanisms between closure induction and opening inhibition of stomata. *Plant Physiol* 163, 600-610.
- Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2015. Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 38, 35-49.
- Yun MH, Torres PS, El Oirdi M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA. 2006. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol* 141, 178-187.
- Zeng W, He SY. 2010. A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in Arabidopsis. *Plant Physiol* 153, 1188-1198.
- Zhang L, Yao J, Withers J, Xin XF, Banerjee R, Fariduddin Q, Nakamura Y, Nomura K, Howe GA, Boland W, Yan H, He SY. 2015. Host target modification as a strategy to counter pathogen hijacking of the jasmonate hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 14354-14359.

- Zhang W, He SY, Assmann SM. 2008. The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant J* 56, 984-996.
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol* 126, 1438-1448.
- Zhang XC, Wu X, Findley S, Wan J, Libault M, Nguyen HT, Cannon SB, Stacey G. 2007. Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiol* 144, 623-636.
- Zhang Y, Du G. 2009. Phosphatidic acid signaling regulation of Ras superfamily of small guanosine triphosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1791, 850-855.
- Zhao Z, Zhang W, Stanley BA, Assmann SM. 2008. Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell* 20, 3210-3226.
- Zheng XY, Spivey NW, Zeng W, Liu PP, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X. 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11, 587-596.
- Zhou Z, Wu Y, Yang Y, Du M, Zhang X, Guo Y, Li C, Zhou JM. 2015. An *Arabidopsis* Plasma Membrane Proton ATPase Modulates JA Signaling and Is Exploited by the *Pseudomonas syringae* Effector Protein AvrB for Stomatal Invasion. *Plant Cell* 27, 2032-2041.
- Zhu D, Chen. 2012. The stomata frontline of plant interaction with the environment-perspectives from hormone regulation. *Frontiers in Biology* 7, 96-112.
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, Jiang Z, Kim JM, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen WQ, Seki M, Zhou JM, Guo H. 2011. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12539-12544.
- Zimmerli L, Jakab G, Metraux JP, Mauch-Mani B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12920-12925.
- Zipfel C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* 35, 345-351.
- Zipfel C, Felix G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* 8, 353-360.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764-767.