

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIEROS AGRÓNOMOS



**“BIOPELÍCULAS EN  
*Agrobacterium* spp.”**

**Ana M<sup>a</sup> Abarca Grau**

Directores:

**Dra. María Milagros López González**

**Dra. Ester Marco Noales**

**Dr. Ramón Peñalver Navarro**

**Valencia, Junio de 2011**

**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS**  
Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología



## RESUMEN

Diversas especies del género *Agrobacterium* producen tumores en gran cantidad de plantas cultivadas, causando la enfermedad conocida en inglés como “crown gall”. En esta tesis se ha demostrado que cepas patógenas y no patógenas de las especies *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis* son capaces de formar biopelículas tanto sobre superficies inertes como sobre raíces de tomate. Las cepas de *A. tumefaciens* y *A. vitis* se unieron a poliestireno y polipropileno, mientras que las de *A. rhizogenes* sólo se unieron a polipropileno. Se ha constatado que la formación de biopelículas *in vitro* sobre superficies abióticas en *Agrobacterium* spp. depende de la especie (biovar), la superficie y las condiciones de cultivo. Mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal, utilizando cepas marcadas con GFP, se demostró que las tres especies formaban estructuras complejas compuestas por numerosas células bacterianas dispuestas según alguno de los siguientes modelos: “tapices” densos y continuos, grandes agregados irregulares embebidos en material extracelular, o “setas” globulares atravesadas internamente por canales. Los resultados sugieren que la formación de biopelículas puede estar asociada a la colonización y supervivencia de estas especies bacterianas en la rizosfera. Además, la capacidad del agente de biocontrol *A. rhizogenes* K84 de formar biopelícula durante su interacción con la planta podría ser una característica relevante para el control de la enfermedad. Con el propósito de ahondar y conocer genes implicados en la formación de biopelículas en este agente de biocontrol se han utilizado dos estrategias. Mediante genética clásica, se analizó una librería de mutantes al azar de la cepa K84 y se identificaron

dos mutantes afectados en la formación de biopelícula. Uno fue incapaz de unirse y formar biopelícula sobre polipropileno, pero por el contrario se unió y formó biopelícula sobre ápices radiculares. Este mutante está interrumpido en el gen *wcbD/bexC*, implicado en biosíntesis y transporte de polisacáridos capsulares de tipo 2 en otras bacterias. El otro mutante produjo más biopelícula que la cepa K84, tanto en superficie abiótica como en ápices radiculares. El gen interrumpido en este mutante es el *rkpK*, implicado en la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS) y del polisacárido capsular antígeno K (KPS) descrito en *Rhizobium* spp. El análisis del LPS de este mutante mostró una alteración en la composición del mismo, y reveló que la cepa K84 no produce el polisacárido capsular KPS. Mediante genética reversa, se evaluaron los mutantes *ndvB*, *feuP* y *ctpA* de la cepa K84, previamente seleccionados en un rastreo de mutantes de movilidad en superficie. Los mutantes *ndvB* y *feuP*, implicados en síntesis y regulación del polisacárido  $\alpha$ -1-2-glucano cíclico (GC), y el mutante *ctpA*, implicado en síntesis y/o transporte de exopolisacáridos (EPS), presentaron menor movilidad en superficie y tipo "swimming" (en este segundo caso en medios de baja osmolaridad), menor contenido en hexosas y menor capacidad de formación de biopelículas *in vitro*. En resumen, este estudio muestra que una posible cápsula de la cepa K84 está implicada en interacciones célula-superficie, mientras que componentes del LPS parecen estar implicados en interacciones célula-célula dentro de las biopelículas. Además, los resultados sugieren que el polisacárido GC y los EPS son críticos para la viabilidad en medios de baja osmolaridad, y tienen un importante papel en la movilidad bacteriana y la formación de biopelículas *in vitro* en el agente de control biológico K84. En conjunto, las aportaciones

de esta tesis abren nuevas vías de investigación, tanto sobre la implicación de las biopelículas en la biología y epidemiología de la enfermedad causada por *Agrobacterium* spp., como en los complejos mecanismos de actuación empleados por los agentes bacterianos de control biológico para colonizar el huésped y controlar las enfermedades.



## Resum

Diverses espècies del gènere *Agrobacterium* prodïxen tumors en gran quantitat d'espècies de plantes cultivades, malaltia coneguda en anglès como "crown gall". En aquesta tesis s'ha demostrat que soques bacterianes patògenes i no patògenes de les principals espècies *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* i *A. vitis* són capaços de formar biopel·lícules tant sobre superfícies inerts com en arrels de tomaca. Les soques analitzades de *A. tumefaciens* i *A. vitis* es van unir a poliestirè i polipropilè mentres que *A. rhizogenes* només es va unir a polipropilè. S'ha constatat que la formació de biopel·lícula *in vitro* sobre superfícies abiòtiques depén de l'espècie (biovar), de la superfície i de les condicions de cultiu. Utilitzant microscòpia electrònica de scanning (SEM) i microscòpia confocal, mitjançant soques marcades amb GFP, es va demostrar que les tres espècies formaven estructures complexes compostes per nombroses cèl·lules bacterianes disposades de diverses formes; tapissos densos i continus, grans agregats embeguts en material extracel·lular, o com "bolets" globulars travessats internament per canals. Aquests resultats suggereixen que la formació d'aquestes biopel·lícules pot estar associada a la colonització i supervivència a la rizosfera. A més, la capacitat de l'agent de biocontrol *A. rhizogenes* K84 per a formar biopel·lícules durant la seua

interacció amb la planta, podria ser una característica rellevant per al control de la malaltia. Amb el propòsit d'aprofundir i conèixer gens implicats en la formació de biopel·lícules en aquest agent de biocontrol es van abordar dues estratègies. Mitjançant una estratègia de genètica clàssica, es va analitzar una llibreria de mutants a l'atzar de la soca K84 identificant dos mutants afectats en la formació de biopel·lícula. Un va ser incapaç d'unir-se i formar biopel·lícula sobre polipropilè, però per contra es va unir i formà biopel·lícula sobre àpexs radiculars. Aquest mutant està interromput en el gen *wcbD/bexC*, implicat en biosíntesi i transport de polisacàrids capsulars de tipus 2 en altres bacteris. L'altre mutant va produir més biopel·lícula que la soca K84, tant en superfície abiòtica com en àpexs radiculars. El gen interromput en aquest mutant és el *rkpK*, implicat en la biosíntesi del lipopolisacàrid (LPS) i del polisacàrid capsular antigen K (KPS) descrit en *Rhizobium* spp. L'anàlisi del LPS d'aquest mutant va mostrar una alteració en la seua composició, i va revelar que la soca K84 no produeix el polisacàrid capsular KPS. Mitjançant una altra estratègia de genètica **reversa**, es van avaluar els mutants *ndvB*, *feuP* i *ctpA*, prèviament seleccionats en un rastreig de mutants de mobilitat en superfície en la soca K84. Els mutants *ndvB* i *feuP*, implicats en la síntesi i regulació del polisacàrid  $\beta$ -1,2-glucà cíclic (GC), i el mutant *ctpA*, implicat en la síntesi i/o

transport d'exopolisacàrids (EPS), van presentar menor i) mobilitat en superfície ii) mobilitat tipus "swimming" en medis de baixa osmolaritat iii) contingut en hexoses iv) capacitat de formació de biopel·lícula *in vitro*. En resum, aquest estudi mostra que una possible càpsula de la soca K84 estaria implicada en interaccions cèl·lula-superfície, mentres que components del LPS semblen estar implicats en interaccions cèl·lula-cèl·lula dins de la biopel·lícula. A més, aquests resultats suggereixen que el polisacàrid GC i els EPS són crítics per a la viabilitat en medis de baixa osmolaritat, i tenen un paper important en la mobilitat bacteriana així com en la formació de biopel·lícula *in vitro* en l'agent de control biològic K84. En conjunt, les aportacions d'aquesta tesis obren noves vies d'investigació tant sobre la implicació de la biopel·lícula en la biologia i epidemiologia de la malaltia causada per *Agrobacterium* spp., com en els complexos mecanismes d'actuació emprats pels agents bacterians de biocontrol per colonitzar l'hoste i controlar les malalties.

## Summary

Several species of genus *Agrobacterium* induce tumours in many cultivated plants, causing a disease called crown gall. The results of this thesis show that pathogenic and non-pathogenic strains of the main species *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* are able to form biofilms on both inert surfaces and tomato roots. *A. tumefaciens* and *A. vitis* strains attached to polystyrene and polypropylene, whereas *A. rhizogenes* strains attached only to polypropylene. Thus, in *Agrobacterium* spp., the *in vitro* biofilm formation on abiotic surfaces depends on the species (biovar), the kind of surface and the growth conditions. The three assayed species formed complex structures composed by numerous bacterial cells, as evidenced with scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy, by using GFP-tagged strains. In these structures cells were arranged in several ways: either as dense and continuous carpets, large aggregates embedded in extra-cellular material, or globular “mushrooms” traversed internally by channels. Results suggest that biofilm formation can be associated to colonization and survival in the rhizosphere. Furthermore, the ability of the biocontrol agent *A. rhizogenes* K84 to form biofilms during the interaction with a plant could be a remarkable trait for the control of the disease. The identification of genes involved in biofilm formation in K84 was tackled through two strategies. By a classical genetics strategy, the construction and analysis of a library for random insertional mutagenesis in K84 strain led to the identification of two mutants defective in biofilm formation. One of them was unable to attach and form biofilms on polypropylene, however it attached and

formed biofilms on root tips. This mutant is disrupted in gene *wcbD/bexC*, involved in other bacteria in biosynthesis and transport of type 2 capsular polysaccharides. The other mutant exhibited an enhanced biofilm formation respect to strain K84, both on abiotic surface and root tips. In this case, the disrupted gene is *rkpK*, involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide (LPS) and also of antigen K capsular polysaccharide (KPS) reported in *Rhizobium* spp. The analysis of LPS in this mutant showed an alteration in its composition, revealing that strain K84 does not produce KPS. By reverse genetic strategy, mutants *ndvB*, *feuP* y *ctpA*, previously selected in a surface motility screening of strain K84, were evaluated. Mutants *ndvB* y *feuP*, involved in  $\alpha$ -1-2-glucan cyclic (GC) polysaccharide biosynthesis and regulation, and the mutant *ctpA*, involved in synthesis and/or transport of exopolysaccharides (EPS), showed a reduction in i) surface motility, ii) swimming motility in low osmolarity media, iii) hexose content and iv) biofilm formation *in vitro*. In summary, it seems that a capsule of strain K84 is involved in cell-surface interactions, and LPS components in cell-cell interactions inside biofilms. Moreover, results suggest that the GC polysaccharide and the EPS are critical for viability in low osmolarity media, and have an important role in the bacterial motility and biofilm formation *in vitro* in the biocontrol agent K84. As a whole, this work opens new research lines both on the involvement of biofilms in the biology and epidemiology of the disease caused by *Agrobacterium* spp., and in the complex mechanisms exhibited by bacterial biocontrol agents to colonize hosts and to control the diseases.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>A. <i>Agrobacterium spp.</i> y la enfermedad que causa.</b>	<b>2</b>
<b>A.1. <i>Agrobacterium sp.</i> como bacteria fitopatógica.</b>	<b>2</b>
<b>A.1.1.</b> Antecedentes.	
<b>A.1.2.</b> Taxonomía y nomenclatura.	
<b>A.1.2.1.</b> Clasificación en biovares.	
<b>A.1.3.</b> Características morfológicas, culturales y fisiológicas.	
<b>A.1.4</b> Plásmidos.	
<b>A.1.4.1.</b> Plásmido Ti.	
<b>A.1.5.</b> Opinas.	
<b>A.1.6.</b> Bacteriocinas.	
<b>A.1.7.</b> Genomas secuenciados y filogenia.	
<b>A.1.7.1.</b> <i>A. tumefaciens</i> .	
<b>A.1.7.2.</b> <i>A. rhizogenes</i> .	
<b>A.1.7.3.</b> <i>A. vitis</i> .	
<b>A.2. Proceso de infección de plantas por <i>Agrobacterium spp.</i></b>	<b>19</b>
<b>A.2.1.</b> Reconocimiento de heridas de la planta.	
<b>A.2.2.</b> Unión de la bacteria a la célula vegetal.	
<b>A.2.3.</b> Inducción de la expresión de los genes <i>vir</i> .	
<b>A.2.4.</b> Producción y transferencia del T-ADN a la célula vegetal.	

<b>A.2.5.</b> Integración y expresión de los genes del T-ADN en el genoma de la planta.		
<b>A.3.</b> Enfermedades causadas por <i>Agrobacterium</i> spp.		<b>27</b>
<b>A.3.1.</b> Síntomas.		
<b>A.3.2.</b> Huéspedes.		
<b>A.3.3.</b> Distribución geográfica e importancia económica.		
<b>A.3.4.</b> Métodos de lucha.		
<b>B. Control biológico de la enfermedad.</b>		<b>35</b>
<b>B.1.</b> Control biológico mediante la cepa K84.		<b>35</b>
<b>B.2.</b> Mecanismos implicados en el biocontrol mediante la cepa K84.		<b>35</b>
<b>B.2.1.</b> Agrocina 84.		
<b>B.2.2.</b> Colonización de raíces.		
<b>B.2.3.</b> Otros posibles mecanismos implicados.		
<b>B.3.</b> Desarrollo de una nueva cepa: K1026.		<b>39</b>
<b>B.4.</b> Eficacia comparada K84 vs K1026.		<b>41</b>
<b>B.5.</b> Situación actual del registro y comercialización de las cepas K84 Y k1026		<b>41</b>
<b>C. Biopelículas, polisacáridos y control biológico.</b>		<b>43</b>
<b>C.1.</b> Biopelículas.		<b>43</b>
<b>C.1.1.</b> Definición y generalidades.		
<b>C.1.2.</b> Fases de la formación de una biopelícula.		



C.1.3. Genética de la formación de biopelículas.	
C.1.4. Tipos de biopelículas.	
C.1.5. Factores relacionados con la formación de biopelículas.	
C.1.6. Biopelículas en la rizosfera.	
C.1.7. Biopelículas en <i>A. tumefaciens</i> .	
C.2. Polisacáridos de la envoltura celular bacteriana. . . . .	62
C.2.1. Lipopolisacáridos (LPS).	
C.2.2. Glucanos cíclicos (GC).	
C.2.3. Polisacáridos capsulares (CPS).	
C.2.4. Exopolisacáridos (EPS).	
C.3. Biopelículas y biocontrol. . . . .	74

**OBJETIVOS . . . . . 77**

**CAPÍTULO I. Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as well as on root surfaces. . . . .**

. . . . .	79
Abstract . . . . .	80
Introducción . . . . .	81
Material y Métodos . . . . .	83
Resultados . . . . .	90
Discusión . . . . .	100

## **CAPÍTULO II. Role for *Agrobacterium rhizogenes* K84**

<b>polysaccharides in surface interactions.</b>	<b>107</b>
Abstract	108
Introducción	110
Material y Métodos	113
Resultados	121
Discusión	135

## **CAPÍTULO III. The biocontrol agent *Agrobacterium rhizogenes* K84 requires cyclic $\beta$ -1,2 glucan regulated by a two-component system for proper motility and biofilm formation.**

<b>Abstract</b>	<b>142</b>
<b>Introducción</b>	<b>143</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>146</b>
<b>Resultados</b>	<b>151</b>
<b>Discusión</b>	<b>156</b>

<b>CAPÍTULO IV. The carboxy terminal protease CtpA controls motility and biofilm formation in the biocontrol agent <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K84 through proper exopolysaccharide production..</b>	<b>159</b>
Abstract	160
Introducción	161
Material y Métodos	162
Resultados	168
Discusión	173
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>193</b>

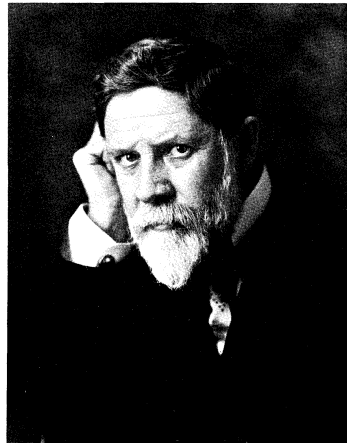
## **Introducción general**

## **A. *Agrobacterium* spp. y la enfermedad que causa.**

### **A.1 *Agrobacterium* sp. como bacteria fitopatógena.**

#### **A.1.1. Antecedentes.**

Desde finales del siglo XIX se conocía la existencia de una enfermedad en plantas dicotiledóneas cuyos síntomas eran la formación de tumores situados en la zona del cuello o en la misma raíz, pero fue en 1907, cuando Erwin F. Smith demostró que esta enfermedad estaba causada por una bacteria del suelo con forma de bastoncillo, a la que se denominó *Bacterium tumefaciens* (Smith y Townsend, 1907). Se conocían ya otras bacterias que provocaban que el tejido vegetal muriera, se marchitara, se pudriera o que causaban manchas en el mismo, pero *A. tumefaciens* tenía la extraña capacidad de hacer que las células vegetales proliferaran y formaran un tumor.



*Erwin F. Smith*

Fue 40 años después cuando el fitopatólogo Armin Braun estudió este fenómeno (White y Braun, 1941), y postuló que las células vegetales del tumor producido por *A. tumefaciens* habrían sido transformadas de forma permanente en células tumorales, debido a algún factor inductor del tumor que habría sido introducido por la bacteria (White y Braun, 1941; White y Braun, 1942). Desde entonces, es bien sabido que *A. tumefaciens*

ha desempeñado un papel importante en los avances realizados en los últimos decenios en el ámbito de la genética vegetal, biología molecular e ingeniería genética de plantas.

### **A.1.2. Taxonomía y nomenclatura.**

La taxonomía de las especies del género *Agrobacterium* ha sido ampliamente estudiada, pero han surgido distintos problemas en la nomenclatura de estas especies debido a que características como la habilidad de inducir tumores y los distintos tipos de tumores producidos, fueron utilizados como parámetros taxonómicos. Fue en 1942, cuando Conn propuso el establecimiento de un nuevo género, al que denominó *Agrobacterium* (Conn, 1942). Dentro de este género, los agentes causantes de tumores se adscribieron a la especie *A. tumefaciens*, los causantes de raíces en cabellera a *A. rhizogenes*, los causantes de tumores en frambueso a *A. rubi*, y los no patógenos a *A. radiobacter* (Young *et al.*, 2001; Farrand *et al.*, 2003). Sin embargo, en la actualidad se sabe que la inducción de tumores y de raíces en cabellera se controlan mediante genes extracromosómicos situados en un plásmido (Zaenen *et al.*, 1974; White y Nester, 1980), y que los plásmidos pueden ser transferidos entre especies del mismo o distinto género. Según esta nomenclatura clásica, una cepa de *A. radiobacter* pasaría a la especie *A. tumefaciens* al adquirir el plásmido Ti (responsable de la inducción de tumores), ya que es el único carácter que las distingue. Por otro lado, se sabe que esta transferencia puede ocurrir tanto en el laboratorio como en la naturaleza (Kerr *et al.*, 1977).

Kerstens y De Ley (1984) propusieron que las características codificadas por plásmidos no deberían ser utilizadas para distinguir especies, y Otten *et al.* (1992), en este mismo sentido, indicaron que sería

preferible usar características cromosómicas. Ha habido distintas propuestas (Young *et al.*, 2001; Farrand *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003), no unánimemente aceptadas, ya que no se dispone todavía de suficientes datos polifásicos para una revisión taxonómica profunda de este género. Actualmente el género *Agrobacterium* se define como aquel que incluye bacterias Gram negativas del suelo, de la subclase *alpha* del *phylum Proteobacteria*, pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, asociadas con plantas pero que no fijan nitrógeno en simbiosis con leguminosas.

#### **A.1.2.1. Clasificación en biovares.**

En los años 70, Keane *et al.* (1970) y Kerr y Panagopoulos (1977) subdividieron las cepas de *Agrobacterium* en tres biovares atendiendo a sus características bioquímicas y fenotípicas. Las características de cada biovar, con algunas modificaciones posteriores (Panagopoulos *et al.*, 1978 y Lippincott *et al.*, 1981), se muestran en la Tabla 1, y se establecieron en función de las temperaturas máximas de crecimiento y de la capacidad para utilizar determinados ácidos orgánicos, polialcoholes e hidratos de carbono.

Esta clasificación permitió a Sawada *et al.* (1993) (corregido por Bouzar (1994)) agrupar a las cepas en tres especies según el biovar al que pertenecían. De este modo, los biovares subieron al rango de especies y se denominó como *A. tumefaciens* a las cepas del biovar 1, *A. rhizogenes* a las del biovar 2 y *A. vitis* a las del biovar 3. Se mantuvieron aparte los aislados de frambueso que se agruparían en la especie *A. rubi*. (Bouzar y Jones, 2001). Cada especie puede contener aislados patógenos y no patógenos y es definida por características codificadas por genes cromosómicos (Young *et al.*, 2001; Farrand *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003). En esta memoria de

tesis se utilizará la nomenclatura más aceptada por los fitopatólogos que es la basada en la clasificación en biovars, y denominaremos a las cepas del biovar 1 como *A. tumefaciens*, a las del biovar 2, como *A. rhizogenes* y a las del biovar 3 como *A. vitis*, independientemente de su capacidad o no para formar tumores o raíces en cabellera.



**Tabla 1.** Características de los biovars 1, 2 y 3 de *Agrobacterium* spp.

Prueba	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3
Detección de 3 ceto lactosa	+	-	+/-
Tolerancia al 2% de NaCl	+	V-	+
Crecimiento a 35°C	+	V-	+/-
Utilización de litmus milk	Alc.	Acid.	Alc.
Producción de ácido a partir de:			
Eritritol	-		-
Etanol	+	-	-
Melecitosa	+	-	-
Producción de álcali a partir de:			
Malonato	V-	V+	+
L-tartrato	V-	+	+
Propionato	V+	-	-
Ácido mícico	-	+	-
Crecimiento en medio selectivos:			
Schroth et al., 1965	+	-	-
New & Kerr. 1971	V-	+	-

Basado en Panagopoulos *et al.*, 1978 y Lippincott *et al.*, 1981).

**Alc.:** Alcalinización.

**Acid.:** Acidificación.

**V:** Variable, siendo la mayoría de los aislados negativos.

**V<sup>+</sup>:** Variable, siendo la mayoría de los aislados positivos..

**+/-:** Positivo o negativo indistintamente.

La mayor parte de las cepas de *Agrobacterium* spp. se pueden encuadrar en alguno de los tres biovares descritos, aunque algunas tienen características intermedias, por lo que se consideran biovares intermedios o podrían formar nuevos biovares. Esto último sería típico de aislados de determinados huéspedes (Holmes y Roberts, 1981; Bell y Ramey, 1991; Sawada y Ieki, 1992; Bouzar *et al.*, 1995; Penyalver *et al.*, 2004). Actualmente se sabe que los biovares 2 (*A. rhizogenes*) y 3 (*A. vitis*) forman grupos genéticos homogéneos, pero sin embargo, el biovar 1 (*A. tumefaciens*) está compuesto por al menos 9 genoma-especies distintas, por tanto posiblemente contendrá más de una especie (Popoff *et al.*, 1984).

### **A.1.3. Características morfológicas, culturales y fisiológicas.**

Todas las cepas de las distintas especies del género *Agrobacterium* spp. incluye bacterias Gram negativas con forma bacilar. Su tamaño oscila entre 0,6- 1µm de ancho y 1,5-3µm de largo. Estas bacterias suelen tener de uno a seis flagelos peritricos, uno de los cuales puede ser subpolar. La longitud de los flagelos suele ser de cuatro a cinco veces la de la célula bacteriana (Lippincott *et al.*, 1981).

La temperatura óptima de desarrollo oscila generalmente entre 25 y 28°C. El crecimiento en agar nutritivo es moderado, y más abundante en medios con extracto de levadura y carbohidratos, como glucosa, sacarosa o lactosa. En general, las colonias son convexas, con bordes redondeados, mucosas, no pigmentadas o de color blanco-beige, con 2-4 mm de diámetro tras 6 días de incubación (Matthysse, 2006). La mayoría de agrobacterias tardan 70-90 min en duplicar su población cuando crecen en medios complejos a 26-27°C en agitación. En medio mínimo con sacarasa y

glutamato tardan 90-120 min (Lippincott y Lippincott, 1969) y en ausencia de glutamato estos tiempos aumentan hasta 180 min (Lippincott *et al.*, 1981).

Las bacterias del género *Agrobacterium* son aerobias, tienen metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor terminal de electrones. Según Kersters y De Ley (1984), algunas cepas son capaces de respirar en condiciones anaerobias en presencia de nitratos, y ciertas cepas podrían crecer bajo reducida presión de oxígeno en tejidos vegetales. Son organismos quimioorganotrofos que utilizan un amplio rango de hidratos de carbono, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de carbono, pero no celulosa, almidón, agar o quitina. Producen reacción ácida en medios minerales con glucosa, galactosa y otros hidratos de carbono (Lippincott *et al.*, 1981).

#### **A.1.4. Plásmidos.**

Los plásmidos suelen estar presentes en la mayor parte de los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, y algunos son de gran tamaño, ya que pueden llegar a constituir el 40% del genoma de algunas cepas. Estos plásmidos juegan un papel muy importante en la interacción de la bacteria con la planta. En un estudio realizado por Albiach y López (1992) con cepas del género *Agrobacterium*, las cepas estudiadas, de diferentes biovars y orígenes, tenían de uno a cinco plásmidos con tamaños comprendidos entre 5 y 1000 Kb.

