



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA UBALDO MONTELATICI

DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE AGRARIE

*CICLO XXII*

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione di Patologia Vegetale  
Settore scientifico disciplinare AGR 012

## **Chiavi Molecolari per la caratterizzazione e la comprensione delle interazioni ospite-patogeno in *Pseudomonas savastanoi***

**Coordinatore del Dottorato :** Ch. mo Prof. Paolo Capretti

**Tutore :** Ch. ma dott.sa Stefania Tegli

**Dottorando :** dott. Matteo Carboneschi

30 Dicembre 2009

## **Dichiarazione**

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'Università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Dott. Matteo Cerboneschi

(30/12/2009)

Una copia della tesi sarà disponibile presso DiBA, sez. Patologia vegetale,

<http://www.diba.unifi.it/>

## **Declaration**

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

Dr. Matteo Cerboneschi

(30/12/2009)

A copy of the thesis will be available at <http://www.diba.unifi.it/>

## RIASSUNTO

### Scopo:

Lo studio del dialogo molecolare ospite-patogeno, in relazione anche alla specificità d'ospite, è stato in assoluto il punto centrale del lavoro svolto durante il triennio di dottorato. La comprensione dei meccanismi di interazione fra questi due organismi, appartenenti a domini differenti, è passata attraverso l'analisi di più chiavi molecolari, selezionate in base ai recenti studi in ambito fitopatologico e non solo, ma soprattutto analizzate all'interno di un approccio integrato che faceva leva sulla contemporanea analisi di più sistemi coinvolti nell'induzione e/o modulazione dei sintomi della malattia.

### Metodi e Risultati:

L'agente causale della malattia denominata "Rogna" dell'Olivio appartiene alla specie batterica fitopatogena *Pseudomonas savastanoi*, un microrganismo Gram-negativo, aerobio e asporigeno di cui fanno parte le pathovar *savastanoi* (*Pss*), *nerii* (*Psn*) e *fraxini* (*Psf*), rispettivamente isolate da Olivio, Oleandro e Frassino, le quali sono state oggetto di studio del presente lavoro. L'ospite-specificità è stata il filo conduttore delle ricerche effettuate nella presente tesi, sia considerando che non è mai stato finora definitivamente accertato quale sia la reale cerchia d'ospite delle suddette pathovar per mancanza di adeguati strumenti analitici, che tenendo conto della tipica sintomatologia da queste indotta, che è di tipo iperplastico nel caso di *Pss* e *Psn* mentre è di tipo esclusivamente necrotico nel caso di *Psf*.

La convinzione che vi fossero una o più chiavi molecolari per la comprensione dell'ospite-specificità è stata confermata dall'osservazione dei profili f-AFLP, analizzati su elettroforesi capillare, che hanno permesso di raggruppare le tre pathovar in cluster distinti, in base all'organizzazione del loro genoma. La naturale prosecuzione della caratterizzazione molecolare via f-AFLP di una vasta collezione di isolati di *P. savastanoi* è stata l'allestimento di protocolli diagnostici molecolari pathovar-specifici, capaci di discriminare e quantizzare i singoli ceppi appartenenti alle diverse pathovar di questo batterio in End Point e Real Time PCR, sia con SYBR Green® che con sonde TaqMan®. Questo tipo di approccio multi-livello si è concretizzato nella realizzazione di un utilissimo e versatile "tool", finora non disponibile, applicabile sia per l'identificazione degli isolati di *P. savastanoi* *in vitro* che per il loro rilevamento e la loro quantizzazione su materiale vegetale sintomatico e asintomatico, adattandosi di volta in volta alle indagini da intraprendere ed alla disponibilità di strumentazioni che di competenze. Sicuramente tali protocolli identificativi molecolari pathovar-specifici sono lo strumento che mancava per indagini epidemiologiche volte a

definire inequivocabilmente la distribuzione in natura delle pathovar *Pss*, *Psn* e *Psf* sui diversi ospiti vegetali.