Algunos ejemplos de actividades codificadas en plásmidos en especies de *Rhizobiaceae* son: genes de transporte de dicarboxilato (Finan *et al.*, 1988; Watson *et al.*, 1988), de síntesis de exopolisacáridos (Finan *et*

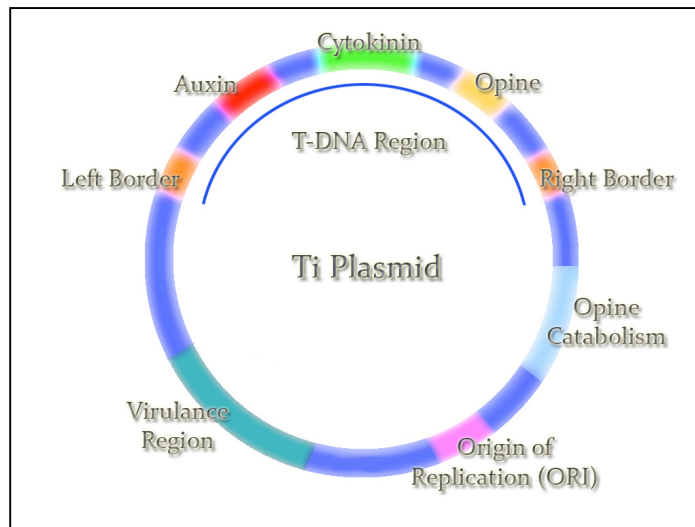
*al.*, 1986), y de lipopolisacáridos (Hynes y McGregor, 1990; Baldani *et al.*, 1992; Brom *et al.*, 1992), de síntesis de tiamina (Finan *et al.*, 1986), de transporte de fosfato y utilización de fosfonato (Bardin *et al.*, 1996), o de síntesis de melanina (Hynes *et al.*, 1988), entre otros.

#### **A.1.4.1. Plásmido Ti.**

Hace ya más de treinta años, se descubría el mecanismo de patogenicidad de *Agrobacterium* spp., basado en el plásmido más característico de este género, el plásmido inductor de tumores (Ti) (Chilton *et al.*, 1977). La mayoría de genes que contiene juegan papeles directos o indirectos en la tumorigénesis. Este plásmido tiene un tamaño entre 150 y 250 Kb (Zaenen *et al.*, 1974; Sciaky *et al.*, 1978; Wood *et al.*, 2001), aunque se han encontrado plásmidos Ti de hasta 500 Kb (Unger *et al.*, 1985). Su composición media en G+C es del 55%, aunque algunos segmentos son más ricos en A-T, como el ADN-T. Se han contabilizado hasta 198 secuencias de lectura abierta (ORFs) y probablemente todas codifican proteínas funcionales (Wood *et al.*, 2001), aunque algunas regiones son todavía desconocidas respecto a su función (Zhu *et al.*, 2000).

Hay una gran diversidad de plásmidos Ti y se clasifican según el tipo de opina que sintetizan en el tumor vegetal. Los más estudiados son los plásmidos de nopalina/agrocinopina (como el pTiC58 de la cepa C58 de *A. tumefaciens*) y los plásmidos de octopina/manopina (como el pTiB6 de la cepa B6 de *A. tumefaciens*) (Currier y Nester, 1976; Depicker *et al.*, 1977). Los plásmidos de tipo octopina tienen en común unas 65 Kb con el pTiC58 del tipo nopalina, pero el resto de las 130 Kb son distintos (Engler *et al.*, 1981).

La organización genética del plásmido Ti se dispone a modo de mosaico, con regiones más o menos bien conservadas. Globalmente, presenta una estructura modular con genes de funciones similares agrupados juntos (Fig 1). Así, podemos definir cinco zonas:



**Figura 1.** Esquema de las regiones principales del plásmido Ti de *Agrobacterium* sp. Imagen tomada de <http://commons.wikimedia.org>

**A. Región T:** es el segmento de ADN que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal (Chilton *et al.*, 1977). A diferencia de otros elementos transponibles, el ADN-T permanece estable una vez transferido, y no codifica por sí mismo los productos que median su transferencia (Leemans *et al.*, 1982; Joos *et al.*, 1983; Zambryski *et al.*, 1983). El tamaño del ADN-T varía según el tipo de plásmido (Wang *et al.*, 1984; Peralta y Ream, 1985). Los extremos de esta región, llamados bordes, están formados por 25 pb y flanquean la región de ADN-T (Zambryski *et al.*, 1982).

**B. Región *vir*:** la región de virulencia es otro componente codificado por el plásmido Ti y contiene los genes necesarios para procesar y transferir el ADN-T. Está formada por un segmento de 35 Kb que contiene 20 genes esenciales para la inducción de tumores en la mayoría de las plantas huésped. Se compone de seis operones principales: *virA-B-G-C-D-E*. Estos operones tienen una regulación común (Stachel y Zambryski, 1986). El operón *virA* codifica una única proteína con actividad autoquinasa que actúa como sensor ambiental (Melchers *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 1990b). El operón *virB* contiene 11 genes que codifican proteínas localizadas en la membrana interna o externa (Christie, 1997). El operón *virC* codifica dos proteínas: VirC1 y VirC2 que, en principio, son requeridas para la transferencia eficaz del ADN-T (Yanofsky *et al.*, 1985; Kado, 1991). En el operón *virD* se encuentran los genes que codifican proteínas requeridas para el corte de las secuencias borde del ADN-T (Yanofsky *et al.*, 1986; Stachel *et al.*, 1987). El operón *virE* codifica dos proteínas: VirE1 y VirE2 (Sundberg *et al.*, 1996; Das, 1988). El último operón imprescindible para el procesamiento y transferencia del ADN-T es el *virG*. Este operón codifica un único producto que es el activador de la transcripción de los otros genes *vir* (Jin *et al.*, 1990a). La expresión tanto de *virA* como de *virG* es constitutiva (Stachel y Zambryski, 1986). Otros miembros del regulón *vir* no son esenciales para la tumorigénesis en todos los huéspedes y puede que sean necesarios sólo en algunos casos concretos o que jueguen otros papeles en la patogénesis como *virD5, E3, F, H, J, K, L, M, P* y *R* (Kalogeraki y Winans, 1998; Kalogeraki *et al.*, 2000).

**C. Loci *tra* y *trb*.** Ambos loci conforman el sistema de transferencia conjugativa. La importancia biológica de la conjugación radica en que permite la transferencia del plásmido Ti de la cepa donante de *Agrobacterium* sp. a una cepa no patógena con la que ésta adquiere, una vez transferido el plásmido, la capacidad de producir tumores (Genetello *et al.*, 1977; Kerr *et al.*, 1977).

**D. Región *rep*.** Para la replicación estable del plásmido Ti en *Agrobacterium* spp. se requieren tres genes: *repA*, *repB* y *repC*. Los dos primeros se encargan de que, durante la división celular, cada célula hija herede al menos una copia del plásmido. El único gen imprescindible para la replicación vegetativa del plásmido es *repC*. Las funciones de incompatibilidad entre plásmidos también están reguladas por esta región. Se define como incompatibilidad la incapacidad de heredar dos plásmidos determinados de forma estable, pudiendo coexistir dentro de la misma célula antes de su replicación. Los plásmidos del tipo octopina son incompatibles con los de nopalina (Hooykaas *et al.*, 1980).

**E. Región de Adquisición y catabolismo de opinas.** Esta región está compuesta aproximadamente por unos 40 genes que codifican las enzimas requeridas para estas dos funciones. Entre ellas se incluyen unas seis permeasas y doce enzimas catabólicas (Zhu *et al.*, 2000). Es característico que los plásmidos Ti codifiquen sólo para el catabolismo de aquellas opinas que se corresponden con los genes de biosíntesis localizados en su ADN-T. La regulación de estos genes es inducida por las mismas opinas que catabolizan (Petit *et al.*, 1970).

### **A.1.5. Opinas.**

Tras la infección por *Agrobacterium* sp., las células vegetales transformadas que contienen el T-DNA producen, a partir de aminoácidos y azúcares, unos compuestos que reciben el nombre de opinas (Tempé y Goldmann, 1982). Estos compuestos son exclusivos de los tumores vegetales producidos por *Agrobacterium* sp. y los genes responsables de su síntesis y catabolismo se encuentran en dicho plásmido (Tabla 2). Los genes que codifican la síntesis de las opinas se expresan sólo en las células vegetales transformadas, y los genes que codifican su catabolismo en las células de *Agrobacterium* sp. Estas bacterias son capaces de utilizar dichas opinas como única fuente de C y N para su crecimiento (Tempé y Petit, 1982). No se conocen efectos patogénicos de las opinas, pero debido a su especificidad como nutrientes para *Agrobacterium* sp. en el tumor, se ha supuesto que juegan un papel importante en la ecología de *Agrobacterium* sp. pues, gracias a ellas, el tumor proporciona un nicho ecológico altamente especializado para favorecer el desarrollo y la dispersión de las bacterias oncogénicas que lo han producido. El plásmido Ti induce en el tejido vegetal la síntesis de una opina, que puede efectuar una presión selectiva a favor de la bacteria que ha inducido la formación del tumor, ya que ésta puede crecer con dicha opina como única fuente de C y N (Petit y Tempé, 1985). Además, tienen otros dos efectos importantes para las células de *Agrobacterium* sp. en el tumor, ya que favorecen la transferencia del plásmido Ti a bacterias no virulentas mediante conjugación (Petit *et al.*, 1978; Guyon *et al.*, 1980; Ellis *et al.*, 1982a; Ellis *et al.*, 1982b), lo que asegura el predominio de bacterias virulentas en la población. También estimulan la activación de los genes *vir* del plásmido Ti (genes de virulencia)



por compuestos fenólicos de la planta, y aumentan la eficacia de la transformación (Veluthambi *et al.*, 1989).

**Tabla 2:** Clasificación de los plásmidos Ti según las opinas relacionadas.

<b>Tipo de plásmido</b>	<b>Opinas sintetizadas</b>	<b>Opinas que inducen la transferencia del plásmido</b>
<b>Octopina</b>	Octopina, ácido octopínico, lisopina, histopina, agropina, manopina y ácidos agropínico y manopínico	<b>Octopina, ácido octopínico y lisopina</b>
<b>Nopalina</b>	Nopalina, ácido nopalínico y agrocinoquinas A+B	<b>Agrocinoquinas A+B</b>
<b>Agropina</b>	Agropina, manopina, ácidos agropínico y manopínico, agrocinoquinas C+D, leucinopina, lactamo de leucinopina y L, L succinamopina	<b>Agrocinoquinas C+D</b>
<b>Succinamopina</b>	D, L succinamopina, lactamo de succinamopina, succinopina y nopalina	<b>Desconocida</b>
Lippia	Agrocinoquinas C+D	Desconocida
Crisopina/Succinamopina	Crisopina, deoxifruktosil-5 oxiprolina, L,L succinopina y L, L leucinopina	Desconocida
Crisopina/Nopalina	Crisopina, deoxifruktosil-5 oxiprolina y nopalina	Desconocida
Vid tipo I	Octopina y cucumopina	Desconocida
Vid tipo II	Nopalina	Desconocida
Vid tipo III	Vitopina y rideopina	Desconocida

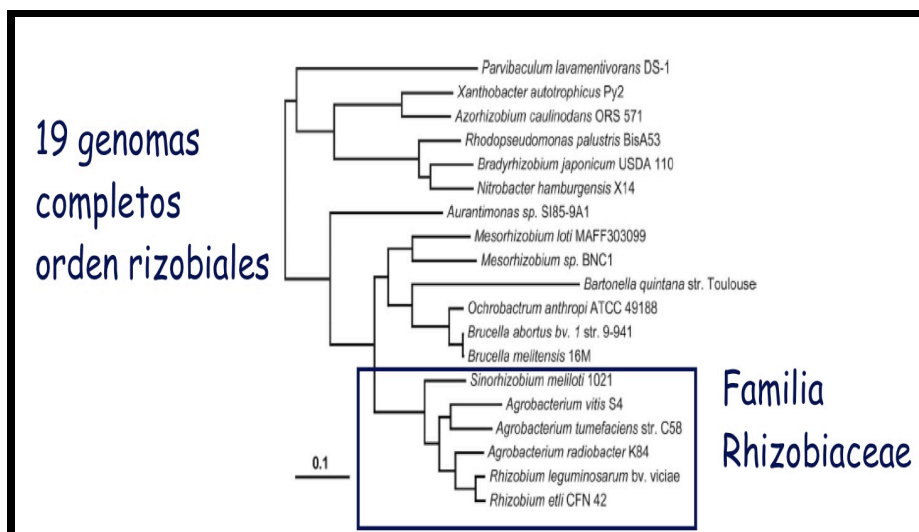
Tomado de Dessaux *et al.*, 1998

### **A.1.6. Bacteriocinas.**

Las bacteriocinas son sustancias de carácter antibiótico de bajo peso molecular, que afectan sólo a bacterias estrechamente relacionadas con el agente que las produce (Hopwood, 1978). La producción de bacteriocinas se ha descrito en cepas de *A. tumefaciens* (Stonier, 1960; Henderson *et al.*, 1983; Webster *et al.*, 1986) y de *A. rhizogenes* (Kerr y Panagopoulos, 1977; Chen y Xiang, 1986; Donner *et al.*, 1993), pero la mayoría de ellas no han sido caracterizadas químicamente y se desconocen sus mecanismos de actuación. La más estudiada es la agrocina 84, producida por la cepa K84 de *A. rhizogenes*, de la cual se hablará con detalle en el apartado B. Otras bacteriocinas descritas son la agrocina 286, producida por la cepa D286 de *A. rhizogenes* (Henderson *et al.*, 1983), la agrocina J73 producida por la cepa J73 de *A. tumefaciens* (Webster *et al.*, 1986) y la agrocina 434, producida también por la cepa K84 de *A. rhizogenes* (Donner *et al.*, 1993).

### **A.1.7. Genomas secuenciados y filogenia.**

Actualmente se dispone de la secuencia completa de diecinueve genomas bacterianos de especies pertenecientes al orden de las *Rhizobiales*, seis de ellos de la familia *Rhizobiaceae* y tres de ellos del género *Agrobacterium*. La cepa C58 de *A. tumefaciens*, la cepa K84 de *A. rhizogenes* y la cepa S4 de *A. vitis* (Slater *et al.*, 2009). Esto ha permitido conocer las relaciones filogenéticas de varias especies de la familia *Rhizobiaceae* basadas en los genomas completos (Fig 2).



**Figura 2.** Árbol filogenético basado en la secuencia completa de 19 genomas pertenecientes al orden *Rhizobiales* y donde se incluyen 6 genomas de la familia *Rizobiaceae* y 3 genomas del género *Agrobacterium*. Figura tomada de Slater *et al.*, 2009.

#### **A.1.7.1. *A. tumefaciens*.**

El genoma de la cepa C58 de *A. tumefaciens* consta de dos cromosomas, uno circular de 3 Mb y otro lineal de 2,1 Mb (Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Además contiene dos plásmidos de gran tamaño. El más grande, de aproximadamente 300 Kb, es un plásmido críptico. El segundo es el plásmido Ti, de aproximadamente 200 Kb y que confiere virulencia a la cepa que lo alberga. Su genoma total consta de 5,67 Mb y su contenido en G+C es del 59%. Se han identificado 5.385 genes que codifican proteínas y se les han asignado una posible función a 3.516 de estos genes. Se han identificado también 38 islas genómicas con un tamaño medio de 23,3 Kb (Slater *et al.*, 2009). La especie más próxima filogenéticamente a *A. tumefaciens* es *A. vitis* (Slater *et al.*, 2009).

#### **A.1.7.2. *A. rhizogenes*.**

Las cepa K84 de *A. rhizogenes* contiene un sólo cromosoma circular en su genoma de 4,0 Mb además de un megaplásmido de 2,65Mb y tres plásmidos adicionales: pAgK84 (44 Kb) (Kim *et al.*, 2006), pAtK84b (185 Kb) (Clare *et al.*, 1990) y pAtK84c (388 Kb) (Donner *et al.*, 1993). El replicón de 2,65 Mb contiene, igual que el segundo cromosoma de las cepas C58 de *A. tumefaciens* y S4 de *A. vitis*, el origen de replicación *repABC* característico de los plásmidos de gran tamaño en especies de la familia *Rhizobiaceae* (Slater *et al.*, 2009). Su genoma tiene un tamaño de 7,23 Mb y su contenido en G+C es del 59,9%. Se han identificado 6.752 genes, que codifican proteínas y a 5.099 de estos genes se le ha asignado una posible función. Contiene además 59 islas genómicas con un tamaño medio de 28,2 Kb. A diferencia de *A. tumefaciens*, las especies filogenéticamente más emparentadas no pertenecen al género *Agrobacterium*, sino a *Rhizobium* sp., y son *R. leguminosarum* y *R. etli* (Slater *et al.*, 2009).

#### **A.1.7.3. *A. vitis*.**

El genoma de la cepa S4 de *A. vitis* contiene dos cromosomas circulares y cinco plásmidos (Slater *et al.*, 2009). Tiene un genoma total de 6.32 Mb y su contenido en G+C es del 57%. Se han identificado 5.479 genes que codifican proteínas y se les ha asignado una posible función a 3.897 de ellos. Contiene, además, 20 islas genómicas con un tamaño medio de 33 Kb. La especie más próxima filogenéticamente es *A. tumefaciens* (Slater *et al.*, 2009).

**Tabla 3.** Características del genoma secuenciado de tres cepas de *Agrobacterium* spp. (Tomado de Slater *et al.*, 2009).

<i>Características</i>	<i>A. tumefaciens</i> <b>C58</b>	<i>A. rhizogenes</i> <b>K84</b>	<i>A. vitis</i> <b>S4</b>
<i>Biovar</i>	<b>Biovar I</b>	<b>Biovar II</b>	<b>Biovar III</b>
<i>Tamaño del genoma (pb)</i>	5.674,260	<b>7.273,300</b>	6.320,946
<i>Contenido en G+C (%)</i>	59,0	<b>59,9</b>	<b>57,5</b>
<i>Nº de cromosomas</i>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<i>Nº de plásmidos</i>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<i>Nº de genes que codifican</i>			
<i>Total</i>	<b>5.385</b>	<b>6.752</b>	<b>5.479</b>
<i>Con función asignada</i>	<b>3.516</b>	<b>5.099</b>	<b>3.897</b>
<i>Hipotéticamente conservados</i>	<b>1.287</b>	<b>1.201</b>	<b>1.282</b>
<i>Hipotéticos</i>	<b>582</b>	<b>452</b>	<b>300</b>
<i>Pseudogenes</i>	<b>28</b>	<b>68</b>	<b>90</b>
<i>Nº de genes RNA registrados</i>			
<i>Operones rRNA</i>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>tRNAs</i>	<b>56</b>	<b>51</b>	<b>54</b>
<i>Otros RNAs</i>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>30</b>
<i>Islas genómicas</i>			
<i>Nº total</i>	<b>38</b>	<b>59</b>	<b>20</b>
<i>Tamaño (Kb)</i>	<b>23.3</b>	<b>28.2</b>	<b>33.0</b>

## **A.2. Proceso de infección de plantas por *Agrobacterium* sp.**

### **A.2.1. Reconocimiento de las heridas de la planta.**

*Agrobacterium* sp. precisa reconocer que existe una herida en la planta para que comience el proceso infeccioso. Las células vegetales sanas, con su pared celular intacta, representan una barrera física para la bacteria, mientras que las células dañadas son más susceptibles de ser infectadas. Además, se sabe que las células dañadas, durante el proceso inicial de cicatrización de la herida, secretan compuestos fenólicos de bajo peso molecular que son reconocidos de forma específica como moléculas señal (Gelvin, 2000). *Agrobacterium* sp. responde a estas señales y migra mediante flagelos hacia la herida a través de un gradiente de concentración de los compuestos secretados (Kado, 1991). Estos compuestos fenólicos como la acetosiringona y la hidroxacetosiringona son precursores de la biosíntesis de lignina y flavonoides (Stachel *et al.*, 1985a). La lignina es el mayor componente de la pared celular vegetal y constituye una barrera física contra la invasión de patógenos, mientras que los flavonoides incluyen compuestos que proporcionan aroma, color y sabor, así como moléculas antimicrobianas específicas como las fitoalexinas (Darvill y Albersheim, 1984). El quimiotactismo hacia la acetosiringona depende del plásmido Ti (Shaw *et al.*, 1986; Ashby *et al.*, 1987). Además, *Agrobacterium* sp. también presenta quimiotactismo hacia exudados de las raíces (Hawes *et al.*, 1988).

### **A.2.2. Unión de la bacteria a la célula vegetal.**

Una vez *Agrobacterium* sp. está suficientemente cerca de la herida se produce una unión inicial directa con la célula vegetal. Sin esta unión no parece probable la transferencia del T-DNA. La unión de *Agrobacterium* sp. a la célula de la planta huésped se ha descrito en dos etapas. En la primera se produce una unión relativamente débil y reversible donde las bacterias se pueden separar de la célula vegetal mediante lavados con agua o agitación (Matthysse, 1983). Posteriormente, en la segunda etapa, las bacterias elaboran fibrillas de celulosa que las anclan firmemente a la superficie del huésped (Matthysse *et al.*, 1981). En este punto, sólo pueden separarse mediante degradación química o enzimática de la pared celular de la bacteria o de la planta (Matthysse *et al.*, 1981; Deasey y Matthysse, 1984). Los estudios con mutantes incapaces de elaborar fibrillas de celulosa mostraron que esta fuerte unión no era requisito necesario para que la bacteria resultase virulenta en condiciones de laboratorio (Matthysse, 1985; Sykes y Matthysse, 1986). El análisis del genoma de la cepa C58 de *A. tumefaciens* ha mostrado que los genes relacionados con la unión inicial de la bacteria con las células vegetales son los llamados genes *att* (*attachment*). En un principio se postularon en el cromosoma (Binns y Thomashow, 1988), sin embargo, la secuenciación completa del genoma de esta cepa reveló que los genes *att* se situaban en el plásmido pAtC58, aunque no eran indispensables para la virulencia (Rosenberg y Huguet, 1984). Un estudio más reciente determinó que el plásmido pAtC58 tiene un efecto positivo sobre los genes *vir* e inducen la transferencia del T-DNA, aunque no se sabe con precisión el proceso por el que se lleva a cabo esta inducción (Nair *et al.*, 2003; Setubal *et al.*, 2009).

El hecho de que tenga lugar la unión *Agrobacterium*-célula vegetal no implica necesariamente la transformación tumoral, ya que para que esto se produzca ha de darse la transferencia de DNA desde el plásmido Ti a la célula vegetal, que se integre en el genoma del huésped y que se transcriba. Además, para que se lleve a cabo la transformación de la célula vegetal, ésta tiene que estar en estado fisiológico activo (Kahl, 1982).

### **A.2.3. Inducción de la expresión de los genes *vir*.**

La región Vir (virulencia) contiene los genes necesarios para el procesamiento y transferencia del T-DNA (ver apartado A.1.4.1). Cuando los compuestos fenólicos de bajo peso molecular segregados por la planta (ver apdo. A.2.1 y A.2.2) se encuentran en una concentración de  $10^{-5}$  M y el pH está entre 5.0 y 5.8, se activan los genes *vir* (Rogowsky *et al.*, 1987; Winans *et al.*, 1988; Kado, 1991). El pH ácido es necesario para protonar los compuestos fenólicos y aumentar con esto la permeabilidad de la membrana. Esta inducción es un proceso que llega a tardar, en niveles altos de expresión, entre 8 y 16 horas (Klee *et al.*, 1987). La activación de los genes *vir* también es inducida por monosacáridos, aunque es posible la acción sinérgica de estos azúcares con la acetosiringona (Ankenbauer y Nester, 1990; Shimoda *et al.*, 1990). Para la activación de estos genes se requieren dos proteínas formadoras de un sistema de dos componentes, VirA y VirG (Melchers *et al.*, 1986). Las mutaciones en estos genes bloquean completamente la respuesta de *Agrobacterium* sp. a compuestos fenólicos de la planta (Stachel y Zambryski, 1986; Rogoswsky *et al.*, 1987; Winans *et al.*, 1988). Las moléculas inductoras interaccionan con la proteína VirA, que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática (Fig 3). La localización de esta proteína en la membrana sugiere una función de sensor ambiental,



capaz de reconocer los compuestos inductores directa o indirectamente (Melchers *et al.*, 1989). La proteína VirA, con actividad quinasa, fosforila a la proteína VirG activándola, a la vez que se produce un cambio conformacional (Winans, 1992). La proteína VirG se une a todos los promotores de la región Vir, activando su transcripción (Winans *et al.*, 1987; Steck *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 1990b; Gelvin, 2000). Estos genes se encuentran reprimidos en condiciones normales (Stachel *et al.*, 1985b).

En esta activación de los genes *vir* se da claramente una interacción entre la planta, que libera señales químicas a través de las heridas, y *Agrobacterium sp.*, que percibe la presencia de las células vegetales y entonces expresa los genes necesarios para la inducción tumoral.