Il ruolo svolto all'interno del processo patogenetico dai Sistemi di Secrezione, con particolare attenzione al Tipo III, oramai ampiamente studiato, e al Tipo IV, in parte sconosciuto e di grande interesse ed attualità proprio in questi ultimi anni, è stato il primo obiettivo che ci siamo posti per portare un contributo alla comprensione di questo dialogo inter-dominio tra *P. savastanoi* ed i suoi ospiti, sul quale veramente poco era noto. Sullo stesso livello ed altrettanto importanti sono stati gli studi effettuati sui sistemi di regolazione genica controllati dal “quorum sensing”, un fine meccanismo molecolare di controllo dell'espressione genica attraverso il quale i batteri, normalmente appartenenti alla stessa specie, riescono a comunicare tra di loro. Il dialogo, in questo caso intra-dominio, è elemento indispensabile per la coordinazione dei comportamenti che le comunità batteriche assumono in funzione della maggiore probabilità di raggiungere un obiettivo condiviso.

In tale tesi, oltre ad individuare e sequenziare il cluster genico del Sistema di Secrezione di Tipo IV, è stata dimostrata la sua localizzazione a livello plasmidico, congiuntamente ad altri apparati coinvolti nello sviluppo e/o nella modulazione dei sintomi della malattia. Ciò ha confermato come i plasmidi, questi elementi mobili del genoma batterico, costituiscano una risorsa spesso determinante per lo sviluppo e la sopravvivenza della specie, soprattutto in condizione di elevata pressione selettiva da parte dell'ambiente esterno. Il sequenziamento del “pull” indigeno di alcuni di questi plasmidi ha permesso di incrementare le conoscenze relativamente ai meccanismi molecolari utilizzati dal batterio *P. savastanoi*, fino ad oggi quasi completamente sconosciuti, nello sviluppo del fenomeno patogenetico e suggerisce ipotesi interessanti ed innovative al riguardo dell'ospite-specificità delle sue pathovar.

### **Lavori correlati alla Tesi**

SISTO A, MG CIPRIANI, S TEGLI, **M CERBONESCHI**, G STEA and E SANTILLI (2007). Genetic characterization by fluorescent AFLP of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strain isolated from different host species. *Plant Pathology*. **56**: 366-372.

1. Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovar by End Point and Real Time PCR (*BMC Microbiology*).
2. Genomic and functional characterization of the Type IV Secretion System in *Pseudomonas savastanoi* (*BMC Microbiology*).

## ABSTRACT

### Aims:

In this work some molecular keys were newly developed with the specific aim to give a contribution to understand the molecular dialogue this bacterium has with its potential hosts and into its population, in order to cause disease and to survive in the environment.

### Methods and Results:

*Pseudomonas savastanoi*, the causal agent of “Olive knot disease”, is a Gram-negative bacterium, aerobic and asporigen and its pathovars *savastanoi* (*Pss*), *nerii* (*Psn*) and *fraxini* (*Psf*), isolated from Olive, Oleander and Ash, respectively, are the subject of the present study. In this work the host-specificity and the host-range of these pathovars were taken into account, not only to understand the different and typical symptomatology they caused (hyperplastic with *Pss* and *Psn*, while necrotic with *Psf*), but also because about nothing is yet known about their natural distribution on the different hosts, for the lack of appropriate investigation tools until now.

By f-AFLP it was possible to establish the genetic diversity of 71 isolates of *P. savastanoi* belonging to the three different pathovars. Moreover according to their genomic organization, distinct clusters were obtained, strictly corresponding to their taxonomic distribution. As a natural consequence of this work, pathovar-specific molecular diagnostic protocols were developed, for the differentiation and quantization of isolates belonging to *Pss*, *Psn* and *Psf*, both *in vitro* and on vegetable symptomatic and asymptomatic materials, also in multiplex reactions. These assays are part of an innovative global diagnostic tool, based on End Point PCR and SYBR Green® - TaqMan® Real Time PCR, that is extremely versatile because able to answer to the needs of any phytopathological lab, in terms of research and diagnostic, according to the purposes of the work and the instrumentations and the skills available. Moreover these pathovar-specific tests are essential for epidemiological investigations that aim to unequivocally assess the real host-range in nature of *Pss*, *Psn* and *Psf*, and if cross-infections occur.