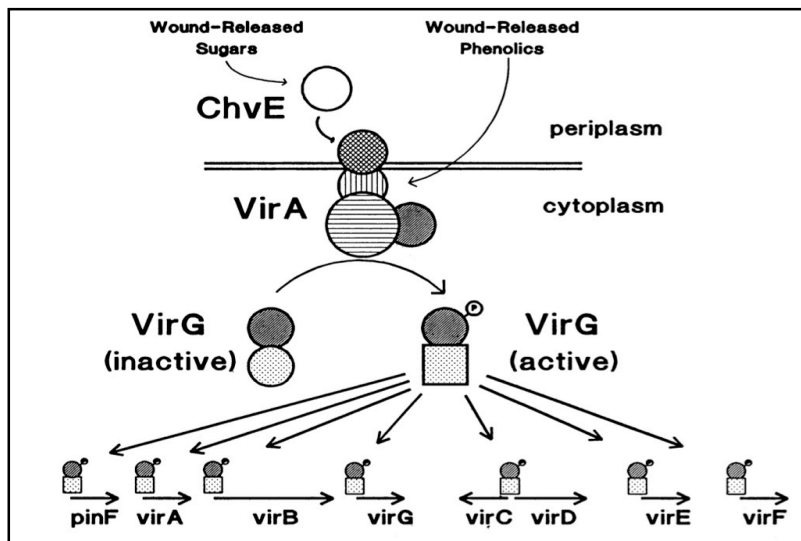


Figura 3. Esquema en detalle del proceso de activación de los genes *vir*

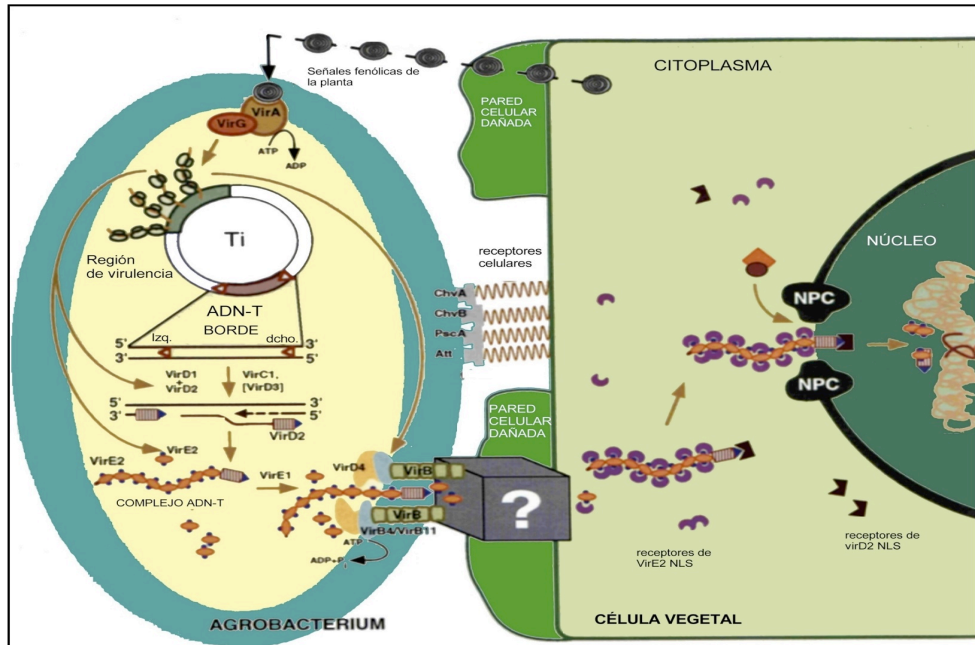
#### **A.2.4. Producción y transferencia de la copia T-ADN a la célula vegetal.**

Con la transcripción de los genes *vir* activados por la proteína VirG se produce el proceso de síntesis de la cadena-T (Fig.4). Durante el procesamiento del T-ADN se sintetizan moléculas de cadena simple denominadas intermediarios-T o "T-strands". Estas moléculas de ADN serán transferidas a la célula vegetal. Los operones *virC*, *virD* y *virE* están directamente implicados en el procesamiento y la transferencia del T-ADN desde el plásmido Ti a la célula vegetal (Winans, 1992; Zambryski, 1992). Las proteínas codificadas por el operón *virD* reconocen las secuencias terminales que delimitan el T-ADN (Yanofsky *et al.*, 1986). Las proteínas codificadas por los genes *virD1* y *virD2* tienen actividad endonucleasa y reconocen específicamente los bordes del T-ADN (Yanofsky *et al.*, 1986). Estas proteínas cortan un borde del T-ADN, y empieza a sintetizarse una nueva cadena de ADN que desplaza a la cadena que será el intermediario-T (Yanofsky *et al.*, 1986; Jayaswall *et al.*, 1987). La superproducción de las proteínas VirD1 y VirD2 produce un aumento en el número de bordes derechos del T-ADN cortados y, por tanto, un aumento de la eficacia en la transformación (Wang *et al.*, 1990). La proteína VirD2, unida covalentemente a la cadena-T, le confiere polaridad asegurando que el extremo 5' sea el que entre primero en el citoplasma de la célula vegetal (Howard *et al.*, 1992; Narasimhulu *et al.*, 1996; Zupan *et al.*, 2000). Además, protege al intermediario-T de la degradación por exonucleasas (Durrenberger *et al.*, 1989).

En el proceso de transferencia, un segmento de ADN específico, el complejo-T (cadena-T unida a la proteína VirD2), es reconocido y movilizado. Esta copia se transporta hasta la membrana bacteriana,

atraviesa en primer lugar la membrana y pared bacteriana y, posteriormente, la pared celular y la membrana de la célula vegetal (Gelvin, 2000). Una vez en la célula vegetal se mueve a través del citoplasma y cruza la membrana nuclear hasta llegar al núcleo de la célula vegetal (Fig. 4).

VirD2 guía a la cadena-T a través del *pilus* (Lai y Kado, 1998), compuesto por las proteínas VirB y VirD4. Se sabe que la formación del *pilus* es imprescindible para la transformación, aunque no se conoce con detalle si el complejo pasa a través de él o simplemente serviría de gancho para acercar la bacteria a la célula vegetal. La proteína VirE2 gancho para acercar la bacteria a la célula vegetal. La proteína complejo-T (Citovsky *et al.*, 1992; Zupan *et al.*, 2000). Esta proteína se une firmemente a ácidos nucleicos de cadena simple formando filamentos cilíndricos enrollados (Citovsky *et al.*, 1997). En principio se pensó que VirE2 se unía al complejo-T dentro de la bacteria, pero las evidencias genéticas demuestran que se transfieren de forma separada a la célula vegetal, formándose el complejo final en su citoplasma (Sundberg *et al.*, 1996; Gelvin, 1998, 2000). Por tanto, ambas proteínas VirD2 y VirE2 dirigen la cadena-T hacia el núcleo de la célula vegetal (Guralnick *et al.*, 1996; Relic *et al.*, 1998). En el transporte hacia el núcleo están implicadas otras proteínas de las plantas como la  $\alpha$ -carioferina (Ballas y Citovsky, 1997) o la ciclofilina (Deng *et al.*, 1998), que interaccionan con las proteínas Vir. La ciclofilina parece que mantiene a la proteína VirD2 en una conformación adecuada para la transferencia, mientras el complejo-T se mueve por el citoplasma.



**Figura 4.** Esquema global del proceso de activación de los genes *vir* y transferencia del T-DNA a la célula vegetal. Imagen tomada de Sheng and Citovsky, 1996 y modificada por Jaime Cubero.

### A.2.5. Integración y expresión de los genes del T-ADN en el genoma de la planta.

El último paso en la transformación es la integración del T-ADN en el genoma de la célula vegetal, pero esta etapa del proceso no es todavía conocida en su totalidad. En principio, el T-ADN puede integrarse en cualquier lugar y cromosoma de la célula vegetal (Ambros *et al.*, 1986; Chyi *et al.*, 1986; Mayerhofer *et al.*, 1991), aunque suele hacerlo con más frecuencia en zonas transcripcionalmente activas (Koncz *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990). Es posible que la proteína VirD2 que acompaña a la molécula de intermediario-T esté implicada en el proceso (Gheysen *et al.*,

1991; Zambryski, 1992). El T-ADN se integraría en el cromosoma vegetal por recombinación ilegítima, que es la forma mayoritaria de integración de ADN foráneo en plantas (Matsumoto *et al.*, 1990; Gheysen *et al.*, 1991; Mayerhofer *et al.*, 1991).

El T-ADN entra en el núcleo como una molécula de cadena simple (Tinland *et al.*, 1994; Yusibov *et al.*, 1994; Gelvin., 2000). No se sabe con seguridad si se integra en una zona del ADN vegetal localmente desnaturalizado como cadena simple y después se sintetiza la segunda cadena, o si pasa a ser de doble cadena antes de la integración.

Una vez que las copias de T-ADN se han insertado de forma estable en el genoma vegetal, se transmiten a las células hijas como un locus más de la planta, heredando éstas el fenotipo transformado (Spielman y Simpson, 1986). Los genes del T-ADN se expresan en las células transformadas a niveles altos (Chilton *et al.*, 1980; Willmitzer *et al.*, 1983). Así se transcriben los genes que codifican la síntesis de fitohormonas (auxinas y citoquininas) y opinas. Las fitohormonas provocan la formación del tumor, aunque se requiere un nivel mínimo de auxinas y citoquininas para que las células vegetales transformadas se multipliquen. Por otra parte, las opinas pueden servir como fuente de C y N a las agrobacterias del tumor y los genes para el catabolismo de una opina concreta se encuentran en el plásmido Ti correspondiente. Estos genes del catabolismo de las opinas están normalmente reprimidos en ausencia de éstas. De esta manera, las opinas en el tumor inducen que la mayoría de las agrobacterias presentes en el tumor tengan el plásmido Ti adecuado para su utilización, creando un nicho específico para las mismas bacterias que han iniciado la inducción tumoral (Tempé y Petit, 1983). Las células tumorales se caracterizan por un núcleo prominente, paredes finas y pérdida de

cloroplastos. Las divisiones tienen lugar en todos los planos, generando la forma redondeada de los tumores.

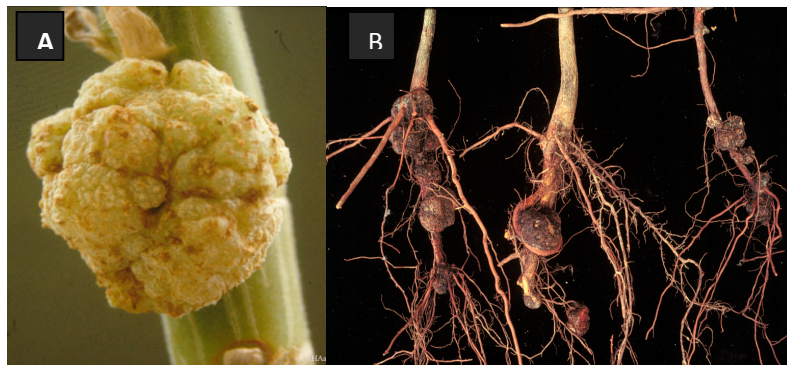
Una alteración en cualquiera de los pasos del proceso de infección implicaría un fracaso en la transformación, en la formación del tumor o una reducción de la virulencia. Aunque se ha visto que lo que más contribuye a reducir el rango de huéspedes o a una pérdida del poder patógeno son las deficiencias en la inducción de los genes *vir*, deleciones en esta región o del T-ADN (Kao *et al.*, 1982; Buchholz y Thomashow, 1984; Jin *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1990; Llop *et al.*, 2009).

### **A.3. Enfermedades causadas por *Agrobacterium* spp.**

#### **A.3.1. Síntomas.**

*Agrobacterium* sp. produce tumores de tamaño variable (desde un tamaño microscópico a más de 10 cm de diámetro) dependiendo del huésped donde se desarrolla la enfermedad y del avance de la infección. Los tumores están compuestos de tejido vascular y parénquima desorganizado, apareciendo hinchamientos blancos y carnosos, aunque adquieren coloración parduzca en el otoño-invierno (Figura 5.A). Frecuentemente se desarrollan nuevos tumores adyacentes a los del año anterior. Los tumores se producen a partir de heridas de la planta en raíces, cuello y, ocasionalmente, en la parte aérea de frutales (Figura 5.B). Las infecciones latentes pueden permanecer sin ser observadas durante el almacenamiento y clasificación de las plantas de vivero, pero después de la plantación en el campo estas infecciones se activan y provocan la formación del tumor (Moore, 1976; Burr, 1999).

Como consecuencia de la formación de los tumores, que se debe a una hipertrofia e hiperplasia de las células afectadas, se puede producir una obstrucción vascular que limita la conducción del agua y los nutrientes. Dependiendo de la edad de la planta afectada, se produce un menor desarrollo de raíces y un menor vigor (sobre todo en plantas jóvenes) (Garret, 1987; Nesme *et al.*, 1990; Sobiczewski *et al.*,1991). A veces puede producirse una detención del crecimiento y clorosis (en plantas de viveros).



**Figura 5.** A).Detalle de un tumor producido por *A. tumefaciens* tras inocular el tallo de una planta de calanchoe. B) Tumores en cuello y raíces de plantas de híbrido melocotonero x almendro 6F677. Generalmente los tumores en el cuello son más grandes que en las raíces. Fotografías cedidas por Ramón Peñalver.

En plantas adultas no se manifiestan necesariamente síntomas en las plantas, y los tumores pueden pasar desapercibidas en plantaciones maduras haciéndose evidente la infección cuando el arranque de los árboles deja al descubierto las raíces enfermas (Garret, 1987; Burr, 1999).

*Agrobacterium vitis* puede producir también tumores en la parte aérea de su planta hospedadora, la vid. Además, ocasionalmente puede aparecer necrosis de las raíces (Burr *et al.*, 1998). Se ha descrito que la necrosis está asociada con la producción de poligalacturonidasa (Rodríguez-

Palenzuela *et al.*, 1991) y con la capacidad de inducir una respuesta hipersensible en plantas no huéspedes, como el tabaco (Herchale *et al.*, 2001). Las especies *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, que habitualmente no son necrogénicas carecen de un sistema inductor de la respuesta hipersensible (Robinette y Mattysse, 1990), pero no es así en *A. vitis*. Recientemente, ambos mecanismos, la capacidad necrogénica, y la respuesta hipersensible, se han asociado en *A. vitis* con la presencia del gen *aviR*, homólogo del gen *luxR* implicado en autoinducción y *quorum sensing* (Zheng *et al.*, 2003).

### **A.3.2. Huéspedes.**

En 1976, Cleene y De Ley concluyeron que 643 especies vegetales de 331 géneros, pertenecientes a 93 familias, eran susceptibles a la infección con *A. tumefaciens* (DeCleene y De Ley, 1976). Los huéspedes principales son dicotiledóneas, tanto angiospermas como gimnospermas, mientras que sólo algunas monocotiledóneas de los órdenes Liliales y Arales son susceptibles. Las especies de interés económico más afectadas son los frutales de hueso y pepita, la vid, cultivos ornamentales como la rosa, la dalia o el crisantemo y especies forestales como el chopo, el aliso o el sauce (Moore y Cooksey, 1981; Mougel, 2000; Pulawska, 2010).

Existen diferencias en el rango de hospedadores entre distintos aislados de *Agrobacterium* sp (Anderson y Moore, 1979). Al estudiar 176 aislados de distinto origen e inoculados en 11 plantas hospedadoras, el 66% de los aislados produjo tumores en 6-8 especies y el 3% sólo en su hospedador homólogo. Es decir, se observaron diferentes rangos de hospedador en distintas cepas, siendo estos rangos independientes de las plantas huésped, el biovar y la utilización de opinas (Knauf y Nester, 1982).



Se han determinado algunas bases genéticas de estas variaciones en el rango de hospedador en ciertas cepas de *A. tumefaciens*. La mayor parte de cepas inducen tumores en un amplio rango de especies dicotiledóneas, pero los aislados de viña suelen tener un rango de hospedador bastante más limitado, que suele reducirse a la vid y algunas herbáceas como tomate y tabaco (Panagopoulos *et al.*, 1978; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). Estas cepas contienen principalmente plásmidos Ti tipo octopina, y han perdido el gen implicado en la síntesis de citoquininas en su T-DNA (gen *ipt*) (Buchholz y Thomashow, 1984). La introducción de este gen en cepas de limitado rango de hospedador se vio que provocaba una ampliación de su capacidad para infectar distintos huéspedes (Hoekema *et al.*, 1984). Estudios posteriores han revelado que los genes *virC1* y *virC2* estaban implicados en el rango de hospedador en este tipo de cepas (Yanofsky y Nester, 1986).

### **A.3.3. Distribución geográfica e importancia económica.**

La enfermedad causada por *Agrobacterium* spp., denominada en inglés “crown gall”, se encuentra distribuida por los cinco continentes (Bradbury, 1986). En Europa, la incidencia es más notable en países mediterráneos como España, Italia o Grecia, siendo menos frecuente en Suiza, Alemania o Reino Unido (López y Montesinos, 1996; Pulawska, 2010). En Italia y Grecia esta enfermedad se encuentra muy extendida afectando, principalmente, a árboles frutales de hueso y pepita, viñedos y rosales (Panagopoulos y Psallidas, 1973; Bazzi, 1983; Pulawska, 2010).

La enfermedad puede causar pérdidas de producción porque provoca un descenso del vigor, sólo en casos muy graves se da la muerte de la planta (Faivre-Amiot, 1984; Garret, 1987; Nesme *et al.*, 1990). Es en los viveros e invernaderos donde esta enfermedad es más perjudicial ya que

afecta gravemente al valor comercial de las producciones provocando importantes pérdidas económicas, aunque no se dispone de datos recientes de evaluación de las mismas en España o Unión Europea, existen datos de pérdidas en algunos estados de EE.UU y Canadá (Pulawska, 2010). Los daños directos a la planta pueden no ser muy importantes, sin embargo las pérdidas económicas en viveros y plantaciones son muy elevadas, debido a la legislación fitosanitaria vigente en la Unión Europea que considera *Agrobacterim* spp. como patógenos de calidad, por lo que los lotes de plantas con más del 2-10% de plantas con tumores, variables según las especies, no pueden ser comercializados (Directiva 92/323). En numerosos países del norte de África y Sudamérica *Agrobacterium* sp. está incluso considerado un patógeno de cuarentena.

Los intercambios comerciales han contribuido a la diseminación de la enfermedad, ya que se ha descrito el movimiento de la bacteria en el interior de las plantas, con la posibilidad de infecciones sistémicas y la probable existencia de plantas asintomáticas en las que la bacteria esté presente de forma latente (Lehoczky, 1968; Jones y Rajú, 1988; Cubero, 1998; Martí *et al.*, 1999;). Aunque no se han evaluado recientemente los daños que causa en España, una encuesta realizada en el sector viverístico de frutales en los años 80 reveló que en el 70% de los viveros encuestados frecuentemente aparecían plantas afectadas por la enfermedad, con una incidencia variable que podía llegar hasta el 90% de plantas enfermas en una parcela (López *et al.*, 1983). Datos más recientes indican que la incidencia en España es especialmente importante en los frutales de hueso, donde algunos patrones, como los híbridos de melocotonero x almendro, presentan una elevada sensibilidad a esta enfermedad (López, 2001). Le siguen en importancia los ataques en viña, ya que actualmente la

enfermedad está siendo detectada con mucha frecuencia en plantaciones de vid de las distintas zonas vitivinícolas (Lastra, 1998; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

#### **A.3.4. Métodos de lucha.**

Actualmente no existen métodos eficaces de control de esta enfermedad. El hecho de que sólo sea necesaria la presencia de la bacteria al comienzo de la infección para que se desarrolle el tumor hace que la lucha curativa, que busca destruir el agente patógeno una vez iniciada la infección, no tenga sentido en este caso, ya que el tumor se puede desarrollar sin estar la bacteria presente. Es por este motivo que las medidas preventivas, como el control de la calidad sanitaria de las plantas, la desinfección del suelo (con vapor o por solarización), la rotación de cultivos con plantas no huéspedes o la plantación de variedades resistentes o tolerantes, tienen vital importancia en el control de esta enfermedad, ya que de esta manera se reducen las cantidades de inóculo en el suelo (Moore y Allen, 1986; Ophel *et al.*, 1990; López *et al.*, 1994; Raio *et al.*, 1997). Para la prevención de la enfermedad el material vegetal deberá ser cuidadosamente examinado antes de ser establecido y las plantas con tumores deberán ser destruidas. Además, las plantas deberán proceder de suelos no infectados, ya que las infecciones latentes son más frecuentes en las plantas procedentes de suelos contaminados (Moore, 1976). Los viveristas deberán seleccionar cuidadosamente el material de propagación para disminuir los riesgos de diseminación de la enfermedad, y las medidas preventivas se deben continuar con la plantación en suelo no contaminado. Los sustratos deben ser preparados, esterilizados, conservados y utilizados con todo tipo de precauciones para evitar la infección (López *et al.*, 1994).

Por todo ello, las medidas preventivas para esta enfermedad son de vital importancia. Estas medidas preventivas, al restringir los riesgos de diseminación de la enfermedad, limitan también la aparición de nuevas cepas más virulentas o mejor adaptadas a determinados hospedadores (Favre-Amiot, 1982; López *et al.*, 1994). De todos modos, aunque se trata de medidas necesarias, no son suficientes en la mayoría de los casos.

La utilización de compuestos químicos no ha resultado ser eficaz para el control de la enfermedad, a pesar de los numerosos estudios realizados con distintos productos (López, 1988; López *et al.*, 1989; Stockwell, 1993).

La mejora genética clásica que intenta seleccionar u obtener variedades de plantas tolerantes a la enfermedad no ha sido muy abordada. Los estudios de la susceptibilidad de distintas especies vegetales son escasos debido a que éstos presentan una gran complejidad. Hasta la fecha no se han encontrado patrones frutales inmunes frente a *Agrobacterium* sp pero sí existen diferencias en su sensibilidad (Pinochet *et al.*, 2002).

En cuanto a las aproximaciones biotecnológicas para inducir tolerancia a la enfermedad, éstas se han basado en la transformación genética de plantas con diferentes genes (Gelvin, 2000; Tzfira y Citovsky, 2006). La proteína VirD2 contribuye a la protección y eficiencia de la integración del T-DNA en el genoma de la planta. Las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *VirD2* resultaron menos susceptibles a la posterior transformación con *Agrobacterium* sp. posiblemente por una competición entre la proteína expresada en la planta y la que se induce ligada al T-ADN tras la infección. Sin embargo, la sobreexpresión constitutiva de *VirD2* resultó tóxica para las plantas de *Arabidopsis*. y tan solo sobrevivieron aquellas con niveles muy bajos de expresión

(indetectables) o en las que se utilizó un promotor inducible por herida (Hwang *et al.*, 2006). Otra estrategia consiste en el silenciamiento de los oncogenes *ipt* e *iaaM* de *Agrobacterium* sp. utilizando construcciones que producen mARNs con forma de horquilla (hpARNs), de modo que las plantas transformadas de *Arabidopsis* y tomate fueron más tolerantes a la infección (Escobar *et al.*, 2001). Esta estrategia también se ha llevado a cabo en plantas de nogal (Escobar *et al.*, 2002). En todos estos casos, estas estrategias no han producido plantas resistentes a la enfermedad, si no más tolerantes a la infección. Además, aún no son de uso generalizado para el control de la enfermedad.

## **B. Control biológico de la enfermedad.**

### **B.1. Control biológico mediante la cepa K84.**

Los inicios de la lucha biológica contra *Agrobacterium* sp. comenzaron con los trabajos de A. Kerr de la Universidad de Adelaida (Australia) donde se observó que, en las proximidades de los árboles sanos en campos infectados, la relación bacterias patógenas/bacterias no patógenas era muy baja, mientras que alrededor de las plantas con tumores esta relación aumentaba significativamente (Kerr, 1972). Estos datos hicieron pensar que, si se incrementaba la proporción de bacterias no patógenas en el sistema radicular de las plantas, la enfermedad tendría menos incidencia. Se probaron distintas cepas no patógenas, y se seleccionó la cepa K84 porque protegió a las plantas infectadas frente a la enfermedad (Kerr, 1972). Esta eficacia se mostró tanto en invernadero como en campo cuando la cepa era inoculada en proporción 1:1 respecto a la cepa patógena (New y Kerr, 1972).

La cepa K84 se aisló de suelo rizosférico en las proximidades de un melocotonero con tumores (New y Kerr, 1972) y fue clasificada como perteneciente al biovar 2 (Kerr y Panagopoulos, 1977), por tanto en este trabajo la denominaremos *A. rhizogenes* (ver apartado A.1.2.1).

### **B.2. Mecanismos implicados en el biocontrol mediante el uso de la cepa K84.**

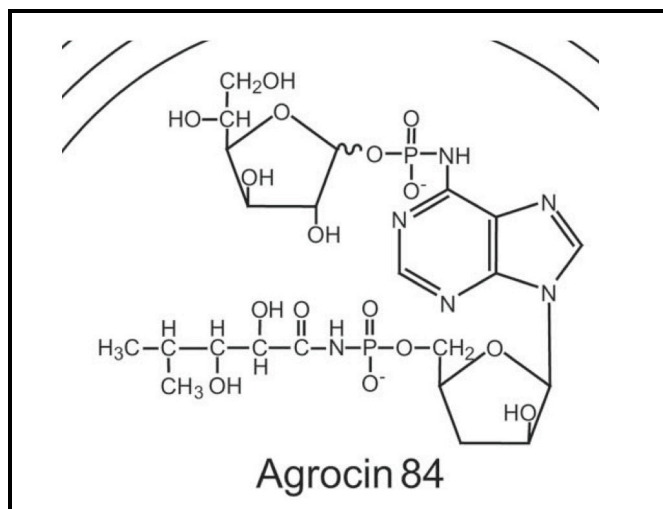
#### **B.2.1. Agrocina 84.**

La cepa K84 produce y excreta al medio un antibiótico altamente específico denominado agrocina 84, que afecta a un gran número de cepas patógenas de *Agrobacterium* sp (Kerr y Htay, 1974). Ya en los primeros estudios sobre los mecanismos del biocontrol se observó que, cuando se

coinoculaba la cepa K84 junto con una cepa patógena de *Agrobacterium* sp directamente en tallos de tomate, la aparición de tumores estaba claramente relacionada con la susceptibilidad del patógeno a la agrocina 84, producida por la cepa K84. De manera que, cuando K84 se coinoculaba con un patógeno sensible a la agrocina 84 se producían muy pocos tumores en los puntos de inoculación. Por el contrario, cuando se coinoculaba con una cepa resistente, aparecían tumores en una frecuencia mucho mayor (Kerr y Htay, 1974). En general, el control es también más eficaz en suelos infectados con cepas patógenas sensibles a la agrocina 84, que en suelos infectados con cepas resistentes. Por ello, la síntesis de agrocina 84 en la cepa K84 parecía una característica esencial para el control. Posteriormente, utilizando un mutante derivado de K84 que no producía agrocina 84, se demostró que la producción de este antibiótico era un factor necesario para controlar eficazmente a las cepas patógenas sensibles a dicho antibiótico, tanto en coinoculaciones en tallos (Cooksey y Moore, 1982) como en ensayos de control biológico en campo (López *et al.*, 1989). En estudios más recientes, mediante el análisis de mutantes de la cepa K84 seleccionados por su pérdida de la capacidad de control de cepas patógenas sensibles a la agrocina 84, se ha demostrado que la síntesis de la agrocina 84 es el componente principal para el biocontrol (Penyalver *et al.*, 2009). Por tanto, la agrocina 84 es un componente esencial, pero no suficiente, para explicar toda la capacidad de biocontrol de la cepa K84, ya que esta cepa es capaz también de controlar, aunque menos efectivamente, a patógenos resistentes a la agrocina 84 en condiciones de campo (Cooksey y Moore, 1982; López *et al.*, 1987; Bouzar *et al.*, 1991; Farrand y Wang, 1992; Vicedo *et al.*, 1993; Penyalver y López, 1999; Penyalver *et al.*, 2000).

La agrocina 84 es un análogo del nucleótido adenina con dos sustituciones, la 3'-desoxi-D-arabinosa sustituye a la desoxirribosa y la molécula carece de 3'-OH (Roberts *et al.*, 1977). La agrocina 84 consigue entrar en el patógeno mediante una permeasa específica codificada en plásmidos Ti tipo nopalina agrocinopina, debido a que en la naturaleza se comporta como un falso análogo de la opina agrocinopina (Ellis y Murphy, 1981). Una vez entra en el patógeno, éste intenta metabolizar la agrocina 84 como si se tratara de la agrocinopina y se produce un intermediario que inhibe la síntesis de proteínas. Recientemente se ha demostrado que este intermediario inhibe el enzima tRNA-Leu sintetasa necesario para la síntesis de proteínas (Reader *et al.*, 2005). La síntesis de agrocina 84 está codificada en el plásmido conjugativo pAgK84 de la cepa K84 (Farrand *et al.*, 1985), el cual también confiere a la vez inmunidad a la agrocina 84 (Ryder *et al.*, 1987). El plásmido pAgK84 ha sido recientemente secuenciado y ha mostrado que la síntesis de agrocina 84 está codificada por diecisiete genes estructurados en siete operones (Kim *et al.*, 2006). Además, ha permitido determinar cómo éste confiere a la vez inmunidad al antibiótico en la cepa K84, ya que dicho plásmido posee otra copia del gen de la RNA-Leu sintetasa y se ha demostrado que este alelo es resistente a la agrocina 84 (Reader *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).





**Figura 6.** Estructura química de la agrocina 84 (Kim *et al.*, 2006).

### **B.2.2. Colonización de raíces.**

La cepa K84 es capaz de unirse directamente a la superficie de ápices radiculares de tomate (Peñalver *et al.*, 1996) y además, colonizar eficazmente el sistema radicular de las plantas (Macrae *et al.*, 1988; Vicedo *et al.*, 1993). Estudios de biocontrol y colonización de las raíces de almendros por parte de diferentes cepas no patógenas de *Agrobacterium* sp., a las cuales se les había introducido el plásmido pAgK84 productor de la agrocina 84, mostraron que la cepa K84 fue la más eficaz controlando la enfermedad y colonizando las raíces. Además, las cepas productoras de la agrocina 84 que no controlaron eficazmente la enfermedad, tampoco colonizaron las raíces de las plantas tan eficientemente (Shim *et al.*, 1987). Posteriormente, estudios de co-colonización de las raíces por parte del patógeno y la cepa K84 en ensayos de control biológico en condiciones de campo, mostraron que la K84 fue capaz de establecerse en poblaciones de  $10^6$  unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de peso fresco de raíz

ocho meses tras la inoculación y cultivo de las plantas, frente a poblaciones de  $10^3$ - $10^4$  ufc/gramo de raíz del patógeno (Penyalver y López, 1999).

Estos trabajos refuerzan la idea de que la colonización de las raíces debe ser un requisito para un control eficaz de la enfermedad, y que la competencia por la colonización final de las raíces entre el patógeno y el agente de biocontrol puede ser otro mecanismo importante en el control biológico.

### **B.2.3. Otros posibles mecanismos implicados.**

La cepa K84 es capaz de sintetizar otras dos sustancias antiagrobacterianas, como son: la agrocina 434 (Donner *et al.*, 1993) y el Antibiotic-Like Substance 84 (ALS84) (Peñalver *et al.*, 1994). La agrocina 434 afecta sólo a bacterias patógenas del biovar 2 (*A. rhizogenes*), siendo su presencia condición necesaria, pero no suficiente para el control de aislados sensibles a esta sustancia (McClure *et al.*, 1998). Su producción, por otra parte, tampoco permite controlar cepas resistentes a la agrocina 434, ni explica porqué los mutantes deficientes en la síntesis de agrocina 84 controlan patógenos resistentes a ésta última en condiciones de campo (López *et al.*, 1989). Actualmente, se sabe que el ALS84 es un sideróforo tipo hidroxamato producido por la cepa K84 cuando crece en condiciones limitantes de hierro (Penyalver *et al.*, 2001), pero no se sabe qué papel puede tener éste u otros sideróforos en la capacidad de biocontrol de K84.

### **B.3. Desarrollo de una nueva cepa: K1026.**

Como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de agrocina 84 está codificada en el plásmido conjugativo pAgK84 de la cepa K84, que también confiere inmunidad al antibiótico (Ryder *et al.*, 1987; Reader *et al.*, 2005). Este plásmido, al ser conjugativo, puede ser transferido de K84 a

cepas patógenas del suelo. La conjugación se demostró inicialmente en el laboratorio y las cepas que adquirieron el plásmido se convirtieron en productoras y resistentes a la agrocina 84, además de ser capaces de producir tumores (Farrand *et al.*, 1985). Posteriormente, se demostró que esta transferencia del pAgK84 también podía ocurrir *in vivo* con relativa frecuencia (Vicedo *et al.*, 1993; Stockwell *et al.*, 1996). Por lo tanto, esta transferencia del pAgK84 puede poner en peligro la eficacia de la lucha biológica cuando se utiliza la cepa K84 ya que, mientras se controla la enfermedad, existe el riesgo de aparición de cepas patógenas, productoras de agrocina 84 y resistentes al antibiótico. Además, estos nuevos patógenos que se crean serían más difíciles de controlar (Vicedo, 1995). Para evitar esta transferencia y asegurar así la efectividad del control biológico utilizando K84, se desarrolló un mutante de delección estable Tra<sup>-</sup> del plásmido pAgK84, que era deficiente en su transferencia por conjugación bacteriana, y se obtuvo un derivado de la cepa K84 denominado K1026, que evita la transferencia del pAgK84 (Jones *et al.*, 1988). Esta cepa se registró inicialmente en Australia (Kerr, 1989) y fue el primer caso en el que un organismo modificado genéticamente se registró oficialmente para uso comercial en el mundo (Clare, 1993).

#### **B.4. Eficacia comparada K84 vs K1026.**

Los ensayos realizados en Australia y España en condiciones naturales mostraron la misma eficacia de ambas cepas para controlar la enfermedad en frutales, tanto frente a cepas patógenas sensibles a la agrocina 84 como frente a resistentes (Jones y Kerr, 1989; Vicedo *et al.*, 1993). Posteriormente esta eficacia de la nueva cepa K1026 fue confirmada en otros países como Jordania, Túnez y Estados Unidos, y sobre distintos huéspedes como almendro, tomate, nogal, manzano, melocotonero, peral, cerezo y albaricoquero. Los resultados de todos estos trabajos se encuentran recogidos en un trabajo de revisión sobre la cepa K1026 que aconseja el uso de esta nueva cepa para el control de la enfermedad causada por *Agrobacterium* sp., por tratarse de una cepa más segura y tan eficaz como su progenitora, la cepa K84 (Penyalver *et al.*, 2000).

#### **B.5. Situación actual del registro y comercialización de las cepas K84 y K1026.**

La lucha biológica mediante la utilización de la cepa K84 ha resultado el método más eficaz para el control de esta enfermedad (Vidaver, 1982; López, 1988). Este método se convirtió en el primer uso comercial de una bacteria para el control de un patógeno en plantas, a nivel mundial (Kerr, 1980). Este método de lucha biológica se puso a punto inicialmente en Australia, y se comercializó en al menos 12 países, entre ellos Nueva Zelanda, Estados Unidos, Canadá y algunos países del norte de África, Sudamérica, Asia y Europa. En España se tratan alrededor de ocho

millones de plantas al año durante la década de los 90 y alrededor de un millón en Estados Unidos.

A partir del año 1989 se empezó a comercializar la nueva cepa mejorada K1026, primero en Australia y Nueva Zelanda y, posteriormente, en Estados Unidos (2000), Turquía, Marruecos y Túnez (2004), pero hasta la fecha no ha sido registrada en la unión Europea.

En el año 2003 se trataron con la cepa K1026 entre 1 y 1,5 millones de patrones frutales y entre 2 y 3 millones de plantas ornamentales, principalmente rosales, en Australia. En Estados Unidos se trataron entre 5 y 6 millones de plantas (G. K. Bullard, comunicación personal).

## **C. Biopelículas, polisacáridos y control biológico.**

### **C.1. Biopelículas.**

#### **C.1.1. Definición y generalidades.**

Las bacterias tienden a adherirse y colonizar todas las superficies disponibles en su hábitat, en muchos casos mediante interacciones transitorias (Marshall *et al.*, 1971; Marshall, 1985; Costerton, 1987). Fue en la primera mitad del siglo XX cuando, tras la observación de una amplia variedad de hábitats naturales, se llegó a la conclusión de que esta asociación de las bacterias a las superficies, formando estructuras conocidas como biopelículas, es el modo prevalente de vida microbiana en la naturaleza (Zobell, 1943; Costerton, 1987). Por tanto, aunque los microorganismos pueden tener un modo de vida independiente, o planctónico, el estilo de vida interdependiente, en el que las células funcionan como parte integrante de una población, es su modo de vida más habitual. Por ello, la distribución de estas formaciones microbianas, su estructura, dinámica, fisiología y su papel en la patogenicidad son cuestiones de gran interés en la actualidad.

Las biopelículas se definen como asociaciones de células microbianas inmersas en una matriz de material extracelular, que ellas mismas sintetizan y que las mantiene unidas y próximas (Morris y Monier, 2003; Kjelleberg y Givskov, 2007). Generalmente, se considera que las biopelículas se forman sobre una superficie sólida, pero también se pueden formar agregados multicelulares suspendidos en la fase acuosa de muchos hábitats (Taylor *et al.*, 2004). Las biopelículas pueden estar compuestas por una única especie microbiana o, en la mayoría de los casos que se dan en la naturaleza, por especies diferentes (Juretschko *et al.*,

2002; Taylor *et al.*, 2004; Lyautey *et al.*, 2005), aunque una o un pequeño porcentaje de ellas suele ser numérica y funcionalmente dominante (Tujula *et al.*, 2006).

La composición de una biopelícula es variable, siendo el agua el elemento mayoritario, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua, la matriz de la biopelícula está formada, principalmente, por exopolisacáridos (EPSs) (Sutherland, 2001) y en menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de parte de la población (Branda *et al.*, 2005). Muchas propiedades de las biopelículas derivan directamente de su naturaleza físico-química y de la organización espacial que las bacterias adopten dentro de ellas, propiedades que están condicionadas por el medio ambiente en el cual se desarrollan (Characklis y Marshall, 1990; Davey y O'Toole, 2000, Morris y Monier, 2003).

La difusión y el movimiento de las moléculas a través de la biopelícula dependen, en parte, de la naturaleza de las sustancias exopoliméricas que forman la matriz y de su grado de hidratación (De Beer *et al.*, 1994). Los estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de esta matriz no es compacta y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes, oxígeno y de otras sustancias, incluso hasta las zonas más profundas de la biopelícula. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro de la estructura se creen diferentes ambientes en los que varían la concentración de nutrientes, el pH o el oxígeno (Costerton *et al.*, 1995; Davey y O'Toole, 2000; Stoodley *et al.*, 2002), pudiéndose así encontrar, por ejemplo, zonas de pH ácido o anaeróbicas (Vroom *et al.*, 1999). Las biopelículas

constituyen, por tanto, micronichos donde las condiciones físicas y químicas llegan a ser significativamente distintas a las del medio que las rodea.

En su adaptación a la vida en la biopelícula, una bacteria experimenta cambios importantes mediante la activación de diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas, lo que se ha comprobado mediante análisis transcriptómicos y proteómicos comparativos entre células de la misma especie en estado planctónico o formando biopelículas (Hume *et al.*, 2004). De hecho, y gracias a los avances de los últimos años en proteómica y genómica, se han podido identificar variaciones de concentración en gran cantidad de proteínas a lo largo del desarrollo de la biopelícula (Whiteley *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002). Los estudios más recientes en *P. aeruginosa* muestran que el perfil proteico de las colonias se parece al de las células planctónicas. Además, a diferencia de lo que se había mostrado anteriormente, el perfil proteico de las biopelículas se parece más al de las células planctónicas en fase exponencial que en fase estacionaria (Mikkelsen *et al.*, 2007). Estos cambios explican la adhesión incrementada de las células bacterianas inmersas en la biopelícula, y también su mayor resistencia a antibióticos, desinfectantes, y otras sustancias tóxicas.

Esta forma de establecerse las bacterias en la naturaleza les confiere una serie de ventajas de las que se ven desprovistas cuando se encuentran en fase libre (Morris y Monier, 2003). Algunas de estas ventajas son la protección frente a la desecación, la radiación UV, la predación o los bactericidas (Costerton *et al.*, 1987). Además, las biopelículas facilitan el intercambio genético y, en general, las interacciones celulares (Costerton *et al.*, 1995; Davey y O'Toole, 2000; Morris y Monier, 2003). La proximidad



física entre células desencadena la expresión de fenotipos dependientes de densidad mediados por la acumulación de moléculas difusibles en la matriz de la biopelícula, como las acil-homoserin-lactonas, que regulan la comunicación entre células en el proceso denominado *quorum sensing* (Costerton *et al.*, 1995; Davey y O'Toole, 2000).

Las primeras observaciones de estructuras tipo biopelícula sobre la superficie de plantas datan de principios de los años 60 en hojas (Ruinen, 1961) y de principios de los 70 en raíces (Rovira y Campbell, 1974). Se han descrito casos en los que las biopelículas probablemente favorecen la acción concentrada de enzimas pectolíticas para degradar el tejido superficial de la hoja (Carmichael *et al.*, 1999), o favorecen el intercambio de gases y nutrientes entre raíces y bacterias de la rizosfera (Briones *et al.*, 2002). También se ha sugerido que pueden interferir en el reconocimiento de las bacterias patógenas por la planta, y que podrían promover la expresión coordinada de genes de patogenicidad (Denny, 1999). El número de estudios que revelan la importancia de las biopelículas ha ido en aumento, porque todo apunta a que las interacciones planta-microorganismo están significativamente influidas por la conformación de las poblaciones microbianas que se unen a la planta (Danhorn y Fuqua, 2007).

### **C.1.2. Fases de la formación de una biopelícula.**

Los estudios realizados, principalmente con *Pseudomonas aeruginosa*, han mostrado que las biopelículas se forman en varias etapas (Watnick y Kolter, 1999). Para algunos pasos del proceso se requiere

comunicación intercelular (Davies *et al.*, 1998), y la transcripción de determinados genes que no están activos cuando la célula está en fase libre (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). De forma general, las etapas de la formación de una biopelícula se pueden enumerar de la siguiente manera: a) unión primero reversible y luego irreversible, b) movilidad en superficie e inicio de formación de microcolonias, c) maduración, expansión y diferenciación de microcolonias y d) disolución de parte de la biopelícula y dispersión de células especializadas para la colonización de otros nichos (Kjelleberg y Givskov, 2007) (figura 7). En general, la biopelícula bacteriana empieza a formarse cuando alguna célula individual planctónica se une inicialmente a una superficie y/o a otros microorganismos previamente unidos a esa superficie, y lo hace de forma transitoria o reversible. La unión inicial no permanente le permite buscar el lugar más adecuado para ubicarse. La capacidad de la célula para realizar esta aproximación inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican la percepción de estímulos ambientales, las funciones de movilidad, adhesinas y otras proteínas (Costerton, 1995; O'Toole *et al.*, 2000; Kraigsley *et al.*, 2002). Aunque la combinación de los factores que influyen en el desarrollo de la biopelícula depende, en principio, de la especie, algunas características son comunes a la mayoría de bacterias estudiadas hasta ahora.

La adhesión de las bacterias a un sustrato puede ser activa (por flagelos, pili, adhesinas, cápsulas y cargas de superficie) o pasiva (por gravedad, difusión y dinámica de fluidos). En pocos minutos, las bacterias libres que encuentran una superficie adecuada se unen a ella de modo reversible, mediante interacciones de tipo electrostático o hidrofóbico y

fuerzas de Van der Waals, es decir, sin unión química. Si esta unión física reversible se mantiene suficiente tiempo, aparecen nuevas estructuras químicas y físicas que la harán permanente e irreversible. La unión irreversible implica el anclaje de apéndices bacterianos y la producción de exopolímeros. Las biopelículas pueden desarrollarse casi en cualquier tipo de superficie, siempre que, previamente, esta superficie haya entrado en contacto con la materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa de materia orgánica que modifica las propiedades químicas y físicas de la superficie, y favorece las posibilidades de fijación de las bacterias.



**Figura 7.** Esquema general formación biopelículas. El primer paso es una unión inicial de la célula a la superficie. En segundo lugar empieza a producirse la matriz exopolimérica (unión irreversible). A continuación la biopelícula va desarrollando una estructura más compleja hasta alcanzar el estado de biopelícula madura. En una última etapa, se liberan células planctónicas que colonizarán nuevas superficies.

Después de la unión inicial, la célula empieza a crecer, multiplicarse o extenderse sobre la superficie en una monocapa, formando microcolonias. Entonces comienza a desarrollarse la compleja arquitectura

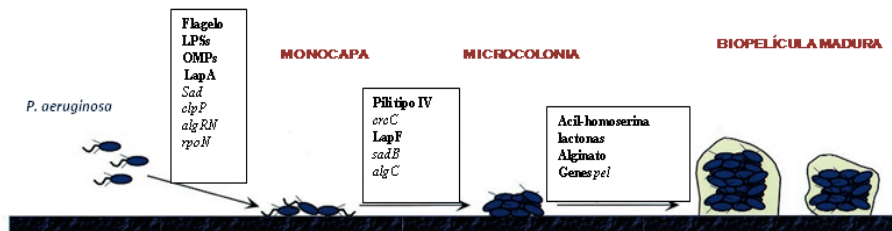
de la biopelícula madura, en gran parte gracias a la producción de la matriz de exopolisacáridos que cementará todo el conjunto (Danese *et al.*, 2000). El ambiente que se crea en la biopelícula favorece el crecimiento y la división de las células, permitiendo la fabricación de una mezcla de polímeros que excretan al exterior para mantener unidas las células, entre ellas y con la superficie. La composición del exopolímero es muy variable, pero en general consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares como glucosa, fructosa, manosa o N-acetilglucosamina. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Chmielewski y Frank, 2003). Si las condiciones ambientales lo permiten, la biopelícula se puede extender hacia áreas no colonizadas o liberar algunas células, que recuperan la condición de bacterias planctónicas que actúan como semillas, colonizando nuevas superficies.

### **C.1.3. Genética de la formación de las biopelículas.**

Los estudios genéticos realizados con especies como *Escherichia coli* (Pratt y Kolter, 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (O'Toole y Kolter, 1998a) o *Vibrio cholerae* (Watnick y Kolter, 1999) han mostrado que los determinantes genéticos varían en las diversas fases de la formación de las biopelículas (Watnick y Kolter, 1999).

La obtención de mutantes defectivos en la capacidad de formar biopelículas ha permitido identificar genes y funciones requeridas por las bacterias para la formación de estas estructuras en las distintas etapas de su desarrollo. La especie bacteriana Gram negativa asociada a plantas más estudiadas y de las que más datos disponemos hoy en día quizás sea

*Pseudomonas aeruginosa* (Davey y O’Toole, 2000; Karatan y Watnick, 2009) (Figura 8).



**Figura 8.** Modelo formación biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*. Figura actualizada de Davey and O’Toole, 2000).

Estos estudios han revelado que *P. aeruginosa* requiere de flagelos para la aproximación y unión de la célula a la superficie en las primeras etapas de la formación de una biopelícula (O’Toole y Kolter, 1998b). Esta interacción estaría mediada también por los LPSs y proteínas de membrana llamadas OMPs (“outer membrane proteins”). Las alteraciones en la composición de LPSs reducen la habilidad de *P. aeruginosa* de interactuar con superficies hidrofílicas (Makin y Beveridge, 1996). Estas OMPs podrían incluir las proteínas *Lap* (Large adhesión proteins) identificadas en otras especies de *Pseudomonas* como implicadas en adhesión y formación de biopelículas. La proteína *LapA* sería importante en la adhesión definitiva de la célula bacteriana al sustrato (Hinsa *et al.*, 2003) y la proteína *LapF* jugaría un papel importante en la unión célula-célula (Martínez-Gil *et al.*, 2010; Fuqua, 2010). Aunque no se conoce todavía su mecanismo, la proteína *SadB* (“surface attachment-defective”) estaría implicada también en la coordinación de la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*, así como en movilidad y unión permanente de las bacterias al sustrato (Caiazza y O’Toole, 2004; Caiazza *et al.*, 2007). Una vez se ha producido la unión a la

superficie, los mutantes defectivos en la biosíntesis de pili tipo IV son incapaces de formar micro colonias, quedándose las células en estadio de monocapa (O'Toole *et al.*, 2000; Klausen *et al.*, 2003; Gibiansky *et al.*, 2010). El gen *crc* codifica la proteína CrcC que regula *pilA* y *pilB*, genes que codifican proteínas estructurales del pili tipo IV y la mutación en dicho gen impide la formación de capas densas de células sobre la superficie (O'Toole *et al.*, 2000; Karatan y Watnick, 2009). El análisis de una librería no-redundante de mutantes al azar de *P. aeruginosa* (5.459 mutantes), en cuanto a la unión y formación de biopelículas en placas de PVC, permitió la identificación inicial de 416 mutantes alterados en la unión a esta superficie (Liberati *et al.*, 2006). Estos mutantes identificados tenían inserciones en genes implicados en la síntesis de flagelo (*fliP*, *fleR* y *sadR*), del pili (*pilC*), del operón *sad* (*sadB*, *sadA* y *sadR*), el gen *crc*, un regulador del exopolisacárido alginato (*algR*) y el regulador global *rpoN* (Liberati *et al.*, 2006). Respecto a las etapas finales de la formación y maduración de la biopelícula, se ha observado que en los mutantes de *P. aeruginosa* defectivos en la síntesis de acil-homoserin lactonas, (moléculas señal del proceso de *quorum sensing*), se vio radicalmente alterada la arquitectura de la biopelícula madura. Este hecho pone de manifiesto la importancia de la presencia de estas moléculas señal en las últimas etapas de dicha formación (Karatan y Watnick, 2009). Además de la comunicación entre células, un factor clave en la maduración de la biopelícula es la síntesis de alginato, exopolisacárido que forma parte de la matriz en *P. aeruginosa*, siendo *algC* y *algT* los genes identificados para esta síntesis (Garret *et al.*, 1999; Karatan y Watnick, 2009). Por otra parte, el locus *pel* (referido a *pellicle*, biopelícula formada en la interfase líquido-aire) contiene genes responsables de la síntesis de componentes de

la matriz de tipo mucílago teniendo un papel importante en la interacción y unión de *P. aeruginosa* a superficies bióticas (Karatan y Watnick, 2009).