The role played by the so called “Type Three Secretion System” (TTSS) in the pathogenesis caused by bacteria is already well known, while information concerning the involvement in these processes of “Type Four Secretion System” (TFSS) is still poor but of great interest in the last few years. A genomic and functional analysis was carried out on the TTSS of *Pss*, *Psn* and *Psf*, while for the first time the TFSS was here identified and then studied with genomic approach, both to define its organization and its expression in the three *P.*

*savastanoi* pathovars. This work on the inter-domain dialogue between *P. savastanoi* and its hosts was accompanied by a similar study on the intra-domain dialogue *P. savastanoi* has into its population, where nothing was known until now. In particular a “quorum sensing” system was identified and studied in the three pathovars of *P. savastanoi*, demonstrated to finely regulate the expression of specific genes in order to coordinate the population behaviour to maximize the probability to achieve the goal to infect the potential host.

Moreover many genes putatively involved in the its interaction with plants, to cause disease and to modulate the symptoms, were discovered to be located on some *P. savastanoi* plasmids, together with TFSS cluster, to confirm the extreme importance of these mobile elements of bacterial genomes. The sequencing of these plasmids was essential to increase the knowledge about the molecular mechanisms and the arsenal used by *P. savastanoi* in its communication with plants, about which information were very poor until now and it suggested innovative hypothesis about molecular basis of *P. savastanoi* pathovars host-range.

#### **Papers related to the Thesis:**

SISTO A, MG CIPRIANI, S TEGLI, **M CERBONESCHI**, G STEA and E SANTILLI (2007). Genetic characterization by fluorescent AFLP of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strain isolated from different host species. *Plant Pathology*. **56**: 366-372.

1. Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovar by End Point and Real Time PCR (*BMC Microbiology*).
2. Genomic and functional characterization of the Type IV Secretion System in *Pseudomonas savastanoi* (*BMC Microbiology*).

# Indice

## Introduzione

<u>Sezione 1</u>	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	1
<u>Sezione 2</u>	I Sistemi di Secrezione	9
<u>Sezione 3</u>	I Sistemi di Comunicazione fra Batteri	22
<u>Sezione 4</u>	Plasmidi: Genoma Plastico	25

<b>Scopo del Lavoro</b>		35
-------------------------	--	----

## Risultati

<u>Capitolo 1</u>	Caratterizzazione molecolare pathovar-specifica di isolati batterici afferenti alla specie <i>P. savastanoi</i> [Articolo 1] .....	39
<u>Capitolo 2</u>	Sonde diagnostiche molecolari per il riconoscimento delle pathovar di <i>P. savastanoi</i> via End point e Real Time PCR [Articolo 2] .....	41
<u>Capitolo 3</u>	Il Sistema di Secrezione di Tipo III in <i>P. savastanoi</i> .....	43
<u>Capitolo 4</u>	Caratterizzazione genomica e funzionale del Sistema di Secrezione di Tipo IV in <i>P. savastanoi</i> [Articolo 3] .....	55
<u>Capitolo 5</u>	Il Sistema di “Quorum Sensing” in <i>P. savastanoi</i> .....	75
<u>Capitolo 6</u>	Sequenziamento di sei plasmidi indigeni in <i>P. savastanoi</i> pv. <i>nerii</i> .....	97

<b>Discussione</b>		117
--------------------	--	-----

<b>Materiali e Metodi</b>		121
---------------------------	--	-----

<b>Bibliografia</b>		149
---------------------	--	-----

<b>Articoli</b>		(in allegato)
-----------------	--	---------------