#### **C.1.4. Tipos de biopelículas.**

Se han descrito tres modelos principales de biopelículas de acuerdo a su estructura. El modelo de biopelícula con canales de agua es el más conocido. Las bacterias se agregan formando una estructura globular en forma de cono o “seta” que se eleva sobre la superficie de adhesión, uniéndose a ella mediante un “tallo” formado por EPSs, adquiriendo todo el conjunto aspecto de torre. El “tallo” sería, de alguna manera, la prolongación de los EPSs que también forman parte de la matriz de la biopelícula en el que las células quedan embebidas. Este material extracelular se extiende entre las distintas torres, formando una red de canales o túneles que atraviesan la estructura. Muchos de estos canales presentan también bifurcaciones de menor tamaño que se intercalan en las microcolonias (De Beer *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1991. Wimpenny y Colasanti, 1997; Morris y Monier, 2003). Los canales permiten la circulación del agua y su principal función parece ser la de proporcionar a las bacterias accesibilidad y renovación de nutrientes. Además, la hipótesis es que favorecen el mantenimiento de la homeostasis de las células bacterianas y la interacción entre los microorganismos que forman la biopelícula (Wimpenny y Colasanti, 1997; Morris y Monier, 2003).

Un segundo modelo de biopelícula es el llamado “mosaico heterogéneo” y es el modelo típico de biopelícula que se forma en sistemas de distribución de agua como las tuberías. Las células se agregan en estructuras globulares similares a las descritas en el anterior modelo,

aunque no conectadas entre ellas mediante canales, resultando “torres” de células separadas unas de otras (Keevil y Walker, 1992; Walker *et al.*, 1995).

El modelo de biopelícula densa es el que encontramos en la placa dental. En este tipo de biopelícula las bacterias se disponen organizadamente formando una estructura densa y compacta donde no existen poros o canales por donde circule el agua. Hay numerosas microcolonias, donde las células tienen una forma similar y, presumiblemente, son clones formados a partir de unas pocas bacterias iniciales (Listgarten, 1976; Nyvad, 1993; Marsh, 1995; Wimpenny y Colasanti, 1997). En las biopelículas densas también hay una matriz de EPSs donde están embebidas las bacterias, uniéndose fuertemente unas con otras. Según algunos autores este tipo de biopelícula también corresponde al formado sobre superficies inertes, como los catéteres médicos, aunque en este caso sí parecen existir canales de agua (Ganderton *et al.*, 1992; Stickler *et al.*, 1993).

#### **C.1.5. Factores relacionados con la formación de biopelículas.**

La movilidad tiene gran importancia en la colonización de superficies, siendo ésta el primer paso en la formación de biopelículas, así como en la expansión lateral de las células agrupadas. De hecho, la habilidad para propagarse rápidamente en una superficie, después de la adhesión inicial, supone una ventaja significativa para la formación de biopelículas mixtas en la naturaleza (An *et al.*, 2006).

En las plantas se producen exudados en sitios específicos de la raíz, y las bacterias prefieren estas zonas para iniciar la colonización, ya que ahí



encuentran condiciones óptimas de disponibilidad de nutrientes. Para localizar estas áreas y llegar hasta ellas antes que sus competidores, las bacterias pueden desplazarse mediante distintos mecanismos, ya que tienen la capacidad de propulsarse ellas mismas a través del medio que las rodea en respuesta a gradientes, tanto químicos como físicos (Danhorn y Fuqua, 2007). La movilidad y la quimiotaxis bacteriana juegan roles vitales en la ecología de las poblaciones. La quimiotaxis consiste en el movimiento de los microorganismos bajo la influencia de un gradiente químico que los ayuda a encontrar condiciones óptimas para su crecimiento y supervivencia. La detección química de ciertos sustratos mediante quimiorreceptores de la superficie celular puede generar cambios en la dirección de movimiento de las bacterias. La quimiotaxis contribuye a la virulencia de los patógenos como *Agrobacterium* spp., y también promueve la formación de biopelículas atrayendo a las bacterias hacia superficies con nutrientes. Esto se considera un importante mecanismo de adaptación, ya que les proporciona una posición espacial óptima a escala microscópica. En general, las bacterias se desplazan utilizando apéndices externos como los pili o los flagelos. La rotación de uno o de los múltiples flagelos de la bacteria da como resultado el desplazamiento a través de fluidos, denominado “swimming”, o el deslizamiento por superficies húmedas o “swarming” (Berg, 2003; Merrit *et al.*, 2007). El pili tipo IV media el desplazamiento llamado “twitching”, un modo de traslocación por superficies húmedas, independiente del flagelo, que ocurre por la extensión, fijación y retracción del pili, produciendo una extensión direccional con la posterior despolimerización del pili (Mattick, 2002). Algunas bacterias, como *P. aeruginosa*, utilizan el *pili* tipo IV para moverse hacia delante y soltarse de una superficie (Gibiansky *et al.*, 2010).

La movilidad bacteriana no sólo es importante en las primeras etapas de colonización y de formación de biopelículas sino que también es esencial en sus últimas fases. Una vez formada la biopelícula madura, las células bacterianas pueden dispersarse hacia nuevos hábitats susceptibles de ser colonizados (Sauer *et al.*, 2002).

Por otra parte, el mecanismo de *quorum sensing* contribuye al control de la expresión de genes dependientes de densidad celular. Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolle comportamientos sociales coordinados. En bacterias Gram negativas, las moléculas sensoras que intervienen en este mecanismo son las acil-homoserin-lactonas. Estas moléculas difunden al interior de la célula diana y, cuando están en concentración suficiente, se unen a unos receptores especiales provocando un cambio en su conformación. El complejo entre la sustancia y el receptor se une a sitios específicos del ADN y ello conduce a que se transcriban determinados genes y se produzcan las proteínas quorum.

Como ya se ha indicado anteriormente, *Agrobacterium* sp. detecta heridas en las raíces y se aproxima a ellas, iniciando el proceso de infección en la planta. La movilidad tipo *swimming* es conocida en las tres especies principales del género *Agrobacterium*; *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis*. En *A. tumefaciens* está mediada por un pequeño grupo de flagelos localizados en la región polar o subpolar de la célula. Así *A. tumefaciens* C58 presenta múltiples flagelos polares (Chesnokova *et al.*, 1997) similares a los estudiados en *Sinorhizobium meliloti* (Armitage y Schmitt, 1997; Schmitt, 2002). La mayor parte de genes relacionados con la movilidad por flagelos en la cepa C58 se encuentran en el cromosoma ¿1 o 2? (*Atu0543* al

*Atu058*), incluyendo cuatro genes homólogos de flagelina (Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Se ha observado que los mutantes en tres de estos cuatro genes resultan no móviles y su virulencia se ve reducida (Chesnokova *et al.*, 1997). El genoma de *A. tumefaciens* C58 contiene aproximadamente 20 genes que codifican proteínas relacionadas con la quimiotaxis, para el control de la movilidad (Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001), localizados dentro del operón *che* (*Atu0514* al *Atu0522*), cerca de los genes relacionados con el flagelo (Wright *et al.*, 1998). Hay estudios realizados con mutantes de la cepa C58 en los que células sin flagelo, o con flagelos no móviles, estaban también disminuidas significativamente en su capacidad de formar biopelículas sobre PVC en condiciones estáticas (Merrit *et al.*, 2007). Recientemente, también se ha descrito la movilidad tipo *swarming* en *A. vitis*, asociada con la secreción de sustancias surfactantes, regulándose este comportamiento por un sistema de *quorum sensing* (Süle *et al.*, 2009a). Las cepas estudiadas de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* no presentan este fenotipo, así que por el momento no hay evidencia de movimiento tipo *swarming* en estas especies.

Se ha establecido un posible modelo para explicar el papel de la movilidad y la quimiotaxis en la formación de biopelículas por la cepa C58 de *A. tumefaciens* en el que se postula que la transición de la unión inicial a la permanente requiere la regulación de la rotación flagelar. Una vez que las células están sésiles, ya no requieren movilidad. A medida que madura la biopelícula, algunas señales como las quimiotácticas pueden volver a estimular la movilidad. Las bacterias liberadas en la fase planctónica tienen el potencial de colonizar nuevos nichos y de este modo promover la expansión lateral de la biopelícula.

### **C.1.6. Biopelículas en la rizosfera.**

La rizosfera, en comparación con el suelo distante de las raíces, es un nicho rico en nutrientes y de abundante contenido en agua. Estas dos características favorecen enormemente la viabilidad, la permanencia, el crecimiento y la expansión de las bacterias (Normander *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2000). De hecho, las raíces de las plantas están expuestas a una altísima diversidad microbiana. El genotipo de la planta y el estado fisiológico de sus células, junto con las características del suelo, determinan la composición y el tamaño de estas poblaciones bacteriana. Además del contenido en agua y nutrientes del suelo, otras características que tienen influencia son el pH, la composición mineral, las especies de plantas existentes, el estado fisiológico de esas plantas y la presencia de otras especies bacterianas que coexisten en el mismo hábitat (Albereda *et al.*, 2006). Las poblaciones bacterianas que viven en el suelo se movilizan hacia las raíces atraídas por exudados procedentes de las plantas y colonizan diferentes áreas de las mismas: ápice, zona de elongación y pelos radiculares (Semenov *et al.*, 1999; Watt *et al.*, 2006). La zona de elongación, inmediatamente a continuación del ápice radicular, parece ser la de menor adherencia bacteriana.

Las bacterias que interactúan con plantas pueden ser patógenos, comensales o mutualistas, y para ellas la capacidad de formar biopelículas puede ser ventajosa, cuando no esencial. El ejemplo más característico de relación beneficiosa planta-microorganismo es la interacción entre especies del género *Rhizobium* y plantas leguminosas, en las que se forman nódulos fijadores de nitrógeno. Primero, *Rhizobium* sp. se une a su huésped específico a través de polisacáridos que interactúan con lectinas de la planta, o bien mediante proteínas dependientes de calcio llamadas

actualmente adhesinas Rap (Smit *et al.*, 1989; Laus *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2006). En el caso de *S. meliloti*, se requiere el exopolisacárido succinoglicano para una simbiosis efectiva, y su nivel de expresión afecta a la colonización de la superficie de la raíz (Fujishige *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2006). Estas bacterias estimulan la producción de pelos radiculares y se introducen en la planta a través de ellos migrando y colonizando las células del córtex de la raíz, estableciendo una relación de endosimbiosis con la planta (Gage, 2004). Se considera que estas bacterias forman biopelículas especializadas en las zonas de colonización.

No obstante, los modelos de la rizosfera más estudiados son los de bacterias del género *Pseudomonas*. Muchas especies de este género promueven el crecimiento de plantas huésped y, además, se utilizan como agentes de biocontrol (Lugtenberg *et al.*, 2002; Albereda *et al.*, 2006). Por ejemplo, *P. putida* responde rápidamente a la presencia de exudados de la raíz, colonizando estas zonas y formando biopelículas maduras y estables (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002). Las células se disponen a lo largo de los surcos epidérmicos de la raíz en pequeñas biopelículas de forma discontinua y heterogénea (Bloemberg *et al.*, 2000). Por otra parte, estudios más recientes revelan que especies patógenas de *Pseudomonas* spp. forman biopelículas densas y extensas sobre la superficie de la raíz de la planta que colonizan (Bais *et al.*, 2004; Ramey *et al.*, 2004a; Walker *et al.*, 2004). La movilidad flagelar y por “twitching” parecen tener un papel significativo en la colonización de la raíz, aunque no son imprescindibles para una permanencia efectiva (Vande Broek y Vanderleyden, 1995; Turnbull *et al.*, 2001). La proteína de superficie LapA (“large adhesion protein” A), identificada en *P. fluorescens*, es requerida por la bacteria para la transición

de unión reversible a unión irreversible en superficies abióticas (Hinsa *et al.*, 2003). También se ha visto que los mutantes deficientes en unión a semillas y raíz de *P. putida* presentan un defecto en *lapA* (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la proteína LapA tiene función de adhesina durante la unión de la bacteria a la planta y en la posterior formación de biopelícula. Recientemente, también se ha descrito que la proteína LapF determina el establecimiento de interacciones célula-célula durante el desarrollo sésil de las biopelículas en *P. putida* (Martínez-Gil *et al.* 2010; Fuqua, 2010).

Las biopelículas confieren el mismo tipo de ventajas a los patógenos y a los comensales. La adhesión a la superficie es el primer paso en la patogénesis, y la agregación favorece la virulencia y la protección frente a defensas de la planta (Morris y Monier, 2003). Por ejemplo, *P. aeruginosa* forma biopelículas en las raíces de albahaca, que la protegen del compuesto antibacteriano ácido rosmarínico sintetizado por la propia planta (Walker *et al.*, 2004). Otro ejemplo muy característico de la implicación de la formación de biopelículas en la interacción patógeno-planta es el de *Agrobacterium* spp., que se aborda específicamente en el siguiente apartado.

#### **C.1.7. Biopelículas en *A. tumefaciens*.**

Los estudios realizados con *A. tumefaciens* muestran que es capaz de formar biopelículas densas y estructuralmente complejas, tanto en superficies abióticas como sobre la superficie de la raíz (Danhorn *et al.*, 2004; Ramey *et al.*, 2004b). Como en muchos otros procesos, la regulación

de genes específicos tiene un papel muy importante en el control de las interacciones bacteria-superficie en todas sus etapas: adhesión, maduración y dispersión (Kuchma y O'Toole, 2000).

Los primeros pasos del mecanismo por el cual la bacteria se adhiere a la raíz están todavía por describir con precisión. La unión bacteria-raíz estaría mediada por una adhesina no identificada, además de la producción de fibrillas de celulosa y  $\beta$ -glucanos cíclicos, por parte de la bacteria, que ayudarían a un anclaje más firme a la superficie de la raíz (Douglas *et al.*, 1982; Matthyse, 1987). Se hipotetiza que la adhesión inicial, durante la patogénesis, es una interacción débil con la superficie de la planta, formándose después una asociación más estable tras la producción de fibras de celulosa (Matthyse, 1983). Por otra parte, se ha visto que los mutantes de *A. tumefaciens* deficientes en motilidad y quimiotaxis ven reducida su virulencia y su capacidad para formar biopelículas (Chesnokova *et al.*, 1997; Merrit *et al.*, 2007).

Se ha identificado un mutante en regulación de *A. tumefaciens* C58 que es deficiente en el desarrollo de biopelículas maduras tridimensionales, pero que sigue siendo válido en las interacciones iniciales con las superficies (Ramey *et al.*, 2004b). Este mutante está afectado en un gen llamado *sinR*, perteneciente a la familia FNR de reguladores transcripcionales. Se ha propuesto un modelo en cascada de señales, iniciada por FnrN, que responde a la limitación de oxígeno, activando la represión de *sinR* cuando los niveles de oxígeno son bajos, e influyendo así en la formación de biopelículas (Ramey *et al.*, 2004b). La limitación de oxígeno es una condición que se da comúnmente en la rizosfera y también dentro de la biopelícula (Okinaka *et al.*, 2002). El mutante *sinR* desarrolla biopelículas dispersas y poco densas, tanto sobre la superficie de la raíz como en

superficies abióticas como el vidrio y PVC, dejando en evidencia el papel esencial de este gen en el proceso de maduración de la biopelícula (Ramey *et al.*, 2004b). De forma similar, la limitación de fósforo es común en la rizosfera, ya que se da un secuestro por parte de la planta. Los niveles bajos de fósforo en el ambiente estimulan la adhesión de la bacteria a la superficie y la posterior formación de biopelículas en *A. tumefaciens* C58, tanto sobre superficies vivas como inertes (Danhorn *et al.*, 2004). Este proceso está regulado por el sistema de dos componentes PhoR-PhoB, presente en gran número de bacterias (Wanner, 1996) y altamente conservado en los miembros de la familia *Rhizobiaceae*. La misma región del genoma que codifica PhoR y PhoB en *A. tumefaciens* está presente en *S. meliloti* funcionando de manera muy similar aunque en dicha bacteria este proceso se ha estudiado más en profundidad (Geiger *et al.*, 1991; Rüberg *et al.*, 1999). En vista de esta similaridad, es sorprendente que no se haya podido lograr un mutante de *A. tumefaciens* nulo en *phoR* y *phoB*. Esto sugiere que este sistema de dos componentes sería esencial para la viabilidad de *A. tumefaciens*, diferenciándose de *S. meliloti* (Bardin y Finan, 1998; Danhorn *et al.*, 2004). Barbosa y Benedetti (2007) han identificado un represor transcripcional, denominado BigR, que regula un operón implicado en la formación de biopelículas también en *A. tumefaciens* C58.

Los estudios sobre la formación de biopelículas realizados hasta el momento se han centrado en la cepa C58 de *A. tumefaciens*. Los datos que encontramos al respecto en otras cepas o especies importantes del género, como *A. rhizogenes* K84 y *A. vitis*, son nulos o muy escasos a pesar de su importancia como agente de biocontrol en el primer caso y como patógenos de un cultivo importante como la vid, en el segundo.

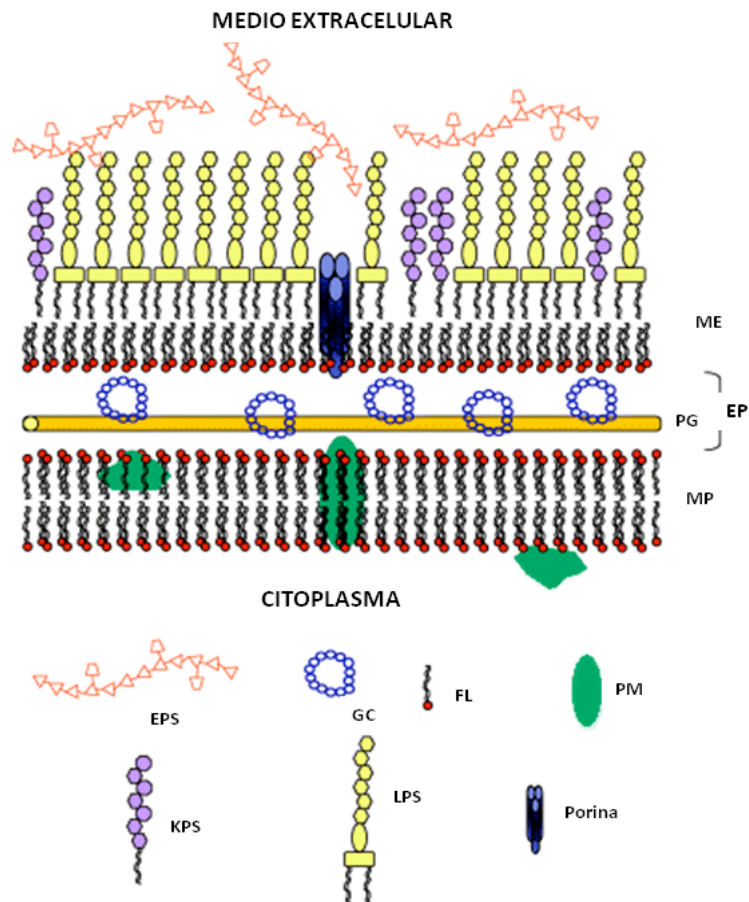


## **C.2. Polisacáridos de la envoltura celular bacteriana.**

### **C.2.1. Lipopolisacáridos (LPS).**

Todas las células poseen una membrana citoplasmática que delimita el interior celular y las bacterias Gram negativas evolucionaron desarrollando una segunda membrana exterior a la citoplasmática (Figura 9). Esta membrana externa tiene una configuración asimétrica: la cara interna está compuesta por fosfolípidos, mientras la externa está compuesta mayoritariamente por lipopolisacáridos (LPS) (Ormeño-Orillo, 2005).

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos que se pueden dividir estructuralmente en tres dominios: esquema LPS (por ejemplo pag 120 Libro "The Rhizobiaceae" El lípido A, el núcleo oligosacárido (NO) y el antígeno O. El lípido A está constituido de un disacárido al que están unidos ácidos grasos, los cuales anclan las moléculas de LPS a la membrana externa. Una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A constituye el NO. El antígeno O es un polisacárido formado por unidades repetidas de monosacáridos u oligosacáridos muy variables, está unido al NO y es el dominio distal de la molécula de LPS (Raetz y Whitfield, 2002).



**Figura 9.** Esquema de la superficie celular de las Rizobiaceas y disposición de los polisacáridos de superficie envueltos en la unión a la raíz de plantas. ME, membrana externa; EP, espacio periplásmico; PG, capa peptidoglucano; MP, membrana plasmática; EPS, exopolisacáridos; GC, glucanos cíclicos; FL, fosfolípidos; PM, proteína de membrana; KPS, polisacárido capsular (antígeno-K); LPS, lipopolisacárido. (Tomada de Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

En 2004 se determinó la estructura del lípido A de *A. tumefaciens* C58 (Silipo *et al.*, 2004). El análisis reveló una mezcla de moléculas que variaban en el patrón de acilación. Las moléculas más abundantes constan de un disacárido de glucosamina, bifosforilado, penta-acilado, con el mismo ácido graso extra largo y en la misma posición que en otros géneros de la familia, como *Rhizobium* sp. El proceso de biosíntesis del lípido A está altamente conservado (Raetz, 1990; Raetz y Whitfield, 2002). En *A. tumefaciens* C58 no se han descrito específicamente las actividades enzimáticas necesarias para la síntesis de precursores de las moléculas que componen el lípido A, pero sí se han encontrado posibles genes ortólogos que codifican para estas enzimas en otras especies, como *R. leguminosarum* y *R. etli* (Price *et al.*, 1994; Karbarz *et al.*, 2003).

El núcleo oligosacárido (NO) es el dominio que ha sido estudiado con menos detalle a nivel estructural. Se completó la estructura de dos NO en *Rhizobiaceae*: una cepa de *R. etli* (Forsberg y Carlson, 1998) y una cepa de *A. larrymoorei* que sólo produce LPS rugoso (Molinari *et al.*, 2003). Los LPS de *A. tumefaciens* no fueron reconocidos por los anticuerpos dirigidos contra el NO de *R. etli*, por lo que sus NO deben ser diferentes (Lucas *et al.*, 1996). *A. larrymoorei* está relacionada con *A. tumefaciens* y forma tumores aéreos en *Ficus benjamina* (Bouzar y Jones, 2001). La estructura de su NO contiene azúcares que encontramos en otras especies de la familia *Rhizobiaceae* como glucosa, galactosa y Kdo (ácido 2-ceto-3-desoxi-D mano octulosónico), aunque, por otro lado, también presenta diferencias como la presencia de ramnosa (Molinari *et al.*, 2003).

El antígeno O es la parte más variable de la molécula de LPS. Esta variabilidad surge por la naturaleza, el orden y los enlaces de los diferentes

azúcares que la componen, así como por metilaciones y acetilaciones, que añaden complejidad a la molécula (Kannenberg *et al.*, 1998). Se han descrito las estructuras del antígeno O de varias cepas de *A. tumefaciens*: la C58 (De Castro *et al.*, 2003), la cepa DSM 30205 (De Castro *et al.*, 2002) y la cepa F/1 (De Castro *et al.*, 2004). Sin embargo, se sabe que el antígeno O puede no estar presente en algunas especies e incluso en algunas cepas de una misma especie. Cuando esto sucede, generalmente las colonias presentan una apariencia rugosa y el LPS producido se denomina LPS rugoso o LPS II. Las moléculas que sí tienen el antígeno O son llamadas LPS liso o LPS I (Reatz y Whitfiels, 2002).

Los LPS son componentes mayoritarios de la membrana externa de las células Gram negativas y, por su ubicación, son importantes mediadores de las interacciones entre estas bacterias y su medio ambiente y otros organismos (Ormeño-Orrillo, 2005). Gracias a los LPS la membrana externa tiene la capacidad de excluir compuestos hidrofóbicos, constituyendo así una barrera de permeabilidad protectora contra muchos antibióticos y xenobióticos (Lerouge & Vanderleyden, 2002; Firdich & Whitfield, 2005). Además, los polisacáridos de superficie, incluyendo los LPS, intervienen en la interacción entre las plantas y las bacterias simbiotes o patógenas de éstas (Frayse *et al.*, 2003). En especies de *Rhizobium*, por ejemplo, los LPS son esenciales para que las bacterias colonicen las células del interior de los nódulos del huésped (Kannenberg *et al.*, 1998). En especies de *Agrobacterium* los LPS son factores de virulencia que intervienen en la adhesión de las células a las raíces de la planta hospedadora (Metts *et al.*, 1991).

### C.2.2. Glucanos cíclicos (GC).

Los  $\beta$ -glucanos cíclicos (GC) se encuentran en el espacio periplásmico celular, aunque también se excretan al medio (Abe *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1986; Miller y Gore, 1992; Breedveld y Miller, 1994). El transporte de estas moléculas al medio extracelular varía según la especie y la fase de crecimiento en la que se encuentran las células (Zevenhuizen, 1986; Breedveld *et al.*, 1990; Breedveld *et al.*, 1991; Hisamatsu, 1992;), el medio de cultivo utilizado y la temperatura de incubación (Breedveld *et al.*, 1990; Breedveld *et al.*, 1991; Geiger *et al.*, 1991).

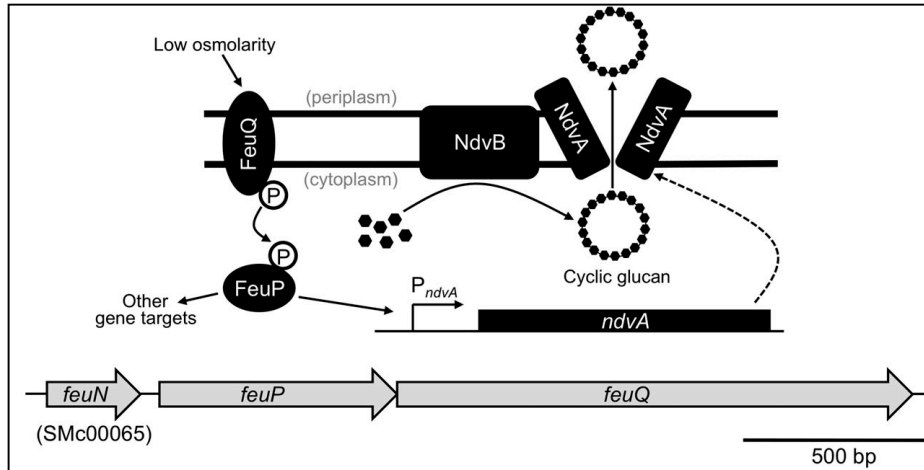
Los GCs son moléculas cíclicas formadas por 6-13 residuos de glucosa. Se encuentran casi exclusivamente en la familia *Rhizobiaceae* y alcanzan concentraciones del 5 al 20% del peso seco total de la célula dependiendo de las condiciones de cultivo. Los GC de las rhizobiaceas son similares estructuralmente a los MDOs “membrane-derived oligosaccharides” de *E. coli*. Se trata de una familia de glucanos que se encuentran también en el espacio periplásmico de bacterias Gram negativas (Schulman y Kennedy, 1979; Bohin, 2000). El primer dato sobre GC lo encontramos en una cita sobre *A. tumefaciens* en 1942 (McIntire *et al.*, 1942). Posteriormente se encontraron en *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp. y otras especies de *Agrobacterium*. En los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, estas moléculas contienen residuos de glucosa unidos únicamente por enlaces glicosídicos del tipo  $\beta$ -(1-2). Sin embargo, en otros géneros como *Bradyrhizobium*, los enlaces entre glucosas son  $\beta$ -(1-3) o  $\beta$ -(1-6). Aunque estas moléculas contienen glucosas como única hexosa, se pueden encontrar sustituyentes no sacarídicos como X-1-fosfoglicerol, ácido succínico o fosfoetanolamina (Schulman y Kennedy, 1979).

En el cromosoma de *A. tumefaciens* C58 se han identificado los genes *chvA* y *chvB*, implicados en el transporte y la síntesis de  $\beta$ -glucanos cíclicos, y que son también requeridos para la virulencia y la unión de la bacteria a la planta (Douglas *et al.*, 1985).

Las cepas de *Rhizobium* spp. poseen dos genes homólogos que, además de codificar funciones relacionadas con los glucanos cíclicos, también están implicados en el desarrollo de nódulos en la planta: *ndvA* y *ndvB* (Figura 8). Se demostró que estos genes descubiertos en *S. meliloti* eran funcional y estructuralmente homólogos a *chvA* y *chvB* de *A. tumefaciens* (Dylan *et al.*, 1986). ChvA y NdvA son las proteínas implicadas en el transporte de  $\beta$ -(1,2)-glucanos cíclicos al exterior extracelular (Cangelosi *et al.*, 1987; Stanfield *et al.*, 1988), mientras que ChvB y NdvB son proteínas de elevado peso molecular, situadas en la membrana citoplasmática, implicadas en la síntesis de estos glucanos cíclicos a partir de UDP-glucosa (Zorreguieta *et al.*, 1985; Zorreguieta y Ugalde, 1986; Geremia *et al.*, 1987; Ielpi *et al.*, 1990). Estas proteínas parecen tener gran importancia para la interacción de la bacteria con la planta huésped, tanto si es patógena como si es simbiote. Los estudios sobre la síntesis de GC *in vitro* muestran que las enzimas implicadas en la biosíntesis de  $\beta$ -(1,2)-glucanos cíclicos se activan mediante iones metálicos como el  $Mn^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$  (Breedveld y Miller, 1994).

Los GC tienen una función importante en la osmorregulación celular, ya que su síntesis es inversamente proporcional a la osmolaridad del medio externo (Miller *et al.*, 1986; Lequette *et al.*, 2004). Además, son también importantes en la virulencia, ya que mutantes en la síntesis de GC producen menos síntomas en sus plantas huésped y se obtiene una

respuesta menos evidente en las planta no-huésped (Mukhopadhyay *et al.*, 1988; Page *et al.*, 2001; Minsavage *et al.*, 2004). La síntesis de GC está regulada en función de estímulos externos transcripcional y/o post-transcripcionalmente, dependiendo de la especie bacteriana. En la especie *S. meliloti* se ha descrito un sistema sensor de dos componentes, el sistema FeuP-FeuQ, que regula la transcripción de múltiples genes, incluyendo el gen *ndvA*, que codifica la proteína NdvA, implicada en el transporte de GC (Griffitts *et al.*, 2008) (Figura 10). FeuQ es una proteína sensor del tipo histidina-quinasa, situada en la membrana cioplasmática de la célula, que detecta el bajo nivel de osmolaridad en el medio. FeuQ fosforila a FeuP, un regulador de respuesta del citoplasma que activa la transcripción de determinados genes, entre ellos *ndvA* (Griffitts *et al.*, 2008; Carlyon *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito una tercera proteína llamada FeuN, cuya función es regular negativamente el sistema FeuP-FeuQ. Se han encontrado genes ortólogos de *feuP*, *feuQ* y *feuN* en *A. tumefaciens* C58 (Carlyon *et al.*, 2010). En la Figura 10 se muestra un esquema de este sistema.



**Figura 10.** Esquema del funcionamiento del sistema FevP-FevQ y genes implicados en el transporte de GC. (Tomado de Carlyon *et al.*, 2010).

Se ha estudiado el fenotipo de cepas mutantes en los genes *chvA* y *chvB* de *A. tumefaciens* C58 y se ha visto que los mutantes en el gen *chvB* son incapaces de sintetizar GC tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ven afectados en su capacidad para crecer en condiciones de baja osmolaridad, son avirulentos y más sensibles a ciertos antibióticos (Schulman y Kennedy, 1979; Douglas *et al.*, 1985; Zorreguieta y Ugalde, 1986; Smit, 1988). Por otra parte, se observó que los mutantes en *chvA* sintetizaban GC tanto *in vitro* como *in vivo*, pero estaban disminuidos en su capacidad de crecer en medios con baja osmolaridad, eran avirulentos, no tenían una unión eficiente a las superficies y no tenían GC en el exterior de la célula (Douglas *et al.*, 1985; Puvanesarajah *et al.*, 1985; Okada *et al.*, 1985; Zorreguieta y Ugalde, 1986; Iñón de Iannino y Ugalde, 1989; Cangelosi *et al.*, 1989).



### **C.2.3. Polisacáridos capsulares (CPS).**

Los polisacáridos capsulares (CPS) forman una capa adherente y cohesiva sobre la superficie de la célula. La estructura de los CPS no está muy estudiada en el género *Agrobacterium*, aunque muchas veces se extrapolan rasgos descritos en el género *Rhizobium* (De Castro *et al.*, 2007). En algunas cepas de *Rhizobium* spp. estos CPS tienen carácter ácido, se caracterizan por contener una alta cantidad de Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico) y son estructuralmente análogos a CPS del grupo II del antígeno K de *E. coli* (Reuhs *et al.*, 1993). Por ello, se denominaron polisacáridos tipo antígeno K o KPS. Se han descrito KPS en diversos rizobios, como *S. meliloti* y *S. fredii* (Reuhs *et al.*, 1993). Aunque la estructura del KPS es muy heterogénea según la cepa, existen evidencias de diferencias entre los CPS de *Rhizobium* sp. y de *A. rubi* DSM 6772, que contiene grupos O-acetil, en mayor o menor cantidad dependiendo de la fase de crecimiento (De Castro *et al.*, 2007). Además, *A. rubi* DSM6772 produce un CPS compuesto por un azúcar poco común: 6-deoxy-L-talosa, anclado fuertemente a la membrana.

Estos polisacáridos están estrechamente asociados a la bacteria a través de su unión al lípido A anidado en la membrana externa (Figura 9), no contribuyen a la mucosidad de las colonias y están presentes en numerosas bacterias (Patrick *et al.*, 2009). Los CPS constituyen una matriz hidratada que le confiere a la bacteria resistencia a bacteriófagos y a las condiciones de sequedad frecuentes en la rizosfera. En *Sinorhizobium* spp. se ha probado que, por una parte, están implicados activamente en la señalización bacteria-planta y, por otra, tienen una función de enmascaramiento de la bacteria, protegiéndola de los productos de

defensa de las plantas, así como de otras bacterias (Rodríguez-Carvajal *et al.*, 2001; De Castro *et al.*, 2007).

En *A. rubi* se ha comprobado experimentalmente que la aparición de grupos O-acetil está retrasada respecto a la producción del polisacárido, alcanzando la máxima acetilación en las últimas etapas del crecimiento. La necesidad de esta acetilación parece estar ligada a un incremento de la hidrofobicidad, de manera que el polímero podría tener un papel importante en la adhesión a heridas en la raíz de las plantas o incluso para formar biopelículas (De Castro *et al.*, 2007).

#### **C.2.4. Exopolisacáridos (EPS).**

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de azúcares que secretan las bacterias al medio externo con poca o ninguna asociación directa a la célula, pero que forman una capa externa alrededor de la superficie celular (Becker y Pühler, 1998) (Figura 9) Generalmente, son muy heterogéneos en su composición, ya que cada especie bacteriana es capaz de sintetizar distintos tipos de EPS.

Uno de los EPS más estudiados en el complejo *Agrobacterium/Rhizobium* son los succinoglicanos formados por unidades repetidas de octopolisacáridos de D-glucosa, D-galactosa en la proporción 7:1 (Becker y Pühler, 1998). También pueden contener piruvato, succinato y grupos acetil (Zevenhuizen, 1997). Otro EPS estudiado en *A. tumefaciens* C58 es la celulosa, que es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa unidas entre sí mediante enlaces  $\beta$ -1-4-O-glicosídico. La celulosa tiene una estructura lineal y fibrosa, en la que se establecen

múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las distintas cadenas de glucosa, lo que hace que sea insoluble en el agua.

Debido a las propiedades y la localización de los EPS, contribuyen a proteger las bacterias contra estreses ambientales y tienen un importante papel en la unión a superficies, la captación de nutrientes, la defensa ante el huésped y la formación de biopelículas (Becker y Pühler, 1998). Durante la interacción de *A. tumefaciens* C58 con la superficie de la planta, ésta estimula la síntesis de fibras de celulosa por parte de la bacteria (Matthysse *et al.* 1981; Matthysse, 1983). Los mutantes de *A. tumefaciens* incapaces de sintetizar celulosa ven reducida su capacidad de unión a la superficie de la planta y son muy fáciles de eliminar mediante lavados. Además, cuando son deficientes en la producción de celulosa presentan una reducción en su capacidad para colonizar y crecer en las raíces (Matthysse y McMahan, 1998). Los mutantes superproductores de celulosa de *A. tumefaciens* no mostraron diferencias en adhesión con la cepa silvestre, pero fueron capaces de formar biopelículas más espesas aunque más frágiles y fáciles de disgregar (Matthysse *et al.*, 2005; Danhorn y Fuqua, 2007). Tanto los mutantes deficientes como los superproductores de celulosa fueron menos eficientes que la cepa silvestre en la colonización de la raíz (Matthysse *et al.*, 2005).

El succinoglicano tiene un papel importante en la producción de biopelículas, tanto en las etapas iniciales como en su proceso de maduración y expansión. Esto se demuestra cuando mutantes en genes implicados en la síntesis de este EPS repercuten en fenotipos tales como la adhesión a superficies abióticas y bióticas, la movilidad por flagelos y la mucosidad de la superficie celular (Tomlinson *et al.*, 2010). Se han descrito

mutantes deficientes en succinoglicano que se adhieren a la superficie de las raíces, mientras que los mutantes superproductores ven reducida su capacidad de adhesión (Ramey *et al.*, 2004a).

En *S. meliloti*, ExoS y ChvI constituyen un sistema regulador de dos componentes capaz de activar la producción de succinoglicano (Cheng y Walker, 1998a). ChvI es el regulador transcripcional que es activado por ExoS, el sensor histidín quinasa. Este sistema de dos componentes está regulado negativamente por la proteína periplásmica ExoR (Wells *et al.*, 2007), que ha sido descrito recientemente en *A. tumefaciens* (Tomlinson *et al.*, 2010). Se identificaron mutantes deficientes en la formación de biopelículas sobre PVC, uno de los cuales presentaba disrupción del gen *exoR*. Este mutante presentaba deficiencias en su capacidad de adhesión tanto a superficies inertes como a raíces, era hipermucoso debido a la superproducción de succinoglicano y, además, tenía disminuida su movilidad (Tomlinson *et al.*, 2010). Los mutantes en *exoR* de *S. meliloti* no móviles muestran capacidad de formar biopelículas; esto se debe a que mutantes que tienen disminuida la actividad de ChvI pueden suprimir su defecto en movilidad y restaurar la capacidad de formar biopelícula (Wells, 2007). Por el contrario, en *A. tumefaciens* la regulación que la proteína ExoR ejerce sobre los fenotipos de formación de biopelículas, movilidad y producción de EPSs no parece requerir necesariamente el sistema de dos componentes ChvG (ExoS/ChvI) (Tomlinson *et al.*, 2010). La pérdida de funcionalidad en este sistema no restaura el fenotipo silvestre. Por esto, la proteína ExoR en *A. tumefaciens* parece tener funciones que responden a señales distintas a las de *S. meliloti* (Tomlinson *et al.*, 2010).

Los EPS juegan un papel importante en distintos aspectos de la biología de las bacterias, como la formación de biopelículas. Las células embebidas en este material extracelular quedan unidas entre ellas. Los EPS forman parte de la matriz de la biopelícula junto con otros componentes como ácidos nucleicos, proteínas, productos de lisis y agua (Zhang *et al.*, 1998). La matriz de la biopelícula determina las características físico-químicas de la misma y será determinante en su estructura junto con las condiciones del medio donde se desarrolle (Wimpenny y Colasanti, 1997; Sutherland, 2001).

### **C.3. Biopelículas y biocontrol.**

La formación de una biopelícula es un modo de mantener una masa crítica de células, en una localización específica, durante períodos suficientemente largos como para iniciar interacciones beneficiosas con las plantas hospedadoras. La alta densidad celular permite llevar a cabo ciertos procesos que las células solitarias no pueden acometer de modo eficiente, como la producción de metabolitos o exoenzimas que sólo son efectivos por encima de una concentración umbral. Además, las biopelículas confieren resistencia a ciertos tipos de estrés ambiental, protegen de la predación por protozoos, y favorecen la transferencia horizontal de genes.

Existen escasos estudios que demuestran una relación directa entre la formación de biopelículas y la eficacia del biocontrol. Uno de los pocos ejemplos conocidos sería el patosistema *Pseudomonas syringae*-raíz de *Arabidopsis* y su control por *Bacillus subtilis* (Bais *et al.*, 2004). Se obtuvo un mutante de *B. subtilis* deficiente en formación de biopelículas, y se

demostró que la habilidad para controlar la infección por *P. syringae* era directamente proporcional a la capacidad del agente de biocontrol para colonizar y formar biopelículas sobre la superficie de las raíces de *Arabidopsis* (Bais *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado que dos cepas de *Pseudomonas* spp. con capacidad de colonizar las raíces de plantas de aguacate, difieren considerablemente en su habilidad de controlar al hongo *Rosellinia necatrix* y a la vez muestran patrones de formación de biopelículas muy diferentes (Pliego *et al.*, 2008).

Se sabe que el agente de biocontrol K84 presenta una serie de características que la hacen adecuada para este fin, entre ellas la producción de la agrocina 84 (ver apartado B.2.1). Sin embargo, esta característica por sí sola no explica del todo la eficiencia en el biocontrol, por lo que deben existir otros factores importantes a tener en cuenta dentro de la complejidad de este sistema de control biológico (Farrand y Wang, 1992). Está demostrado que el agente de biocontrol K84 es un buen colonizador de la rizosfera de distintos huéspedes (Shim *et al.*, 1987; Macrae *et al.*, 1988; Stockwell *et al.*, 1993; Vicedo *et al.*, 1993; Penyalver y López, 1999). Además, existen estudios que sugieren que su habilidad para colonizar y persistir en las raíces está directamente relacionada con su capacidad de biocontrol (Ellis *et al.*, 1979; Shim *et al.*, 1987; Penyalver y López, 1999). Además, la capacidad de formar biopelículas podría contribuir de manera directa a la colonización de las raíces por parte del agente de biocontrol K84, permitiendo el asentamiento y la resistencia al lavado (que supone el riego o la lluvia), y contribuyendo a que se alcancen altas poblaciones del agente de biocontrol en la rizosfera, que serían responsables de la eficiencia del control de la enfermedad. La capacidad de formar biopelículas podría contribuir de una manera directa a que se

alcanzaran concentraciones *in vivo* suficientes de la agrocina 84 como para que se produjera una inhibición real del desarrollo del patógeno, ya que la agrocina 84 podrá concentrarse lo suficiente al quedar retenida en la matriz de las biopelículas y al haber gran cantidad de células productoras juntas. Si la agrocina 84 difundiera a las inmediaciones de la biopelícula lo haría de forma lenta y controlada, creando una zona menos accesible para el patógeno (Morris y Monier, 2003). Por último, el agente de biocontrol podría también actuar específicamente en microhábitats de la raíz, como son las heridas, que constituyen los puntos en los cuales la planta es susceptible de ser infectada por el patógeno, que son el escenario principal en la inducción tumoral. Si el agente de biocontrol K84 formara biopelículas en las heridas, éstas podrían constituir una barrera físico-química contra la entrada del patógeno. Por todo ello, nuestra hipótesis es que la capacidad de formar biopelículas en las raíces por parte del agente de biocontrol K84 puede ser un factor crucial en su eficacia como agente de control biológico.

## Objetivos

Para abordar la posible implicación de la formación de biopelículas en el control de la enfermedad causada por *Agrobacterium*, mediante el uso del agente de biocontrol K84, en esta tesis doctoral se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Evaluar la capacidad de formar biopelículas en cepas patógenas y no patógenas de las especies *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis* tanto en superficies inertes como sobre la superficie de raíces en condiciones *in vitro*.
2. Comenzar el análisis genético de la formación de biopelículas por el agente de biocontrol K84 *in vitro*.
3. Estudiar la implicación de los genes *ndvB*, *feuP* y *ctpA* relacionados con la biosíntesis y regulación de polisacáridos bacterianos, en la movilidad, estrés osmótico y capacidad de formar biopelículas en el agente de biocontrol K84.



**Pathogenic and non-pathogenic  
*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*  
and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as  
well as on root surfaces**

**Ana M. Abarca-Grau, Ramón Penyalver,  
María M. López and Ester Marco-Noales.**

***Plant Pathology* (2011) 60: 416:425**

## Abstract

Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains growing in minimal liquid medium adhered to different abiotic surfaces, forming biofilms at initial stages of development. *A. tumefaciens* and *A. vitis* strains were able to attach to both polystyrene and polypropylene materials, whereas *A. rhizogenes* strains only bound to polystyrene surface. Strains of the three species were able to form biofilms on borosilicate coverslips. It is concluded that their ability to adhere to and form nascent biofilms on abiotic surfaces is dependent on the *Agrobacterium* species (biovar), surface material and growth conditions. Furthermore, tumorigenic *A. tumefaciens* and *A. vitis* strains, and the biological control agent *A. rhizogenes* strain K84, bound tightly to and formed complex biofilms on the surface of tomato root tips *ex planta*. More importantly, *in planta* assays confirmed that all three *Agrobacterium* spp. strains efficiently colonized tomato seedlings and also formed biofilms on roots. These complex structures, as revealed by scanning electron microscopy, were composed of numerous bacterial cells arranged in different ways: either dense and continuous carpets, large aggregates embedded in extra-cellular material or globular mushrooms traversed internally by channels. Confocal laser scanning microscopy, using GFP-marked derivative strains, corroborated the presence of live, three-dimensional and thick green fluorescent structures attached to plant material. This study illustrates that besides *A. tumefaciens*, strains of the species *A. rhizogenes* and *A. vitis* are also able to build biofilms on abiotic as well as on root surfaces.

## Introduction

*Agrobacterium* species are Gram-negative soil-borne bacteria that can be classified into three biovars based on physiological and biochemical properties, without considering their disease phenotype (Kerr & Panagopoulos, 1977). In this study, the strains belonging to biovar 1 are designated as *A. tumefaciens*, those belonging to biovar 2 as *A. rhizogenes* and the biovar 3 strains as *A. vitis*. *Agrobacterium* spp. strains efficiently colonize plant roots (Matthysse & McMahan, 1998; Penyalver & López, 1999) producing galls in a large variety of plants (DeCleene & DeLey, 1976). During bacterium-plant cell interactions in wounded tissues, tumorigenic strains have the ability to transfer a particular DNA segment from the Ti plasmid of the bacterium to the plant genome, and its expression in the transformed plant cell leads to the development of a crown gall tumor (reviewed in Zhu *et al.*, 2000; Zupan *et al.*, 2000). The first step in the infection process is the attachment of individual or small groups of bacterial cells to the plant surface (Matthysse, 1987). Adherence is followed by bacterial growth and additional attachment to form large aggregates, currently considered as biofilms (Matthysse *et al.*, 2005). Biofilms are assemblages of microorganisms that adhere to each other and/or a surface, embedded in a matrix of exopolymers that they themselves synthesize (Morris & Monier, 2003; Ghannoum & O'Toole, 2004).

Bacterial aggregates or micro-colonies and biofilm formation are common behaviours observed in pathogenic and non-pathogenic bacteria that colonize plant roots (Morris & Monier, 2003; Danhorn & Fuqua,

2007). Within the *Agrobacterium* genus, has been described that *A. tumefaciens* strain C58 forms biofilms on abiotic and plant surfaces. Phosphorus and oxygen limitation, as well as cellulose production, seem to enhance biofilm formation in this strain (Danhorn *et al.*, 2004; Ramey *et al.*, 2004b; Matthyse *et al.*, 2005). More recently, a transcriptional repressor that regulates an operon involved in biofilm development in strain C58 has also been described (Barbosa & Benedetti, 2007). However, nothing is known about the biofilm-forming ability of other *Agrobacterium* species. *Agrobacterium rhizogenes* strain K84, a biocontrol agent for crown gall disease (reviewed in Penyalver *et al.*, 2000) and *A. vitis*, the causal agent of crown gall in grapevine (Ophel & Kerr, 1990), attach to roots and are very good root colonizers (Brisset *et al.*, 1991; Pu & Goodman, 1993; Vicedo *et al.*, 1993; Peñalver *et al.*, 1996; Penyalver & López, 1999). However, the ability to form biofilms on different surfaces by these and other *Agrobacterium* species, and the ecological role of biofilm formation in the interaction of each species with their host, is still unknown. Interactions with plant tissue surfaces that lead to pathogenesis may be considered as a subset of a larger group of interactions between the bacterium and a range of biotic and abiotic surfaces (Ramey *et al.*, 2004a). Surface attachment to plants could share many features with attachment to inert surfaces. Consequently, the aim of this study was to evaluate the ability of several pathogenic and non-pathogenic strains of *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* to form biofilms, both on different inert surfaces as well as on the surface of tomato roots, and to analyze such structures under confocal and electron microscopy.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and media

Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. *Escherichia coli* DH5 strain was grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook *et al.*, 1989). *Agrobacterium* spp. strains were routinely grown at 26°C on rich MG/L medium (Cangelosi *et al.*, 1992) supplemented with biotin (2 g/ml). AT (Tempé *et al.*, 1977) or AB (Chilton *et al.*, 1974) minimal media, with 0.2% mannitol as a carbon source (called ATM or ABM, respectively) were also used.

### DNA constructions

Plasmid DNA was isolated from *E. coli* strain DH5α by an alkaline lysis-based procedure using a commercial kit, following manufacturer instructions (Qiagen). Plasmids were introduced into *Agrobacterium* spp. strains by electroporation (Mersereau *et al.*, 1990).

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype, phenotype or characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
<i>A. tumefaciens</i>		
C58	Pathogenic strain	IVIA <sup>b</sup>
NT1	Non-pathogenic strain; Ti plasmid-less C58 derivative strain	Watson et al. (1975)
<i>A. rhizogenes</i>		
436	Pathogenic strain	IVIA
K84	Non-pathogenic strain; crown gall biocontrol agent	Kerr (1992)
<i>A. vitis</i>		
339	Pathogenic strain	IVIA
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Sambrook et al. (1989)
Plasmids		
pHC60	Vector constitutively expressing the green fluorescent protein (GFP), Tetr	Cheng & Walker (1998b)

<sup>a</sup>Tet<sup>r</sup>, resistance to tetracycline.

<sup>b</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias' bacterial collection.

### Growth assays

Growth rates in rich (MG/L) and minimal (ATM) liquid media at 26 °C were evaluated for wild-type strains, as well as their GFP-labeled derivatives using the Bioscreen C system (Labsystems, Finland), with temporary shaking at intervals of 1 hour. The OD<sub>600</sub> was periodically recorded over 120 hours.

### **Carbohydrate utilization**

The profile of carbohydrate utilization was assessed in wild-type strains and their GFP-labeled derivatives using the miniaturized system, API50CH, following manufacturer's instructions (Biomérieux).

### **Pathogenicity assays**

Wild-type pathogenic strains and their GFP-labelled derivatives were stab-inoculated at two different points in the stems of 4-week-old tomato seedlings with a needle touched onto 48-hour-old bacterial cultures grown on MG/L solid medium. Appearance of tumours was assessed visually 6 weeks after inoculation.

### **Agrocin 84 production**

Production of agrocin 84 by *A. rhizogenes* strain K84 and its GFP-labelled derivative was assayed on Stonier's medium (Stonier, 1956) as previously described (Peñalver *et al.*, 1994), using the sensitive indicator *A. tumefaciens* strain C58 (Engler *et al.*, 1975).

### **Biofilm assays on abiotic surfaces**

**Polystyrene and polypropylene wells.** Overnight bacterial cultures in ATM or ABM liquid media were diluted to an  $OD_{600}$  of 0.04 in fresh medium and 200  $\mu$ L were placed into 96 well polystyrene or polypropylene microtitre plates and incubated at 26  $^{\circ}$ C. After both 48 hours and 6 days of incubation, an aliquot of the liquid culture was initially transferred to a new plate and the  $OD_{600}$  was measured (planktonic cells). Subsequently, plates were rinsed repeatedly and thoroughly with distilled water. Sessile bacteria were quantified by adding 125  $\mu$ L of 1% crystal violet (CV) solution and incubating for 10-15 minutes. CV-stained biofilms were solubilized in 200 $\mu$ L of DMSO (99.5%) for 10-15 minutes at room temperature. Then, 125 $\mu$ L were transferred to a new plate, and the  $A_{600}$  was determined (attached cells).

**Borosilicate coverslips.** Biofilm formation was assayed on borosilicate coverslips by placing them vertically in 6-well cell culture plates and inoculating them overnight with ATM cultures diluted to an  $OD_{600}$  of 0.04, as described above. Plates were incubated at 26  $^{\circ}$ C. After three and five days of incubation, coverslips were rinsed under a stream of distilled water to remove planktonic cells, and biofilms were visualized by scanning electron microscopy (SEM) as follows: after drying, coverslips with attached bacteria were prefixed in 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde for 2h at room temperature in darkness, and then post-fixed in 1% osmium tetroxide for another 2h. After being washed in distilled water (three



times, 10 min each), samples were dehydrated in a graded alcohol series (20%, 30%, 50%, 70% and 80% for five min each and finally 100% for 20 min) and critical-point dried in CO<sub>2</sub> in a Tousimis Autosamdri model 814. Finally, coverslips were coated with gold palladium in a Bio-Rad model E5600, and examined with a Hitachi H-4100 scanning electron FE microscope at 5 to 10 kV of accelerating potential.

### **Biofilm formation on the tomato root surface**

**Root tips *ex planta*.** Tomato seeds cv. "Roma" were surface-disinfected for 10 min by soaking in hypochlorite [2.5% (v/v) of active chloride], and washed 5 times for 5 min each in sterile water. Seeds were deposited on wet filter paper in Petri dishes and germinated in a climatic chamber at 30°C with a daily photo-periodicity of 16 hours of light and 8 hours darkness. Root tips measuring 1 cm were excised 3-4 days after germination, washed with sterile PBS, and transferred into 6-well microtitre plates containing 3 mL of bacterial cultures ( $OD_{600}=0.1$ ) in ATM liquid medium. Initial population densities were verified in each experiment by spreading 10-fold dilutions of the suspension on MG/L plates. Microtitre plates were incubated at 26°C with low shaking (50 rpm). At both 2 and 6 days after incubation, root tips were washed lightly with sterile PBS to remove planktonic cells, and bacteria that were tightly bound to the root surface were then washed off by vortexing for 20 min at room temperature in 1 mL of 0.25X Ringer's solution containing 0.05% Tween 20 (Penyalver *et al.*, 2009). Attached bacteria removed from tips

were quantified by spreading 10-fold dilutions of the washing solutions on MG/L plates. Replicate root tips were monitored by SEM as described above for coverslips and by confocal laser scanning microscopy (CLSM) with a Leitz TCS SP, equipped with an argon-krypton laser beam. Five stacks of z sections (approximately 1 $\mu$ m spacing) were taken for each evaluated root tip, and the results shown are the average of 10 sample image stacks. Images were acquired with the Leitz TCS SP Confocal Software package. All experiments were performed at least twice, with two replicate root tips per strain.

**Root segments *in planta*.** Tomato seeds cv. Roma were surface disinfected as described above. Glass tubes (15 cm high x 3 cm diameter) were filled with 75 mL of sterile soil (1:1:0.5; perlite:sand:peat) and moistened with 20 mL of sterile water. Surface-disinfected seeds were sown at about 1cm below the soil, and the plants were germinated and grown in a climatic chamber at 30 °C with a daily photoperiodicity of 16h of light and 8h darkness. Seven to 15 days after germination, when seedlings possessed three true leaves, the seedlings were carefully dug up and the roots were gently washed in sterile water. The seedlings were then dried between sterile filter paper and inoculated with GFP-labelled bacteria by soaking for 30 min in an inoculum of the bacterial culture, adjusted to OD<sub>600</sub> of 0.1 in ATM. Excess liquid was decanted and the coated seedlings were sown in the same tube. Planted seedlings were grown under the same conditions as described above for seed germination. Seven days after inoculation, 1 cm root pieces were excised

from 1 cm above the primary root tip and the root surface-attached bacteria were washed off and quantified as described above for the *ex planta* assays. Biofilm structures were examined by SEM and CLSM as described above. All experiments were performed at least twice with two replicate seedlings per strain.

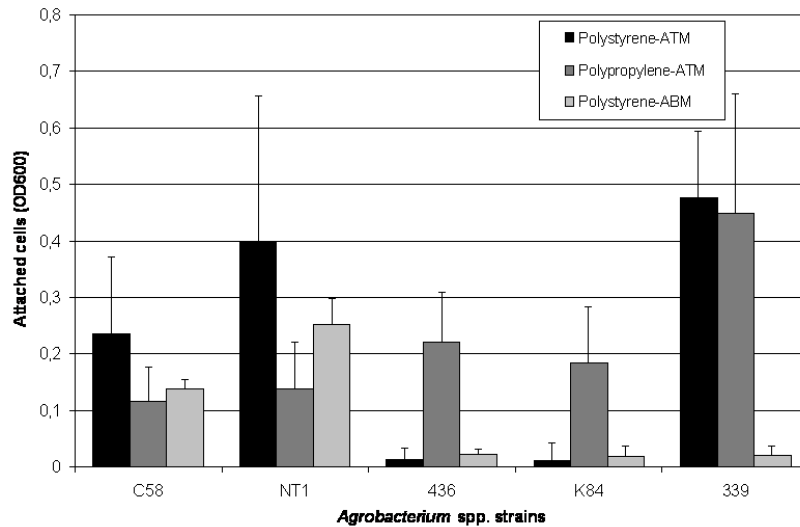
## Results

### Biofilms formation on abiotic surfaces.

**Polystyrene and polypropylene.** The ability to form biofilms on polystyrene and polypropylene surfaces by the different strains belonging to the three *Agrobacterium* species when grown on ATM is shown in Figure 1. As absorbance values for attached cells were generally higher at 6 days than at 48h (data not shown), only those corresponding to the longer time period are represented. Pathogenic *A. tumefaciens* C58 strain and the non-pathogenic derivative NT1 (biovar 1), and *A. vitis* pathogenic strain 339 (biovar 3) were able to attach to both polystyrene and polypropylene surfaces (Fig. 1). The derivative of strain C58 lacking the pTi plasmid attached and formed biofilms on both surfaces to a similar extent to the wild-type. The two strains of *A. tumefaciens* exhibited higher absorbance values for attached cells on polystyrene than on polypropylene surfaces, but *A. vitis* 339 attached equally to the two materials. Surprisingly, both pathogenic *A. rhizogenes* strain 436 and the non-pathogenic strain K84 (biovar 2) were only able to adhere to polypropylene (Fig. 1). Planktonic cells, measured as OD<sub>600</sub> of liquid cultures, were not different either among strains or within each strain for surface materials (data not shown). Overall, *A. vitis* strain demonstrated the highest average attachment values.

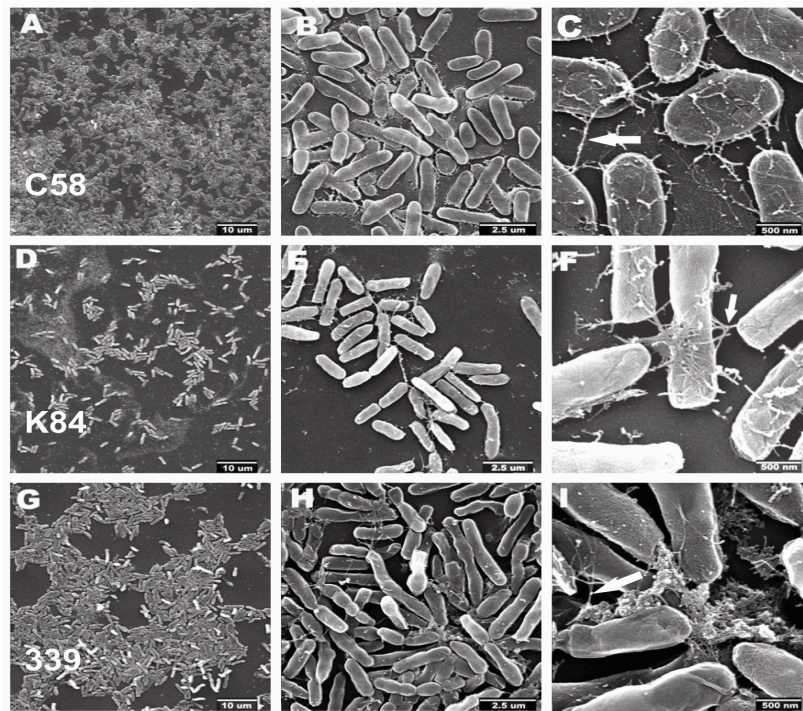
In contrast to *A. tumefaciens* strains, *A. vitis* attached to and formed biofilms on polystyrene when growing in ATM but not when grown in

ABM liquid media. *Agrobacterium rhizogenes* strains did not form biofilms on polystyrene whether grown in ATM or ABM media (Fig. 1).



**Figure 1.** Attachment of pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 and its Ti-plasmid-less derivative strain NT1 (biovar 1), *A. rhizogenes* pathogenic strain 436 and the non-pathogenic strain K84 (biovar 2), and pathogenic *A. vitis* strain 339 (biovar 3) to polystyrene and polypropylene surfaces after cells were grown in ATM or ABM liquid medium for 6 days, as measured by the  $A_{600}$  values of DMSO-solubilized crystal violet from adherent cells. Each bar represents the mean value and the standard deviation of at least two independent experiments with six replicate wells per strain and experiment ( $n \geq 12$ ).

**Borosilicate.** *Agrobacterium tumefaciens* strain C58, *A. rhizogenes* strain K84 and *A. vitis* strain 339, also attached to borosilicate surfaces (Figure 2). SEM observations showed that the three evaluated strains of *Agrobacterium* species formed a monolayer biofilm that covered the glass surface in contact with the bacterial suspension, showing greater cellular densities at the air-liquid interface of the coverslip.

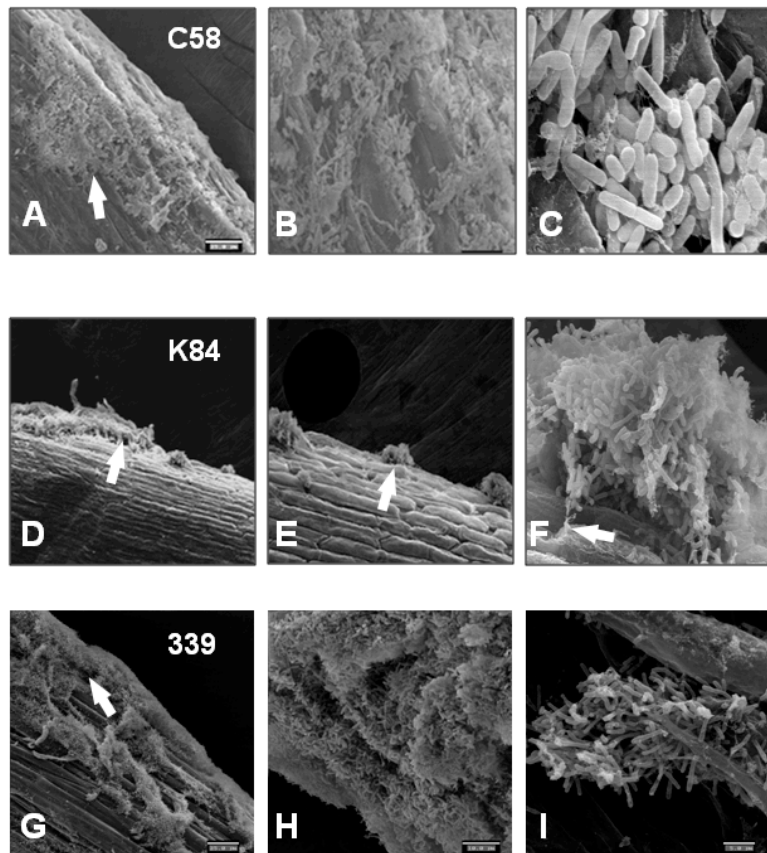


**Figure 2.** Visualization by SEM of borosilicate-attached bacteria obtained after incubation of coverslips for 2 days at 26 °C in ATM minimal liquid medium with *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 (a,b,c), *A. rhizogenes* strain K84 (d,e,f) and *A. vitis* strain 339 (g,h,i). White arrows point to fiber-like structures connecting bacterial cells to each other.

Different adhesion patterns were observed depending on the strain analyzed (Fig. 2d,e). A large amount of exopolymeric-like material could be distinguished at high magnification, connecting cell to each other in all assayed strains (Fig. 2c,f,i).

### **Biofilms formation on tomato root surfaces.**

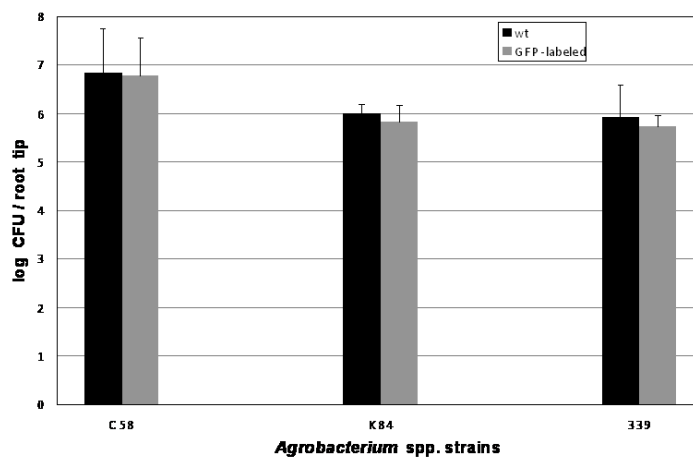
**Root tips *ex planta*.** *Agrobacterium tumefaciens* C58, *A. rhizogenes* K84 and *A. vitis* 339 bound tightly to tomato root tips after 48h of incubation, reaching bacterial densities of  $10^6$ - $10^7$  CFU per root tip (Fig. 3). Biofilm structures on these tomato root tips were visualized by SEM (Fig. 4). *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *A. vitis* 339 formed dense continuous bacterial carpets on the root tip surface (Figure 4a, g), not composed of a cell monolayer, but large and compact cell aggregates (Fig. 4b, c, h, i). The carpets formed by *A. vitis* (Fig. 4h) were denser and had a higher cell number than those of *A. tumefaciens* C58 (Fig. 4b). Biofilm structures developed by *A. rhizogenes* K84 were very different from those described for the 339 and C58 strains. K84 biofilms were elevated over the root surface, with the presence of hollow channels within those bacterial aggregates (Figure 4d). Moreover, globular and individualized structures with a mushroom-like form were dispersed along the root surface (Fig. 4e, f). Extracellular material anchored such structures to the surface (Figure 4f).



**Figure 4.** Visualization by SEM of tomato root tip surface-attached biofilms obtained after incubation for two days at 26 °C in ATM minimal medium with *A. tumefaciens* strain C58 (A, B, C), *A. rhizogenes* strain K84 (D, E, F), and *A. vitis* strain 339 (G, H, I). White arrows in panels A and G show carpet-like biofilm structures formed by C58 and 339 strains, respectively. White arrow in panel D shows elevated structures with hollow channels across the biofilm formed by *A. rhizogenes* K84. White arrow in panel E shows globular and individualized structures with a mushroom-like form. White arrow in panel F points to fiber-like structures connecting those globular biofilms formed by strain K84 to the root surface. No bacteria were observed on the surface of uninoculated root tips.



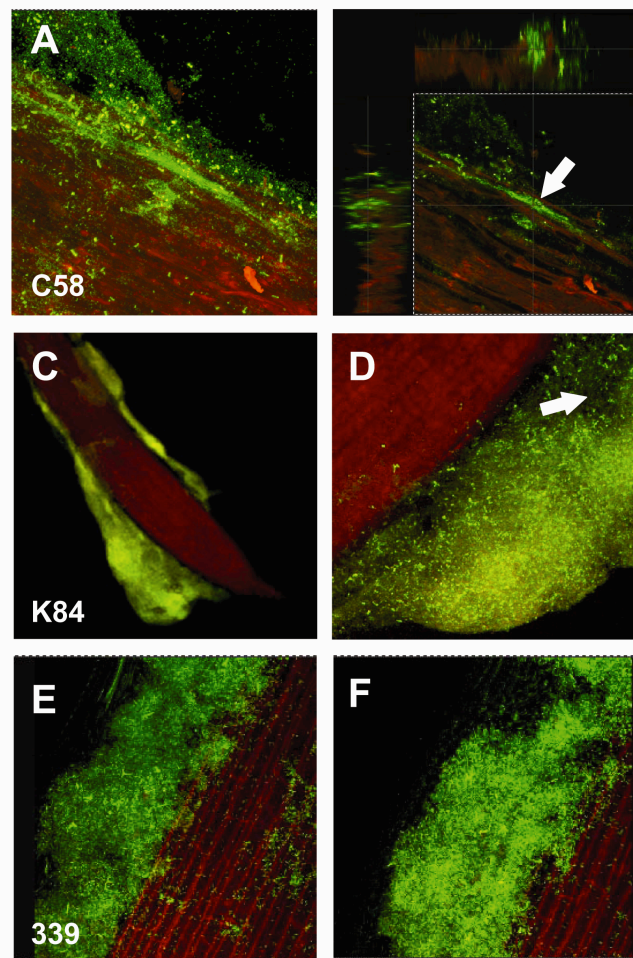
The presence of these complex structures on tomato root tips was also corroborated by CLSM observation using GFP-tagged strains. GFP expression did not affect any evaluated phenotypic trait of parental *Agrobacterium* spp. strains (data not shown). GFP-labelled derivatives of the three *Agrobacterium* spp. strains reached population densities similar to that of their corresponding wild-type strains on the tomato root tip surface (Fig. 3).



**Figure 3.** Bacterial populations on tomato root tip surface after incubation for 48h with wild-type (wt) and the corresponding GFP-labeled derivatives from *Agrobacterium tumefaciens* C58, *A. rhizogenes* K84 and *A. vitis* 339 strains. Each bar represents the mean value and the standard deviation of at least two independent experiments with two replicates per strain and experiment ( $n \geq 4$ ).

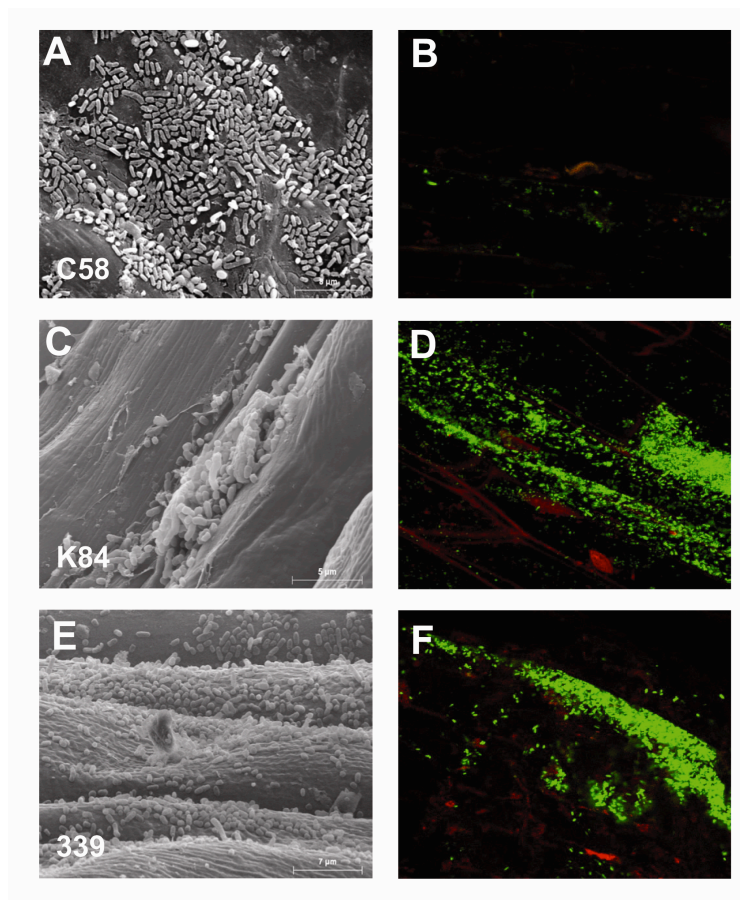
The stability of the GFP-expressing plasmid pHC60 was evaluated as the ratio of CFU on MG/L medium supplemented or not with the marker antibiotic. Thus, the stability found in these assays was  $106 \pm 14\%$ ,  $100 \pm 1\%$  and  $95 \pm 16\%$  for the GFP-labeled derivatives from *A. tumefaciens* C58,

*A. rhizogenes* K84 and *A. vitis* 339 strains, respectively. All three GFP-tagged *Agrobacterium* spp. strains formed three-dimensional and complex live structures on tomato root tip surfaces, but with an uneven distribution (Fig. 5). Some representative pictures are presented to illustrate the diverse biofilm structures formed on the tomato root tip surfaces by the three *Agrobacterium* spp. strains. Figure 5a shows a heterogeneous biofilm structure formed by GFP-labeled *A. tumefaciens* C58, with some parts of the biofilm comprising few cells, while others are denser. Reconstructed vertical cross sections of this biofilm clearly show a dense biofilm formed inside a root groove (Fig. 5b). GFP-labelled *A. rhizogenes* K84 and *A. vitis* 339 strains formed thick green fluorescent structures attached to the root tip surface, with large numbers of bacterial cells located far from the surface (Fig. 5c, e). Figure 5d and f shows hollow channels across these biofilm structures.



**Figure 5.** Visualization by CLSM of tomato root tip surface-attached biofilms obtained after incubation for two days with GFP-labelled derivatives from *Agrobacterium tumefaciens* C58 (A,B), *A. rhizogenes* K84 (C,D) and *A. vitis* 339 (E,F) strains. The left side and top of panel b are reconstructed vertical cross sections of the biofilm formed by strain C58 showing a dense biofilm inside a root groove (white arrow). White arrow in panel d points out hollow channels across the biofilms formed by strain K84. No GFP-expressing bacteria were found on the surface of uninoculated root tips.

**Root segments *in planta*.** All GFP-labeled derivative *Agrobacterium* spp. strains colonized the roots of tomato seedlings, yielding approximately  $10^5$  CFU per root segment at 7 days after seedling inoculations (5,57 +/- 0,41, 5,15 +/- 0,76 and 4,28 +/- 0,84 log CFU per root segment for C58, K84 and 339 strains respectively). Bacterial aggregates and complex biofilm structures were also formed by these bacteria when colonizing roots, as observed by SEM and CLSM microscopy (Fig. 6). Figures 6a,e show a dense carpet formed on tomato roots by GFP-labelled *A. tumefaciens* C58 and *A. vitis* 339 strains, respectively. Figure 6c shows, in detail, a bacterial aggregate on the root surface formed by the GFP-labelled *A. rhizogenes* K84 strain. Three-dimensional and complex live structures on these tomato roots were also corroborated by CLSM (Fig. 6b,d,f).



**Figure 6.** Visualization by SEM (A, C, E) and CLSM (B, D, F) of biofilms on tomato roots 7 days after seedlings were inoculated with GFP-labeled derivatives from *A. tumefaciens* C58 (A, B), *A. rhizogenes* K84 (C, D) and *A. vitis* 339 (E, F) strains. No bacteria were observed on the root surfaces from uninoculated tomato seedlings.

## Discussion

Plant-associated bacteria form biofilms in different tissues and their host interaction is significantly influenced by the conformation of the adherent populations (Ramey *et al.*, 2004a; Danhorn & Fuqua, 2007). Attachment of agrobacteria is required for their plant interaction and it is also the initial step for the formation of biofilms on roots (Matthysse, 1987; Matthysse *et al.*, 2005). This is the first evidence that, besides *A. tumefaciens* strain C58 (biovar 1), other pathogenic and non-pathogenic strains belonging to other species (biovars), such as *A. rhizogenes* (biovar 2) and *A. vitis* (biovar 3), are able to attach to different abiotic surfaces and build complex multi-layer biofilm structures on tomato root surfaces.

*Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* strains were able to attach to and form biofilms on polystyrene, whereas *A. rhizogenes* strains were not. Although biovar 1 strains seemed to attach to a greater extent to polystyrene than to polypropylene wells, significant differences were not found due to the observed variability, which was remarkably high in the case of strain NT1. A set of replicate experiments performed only with strain K84 also showed high variability in the absorbance values of the crystal violet (attached cells), even for the same optical density of the planktonic culture (unpublished results). These data suggest that the observed variability is intrinsic to the experimental method used. This phenotype of non-adherence to polystyrene was observed both in a pathogenic (436) and in a non-pathogenic (K84) strain, suggesting that it could be a specific trait for *A. rhizogenes* species. Differences in biofilm

formation on polystyrene and polypropylene are probably due to the different natures of the two surfaces and the different adhesion mechanisms of each *Agrobacterium* species. This is because adhesion ability is related to certain elements of the bacterial envelope, which could be different from one *Agrobacterium* species or strain to another. In fact, a putative capsular polysaccharide locus in *A. rhizogenes* strain K84 has recently been identified, required for attachment to abiotic surfaces, which is virtually missing in the *A. tumefaciens* C58 and *A. vitis* S4 genomes (unpublished results).

*Agrobacterium vitis* strain 339 attached to and formed biofilms on polystyrene when grown in ATM, but not when grown in ABM liquid media. Consequently, at least in this strain, biofilm formation on inert surfaces is regulated by growth conditions. Cell-to-surface interactions are dependent on environmental signals, but not all nutrients promote the development of biofilms (O'Toole & Kolter, 1998b). In the case of *A. tumefaciens* strain C58, it has been reported that phosphorus limitation enhances biofilm formation (Danhorn *et al.*, 2004). However, since both minimal media employed in the present study provide Pi-replete conditions, the observed growth medium effect would not seem to be related to phosphorus limitation, but to another as yet unidentified factor. Other differences between both minimal media, that could explain the different behaviour in biofilm formation by strain 339 in polystyrene wells, are that ABM do not contain manganese sulphate (which is present in ATM), and that the amounts of the remaining elements, except the potassium (magnesium, calcium, ammonium and iron), in ABM are several

times higher than in ATM. Biofilm formation on polystyrene was not observed in strain 339 when manganese sulphate was added to the ABM medium (data not shown). Overall, the ability of *Agrobacterium* spp. to bind and form biofilms on inert surfaces *in vitro* was found to be dependent on the strain, nature of the surface and growth conditions.

In agreement with previous observations on polyvinyl chloride (Danhorn *et al.*, 2004), the Ti plasmid does not seem to be required for the formation of biofilms on abiotic surfaces *in vitro*, since the C58-derivative strain NT1 was able to attach to inert surfaces to the same extent as its parental strain.. Quorum sensing and biofilm formation processes have been suggested to be connected in *A. tumefaciens* (Goryachev *et al.*, 2005). All genes that are thought to constitute the quorum sensing network in *A. tumefaciens* are located on the Ti plasmid (Zhu *et al.*, 2000) and the entire process is only active in the presence of opines, novel compounds that are restricted to *Agrobacterium*-induced plant galls. So, whether or not the Ti plasmid or quorum sensing can affect biofilm formation in tumour tissues remains unknown.

Biofilm formation on abiotic surfaces could have several epidemiological implications for diseases caused by *Agrobacterium* spp. It is well documented that agrobacteria can survive in bulk soil for long periods of time, where bacteria could persist as surface-associated populations on soil particles due to biofilm formation. *Agrobacterium*-related diseases of cucumbers and tomatoes can also be prevalent in hydroponic nurseries (Weller *et al.*, 2000). These diseases can be extremely difficult to eradicate between growing seasons, even when the



growth substrate is replaced between seasons. Thus, biofilm formation in surfaces such as irrigation lines could be a likely case for this re-occurrence (S. Weller, Dstl Porton Down, Salisbury SP4 0JQ, UK, personal communication).

*Agrobacterium tumefaciens* strain C58 grown in minimal liquid media binds to the surface of several plant roots, forming multi-cellular biofilm structures (Danhorn *et al.*, 2004; Ramey *et al.*, 2004b; Mathysse *et al.*, 2005; Barbosa & Benedetti, 2007). In this study, we have shown that, besides the tumorigenic *A. tumefaciens* strain C58, tumorigenic *A. vitis* strain 339, and the biological control agent *A. rhizogenes* strain K84, developed complex multi-layer cell architectures on the surface of tomato root tips *ex planta*. SEM visualization suggests that the dehydrated “carpet-like” biofilms formed by *A. tumefaciens* C58 and *A. vitis* 339 strains are different from the “tower or mushroom-like” structures formed by *A. rhizogenes* K84. Bacterial cells in mature biofilms are encased in a matrix mainly composed of exopolysaccharides. Cellulose fibers and the periplasmic cyclic  $\alpha$ -(1,2)-D-glucan are involved in biofilm formation in *A. tumefaciens* strain C58 (Mathysse *et al.*, 2005). Fibre-like structures and other exopolymeric material were extensively observed by SEM in all strains, which could be the dehydrated remains of the corresponding matrix. The presence of three-dimensional and thick green fluorescent structures surrounding these root tips, after incubation with all three *Agrobacterium* spp. strains was verified by means of CLSM using GFP-marked strains. Our results on the comparative behaviour of wild-type versus their corresponding GFP-labeled derivatives showed no

influence of the expressing plasmid on the bacterial traits evaluated. Therefore, the biofilm structures observed could be representative of the natural situation during host colonization. These biofilm structures had discontinuous and non-homogeneous forms along the root tip. CLSM also revealed that the biofilm structures of *A. tumefaciens* C58 and *A. vitis* 339 strains resembled “carpet-like” more than “tower or mushroom-like” structures produced by *A. rhizogenes* K84 strain. Channels with no bacteria were often observed across the biofilms, which probably allow the flow of molecules into and out of the biofilm (Ghannoum & O’Toole, 2004).

SEM revealed that, when grown in the same minimal liquid medium for the same period of time, bacteria were only able to form thin biofilms (composed of one to three cell layers) on the surface of borosilicate coverslips (Fig. 2), but were able to build more complex multi-layer cell structures on the surface of tomato root tips *ex planta* (Fig. 4). Therefore, the presence of a live plant surface seems to enhance the formation of complex mature biofilms in *Agrobacterium* spp. Several organic compounds can be released by the root tips to promote the formation of bacterial biofilms, as reported for the synthesis of cellulose fibrils (Mathysse *et al.*, 1981). Transition from planktonic existence to sessile lifestyle is thought to be regulated in part by the nutritional status of the environment (Wimpenny & Colasanti, 1997).

Biofilm assays *in planta* showed that bacteria colonizing tomato seedlings were also able to form biofilms on the root surfaces. As observed by SEM and CLSM, all tested *Agrobacterium* spp. strains clearly

formed complex biofilms when colonizing roots *in planta*, although these were not as complex as those found on the surface of root tips *ex planta*, probably due to the different growth and assay conditions. These plant pathogens could persist as surface-associated populations on the rhizosphere or soil particles, and their ability to form biofilms could contribute to colonization and survival in its environmental niches. Moreover, ability to form biofilms on the root surface or in wound tissues by the bio-control agent, K84, could be a relevant trait to control crown gall disease.

**Role for *Agrobacterium rhizogenes* K84 cell  
envelope polysaccharides in surface  
interactions**

Ana M. Abarca-Grau, Lindsey P. Burbank,  
Héctor D. de Paz, Juan C. Crespo-rivas,  
Ester Marco-Noales, María M. López,  
Jose M. Vinardell, Susanne B. von  
Bodman and Ramón Penyalver

*Journal of Bacteriology* (Enviado 9-  
Junio-2011; JB05399-11)

## Abstract

*Agrobacterium rhizogenes* strain K84 is a commercial biocontrol agent used worldwide to control crown gall disease. The organism binds tightly to polypropylene substrate and efficiently colonizes root surfaces as complex, multilayered biofilms. A genetic screen identified two mutants affected in these surface interactions. One of these mutants failed to attach and form biofilms on an abiotic surface; although interestingly, it exhibited normal biofilm formation on the biological root tip surface. This mutant is disrupted in a *wcbD* ortholog gene of *A. rhizogenes* strain K84, which is part of a large locus predicted to encode functions for the biosynthesis and export of a group II capsular polysaccharide (CPS). Expression of a functional copy of *wcbD* in the mutant background restored the ability to attach and form normal biofilms on the abiotic surface. The second identified mutant attaches and forms visibly denser biofilms on both abiotic and root tip surfaces. This mutant is disrupted in the *rkpK* gene, predicted to encode an UDP-glucose 6-dehydrogenase required for lipopolysaccharide LPS (O-antigen) and K-antigen capsular polysaccharide (KPS) biosynthesis in some rhizobia strain. The *rkpK* mutant from strain K84 is deficient in O-antigen synthesis and produces exclusively rough-LPS. We also show that strain K84 does not synthesize KPS. In addition, we identified a putative type II CPS,

distinct from KPS, that mediates cell-surface interactions and show that O-antigen of strain K84 is necessary for normal cell-cell interactions within the biofilms.

## **Introduction**

*Agrobacterium* species are soilborne bacteria that cause crown gall disease in a large variety of plants (DeCleene and DeLey, 1976). An early step in the infection process is the attachment of agrobacteria to plant tissues (Matthysse, 1987) and further global root colonization (Matthysse and McMahan, 1998; Penyalver and López, 1999). During the bacterium-plant cell interactions in wounded tissues, tumorigenic strains have the ability to transfer a particular DNA segment from the Ti plasmid of the bacterium to the plant genome, and its expression in the transformed plant cell leads to the development of a crown gall tumor (reviewed in references Zupan y col., 2000 and Zhu y col., 2000). It is well known that crown gall disease can be controlled by treatment of the root plant system with the biocontrol agent *A. rhizogenes* strain K84 (reviewed by Penyalver *et al.*, 2000). Strain K84 also attaches to root tips *ex planta* and efficiently colonizes the plant root system (Macrae *et al.*, 1988; Stockwell *et al.*, 1993; Vicedo *et al.*, 1993; Penyalver *et al.*, 1996).

Bacteria can live and proliferate in natural environments either as individual cells (planktonic) or as highly organized multicellular communities encased in a self-produced polymeric matrix called biofilms that are in close

association with surfaces or in air/liquid interfaces (Ghannoum and O`Toole, 2004). Aggregates, microcolonies and highly-structured biofilms are common multi-cellular developmental stages observed also by pathogenic and non-pathogenic root colonizing bacteria (Pearce *et al.*, 1995; Chin-A-Woeng *et al.*, 1997; Morris and Monier, 2003; Ramey *et al.*, 2004a; Danhorn and Fuqua, 2007; Abarca-Grau *et al.*, 2011b). *A. tumefaciens* strain C58 forms biofilms on the roots, which is enhanced by phosphorus, oxygen limitation and cellulose production (Danhorn *et al.*, 2004; Ramey *et al.*, 2004b; Matthyse *et al.*, 2005; Merrit *et al.* 2007). Two transcriptional regulators, BigR and ExoR, are necessary for biofilm growth in *A. tumefaciens* strain C58 (Barbosa and Benedetti, 2007; Tomlinson *et al.*, 2010).

We recently reported that the crown gall biocontrol agent *A. rhizogenes* K84 binds tightly to polypropylene and efficiently colonizes root surfaces as complex, multilayered biofilm structures (Abarca-Grau *et al.*, 2011b). However, the genetic basis for these properties remained undefined. Here we report, the identity of a mutant strain that fails to attach and form biofilms on an abiotic surface, although it exhibits normal biofilm formation on the biological tomato root tip surface. This mutant is disrupted in a gene that is an ortholog of *wcbD*, which in strain K84 is part of a locus dedicated for the biosynthesis and export of a type 2 capsular



polysaccharide (CPS). Thus, a putative CPS produced by *A. rhizogenes* strain K84, which is distinct from the K-antigen capsular polysaccharide (KPS) produced by rhizobia strains, appears to play an important role in cell-surface interactions. We also isolated a *rkpK* mutant strain that produces denser biofilms on both abiotic and root tip substrate. This mutant lacks the O-antigen lipopolysaccharide (LPS) fraction, indicating that wild-type LPS is necessary for normal cell-cell interactions within the K84 biofilms.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used.

Strains or plasmid	Relevant genotype, phenotype, or characteristic	Reference or source
<i>A. rhizogenes</i>		
K84	Wild-type biocontrol strain	Kerr, 1972
M71	Mar2xT7-induced mutant of K84; Arad9146; attachment defective; Gmr	This study
M108	Mar2xT7-induced mutant of K84; rkpK (Arad3519) ; O-antigen defective; denser biofim producer; Gmr	This study
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
AK6311	Producer of the high-molecular weight K-antigen capsular polysaccharide (HMW-KPS)	Kereszt <i>et al.</i> 1998
1021	Non-producer of the HMW-KPS	Müller <i>et al.</i> 2009
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Sambrook <i>et al.</i> 1989
S17-1 ( $\lambda$ pir)	Pro- Res- Mod+ recA; integrated RP4-Tet::Mu-Kan::Tn7, Mob+, pir+, Smr	Simon <i>et al.</i> 1983
Plasmids		
pMAR2xT7	Suicide vector for delivery of the mariner family transposon MAR2xT7, Ampr, Gmr	Liberati <i>et al.</i> 2006

pHC60	Vector constitutively expressing the green fluorescence protein (GFP), Tetr	Cheng and Walker, 1998b
pBBR1-MCS-2	RK2-based cloning vector, Kmr	Kovach <i>et al.</i> 1995
pWcbD	1369 bp PCR fragment containing the Arad9146 ORF (1212 bp) cloned into pBBR1-MCS-2 that complements the 71 mutation	This study
pRkpK	1538 bp PCR fragment containing the Arad3519 ORF (1323 bp) cloned into pBBR1-MCS-2 that complements the 108 mutation	This study

<sup>a</sup>Abbreviations are: Mob<sup>+</sup>, mobilizes transfer to other plasmids; Km<sup>r</sup>, resistance to kanamycin; Ap<sup>r</sup>, resistance to ampicilin. Tc<sup>r</sup>, resistance to tetracycline. Gm<sup>r</sup>, resistance to gentamicin. Sm<sup>r</sup>, resistance to streptomycin.

LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) was used for growing *Escherichia coli*. *Agrobacterium rhizogenes* strain K84 was routinely grown on rich MG/L (Cangelosi *et al.*, 1992) supplemented with biotin (2 µg/ml) and occasionally on TY medium (Beringer, 1974). AT (Tempe *et al.*, 1977) or AB (Chilton *et al.*, 1974) minimal media, with 0.2% mannitol as a carbon source (called ATM or ABM, respectively) and supplemented with biotin (2 µg/ml) were also used. Antibiotics were added to media at the following concentrations (µg/ml): for *Agrobacterium*, tetracycline (Tc), 10; gentamicin (Gm), 15; kanamycin (Km), 100 and neomycin (Nm), 100; for *E. coli*, Tc, 20; Gm, 10; Ampicilin (Ap), 50 and Km, 50.

### **DNA manipulations**

Plasmid DNA was isolated from *E. coli* by an alkaline lysis-based procedure kit following manufacturer's instructions (Qiagen). Standard recombinant DNA techniques were used as described by Sambrook *et al.*, (1989). Plasmids were introduced into *Agrobacterium* by electroporation (Mersereau *et al.*, 1990) or by biparental cross streak mating using *E. coli* S17-1( $\lambda$ pir) harboring the plasmid of interest as the conjugative donor (Simon *et al.*, 1983). Genomic DNA for *Agrobacterium* strains was isolated using a kit and following manufacturer's instructions (Epicentre).

### **Transposon mutagenesis**

A transposon mutagenesis library was generated in wild-type *A. rhizogenes* strain K84 with *MAR2xT7*, an engineered derivative of the *Himar1* transposon of the mariner family (Liberati *et al.*, 2006). Transposon insertions were randomly generated by introducing the suicide plasmid p*MAR2xT7* into strain K84 by conjugation with *E. coli* S17-1( $\lambda$ pir). Transposon-induced mutants of strain K84 were selected on ABM supplemented with Gm.

### **MAR2xT7 insertion-site identification**

Transposon insertion sites were identified using a two-round PCR protocol (Caetano-Anolles and Bassam, 1993) with genomic DNA from mutants, amplifying sequence adjacent to the transposon insertion with a transposon-specific primer and an arbitrary primer, followed by a second amplification using a nested transposon-specific primer and a primer corresponding to a non-random portion of the arbitrary primer used in the first PCR reaction. A third nested transposon-specific primer was used for sequencing reactions. Sequences for the used primers are shown in Table 2.

**Table 2.** Primers used for *MAR2xT7* insertion-site identification and gene cloning.

Primer	Sequence (5'-3')
MAR2xT7-1 (First round)	TACAGTTTACGAACCGAACAGGC
Arbitrary-1 (First round)	GGCCAGGCCTGCAGATGATGNNNNNNNNNNGTAT
MAR2xT7-2 (Second round)	TGTCAACTGGGTTCTGCCTTCATCCG
Arbitrary-2 (Second round)	GGCCAGGCCTGCAGATGATG
SEQ (Sequencing)	GACCGAGATAGGGTTGAGTG
Arad9146 ( <i>wcbD</i> ) forward	ATAAGGTACCCGCCCATGCGTTGTCGATGG
Arad9146 ( <i>wcbD</i> ) reverse	TGATGGATCCTGTTGCATCATGCTCAGC
Arad3519 ( <i>rkpK</i> ) forward	ATTGGAAGCTTGATCCACGCATGTCACATTG
Arad3519 ( <i>rkpK</i> ) reverse	ATCTGAATCCGGTGATGAGATAGCGCATTC

### **Gene cloning**

A fragment of 1369 bp containing the *wcbD* ortholog gene (*Arad9146*) was obtained by PCR amplification of genomic DNA from strain K84 using the specific designed primer set (Table 2) and cloned between the *KpnI* and *BamHI* sites of the broad host range vector pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995). This fragment contains the *Arad9146* ORF (1212 bp) and an extended promoter region of the gene. A fragment of 1538 bp containing the *rkpK* ortholog gene (*Arad3519*) was obtained by PCR amplification (Table 2) and cloned between the *HindIII* and *EcoRI* sites of pBBR1-MCS-2. This fragment contains the *Arad3591* ORF (1323 bp) and promoter region of the gene.

### **Biofilm screen**

Transposon-induced mutants of strain K84 were screened in two steps. In the first, large-scale screen, 10 µl of an overnight cultures in MG/L liquid medium were added to 200µl of ATM liquid medium in 96-well microtitre plates of polypropylene using one well per mutant. The amount of planktonic ( $OD_{570}$ ) and surface-attached ( $Ab_{570}$ ) cells was determined by the standard crystal violet assay after static incubation for 48h at 26°C (O'Toole

& Kolter, 1998b; Abarca-Grau *et al.*, 2011b). Each potential mutant compromised in biofilm formation in this first screen, was then re-screened by individually adjusting the ATM culture to an OD<sub>570</sub> of 0.04 and continued growth in microtiter plates. Comparative biofilm formation was measured as function of cristal violet staining as previously described. Experiments were repeated at least twice using 10 replicate wells per strain. Alternatively, biofilm formation on borosilicate culture tubes was also visualized after growing strain K84 and its mutants on ABM liquid medium for 48h under shaking conditions (100 rpm) with the tube in slant position.

**Biofilm formation on the root tip surface.** GFP-labeled derivative strains of strain K84 and its mutants were evaluated for biofilm formation on the surface of tomato root tips following the methodology described by Abarca-Grau *et al.* (2011b). Tightly bound bacteria were visualized on the surface of washed root tips by chemiluminescent GFP detection using a LAS-3000 imaging system (Fujifilm). Biofilms on the surface of washed root tips were directly examined with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E800) equipped with a high-resolution digital camera (Nikon DXM1200). All experiments were performed at least twice, with two replicate root tips per strain.

**LPS analysis.** Cells were grown overnight in ATM minimal medium to an  $OD_{600} = 0.3-0.5$  and purification of lipopolysaccharides (LPS) was performed as previously described by Campbell *et al.* (2003). SDS-PAGE gels were stained using the Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Stain kit, Molecular Probes, Inc.

**K-antigen capsular polysaccharide (KPS) analysis.** For purification and visualization of the high-molecular weight KPS, bacterial cultures were grown on liquid TY medium for 48 hours. Cells were washed three times in 0.9% NaCl and pelleted by centrifugation. The bacterial pellet was resuspended and lysed by heating at 100°C in 500 µl of KPS extraction buffer (50 mM Tris/HCl pH8.5; 13 mM EDTA; 15 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) for 6 min. The bacterial crude extract was then treated with RNase (60 µg/ml) and DNase (20 µg/ml) for 3 hours at 37°C, followed by two 24 hour treatments with proteinase K (30 µg/ml) at 37°C. Finally, the treated mixture was centrifuged at 10,000 x g for 5 min, and 400 µl of the supernatant was mixed with 680 µl of 1 M sucrose and 120 µl of absolute ethanol and stored at -20°C. Samples obtained were analysed by PAGE without SDS as previously described (Rodríguez-Carvajal *et al.*, 2001; Parada *et al.*, 2006) with the addition of ethanol to the running buffer as well as to the running and stacking gels at a final concentration of 10% (v/v). Acrylamide concentration of the running gel

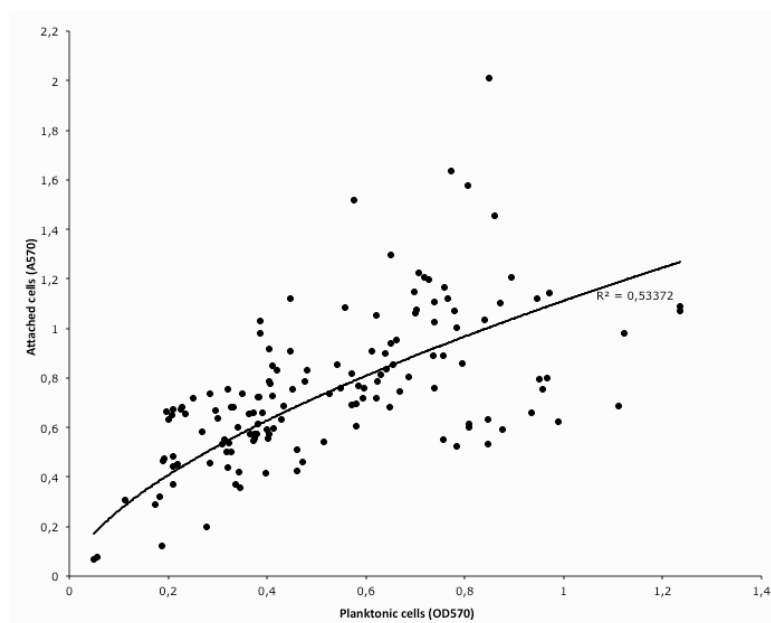


was 18% (w/v), and acrylamide/N,N'-methylenebisacrylamide ration was 29:1. Gels were fixed using Alcian Blue (0.5% in 2% acetic acid) and silver-stained. LPS extraction, separation on SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and silver staining were performed as previously described (Buendía-Clavería *et al.*, 2003).

**Transmission electron microscopy.** Overnight cultures in ATM liquid medium were resuspended in 0.01 M phosphate buffer saline (pH = 7.2) at  $10^9$  ufc/ml. Suspensions were deposited on Formvar-coated 400-mesh copper grids and allowed to settle a few seconds. Excess liquid was blotted and then cells were stained with 2% phosphotungstic acid (w/v). Grids were washed in distilled water and blotted. Cells were viewed with a JEOL transmission electron microscope model JEM-1010.

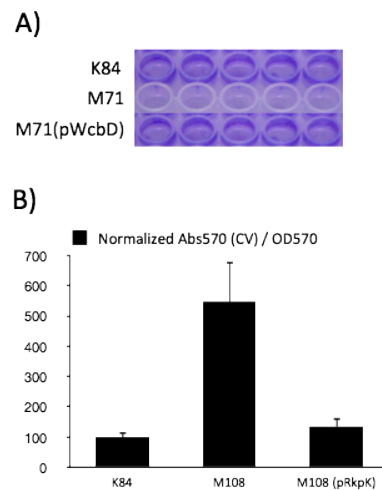
## Results

**Identification of a K84 mutant with an attachment defect to polypropylene wells but proficient for biofilm formation on the root tip surface.** A mutant collection of *A. rhizogenes* K84 carrying the *MAR2xT7* transposon was screened for attachment and biofilm formation in 96-well polypropylene microtitre plates. In our assay, adherent bacteria of wild-type K84 increased as increasing cell density (Fig. 1). Attached bacteria ( $Abs_{570}$ ) highly varied for a given optical density of the culture ( $R^2 = 0,53372$ ).



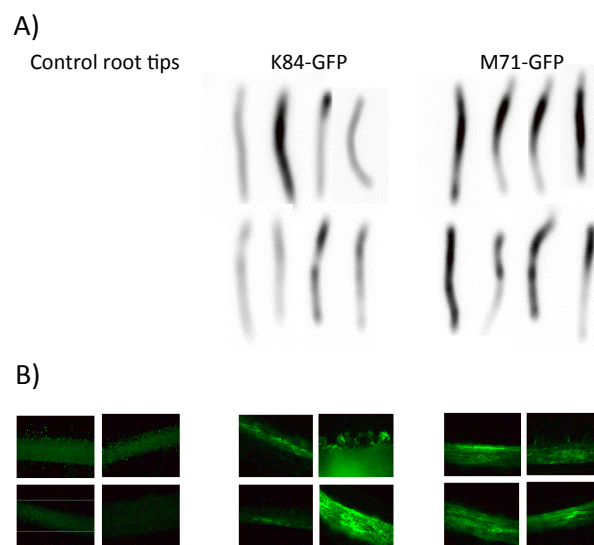
**Figure 1.** Adherent bacteria of wild-type K84 increased as increasing the optical density of the culture. Measurements of DMSO-solubilized cristal violet staining ( $Abs_{570}$ ) of attached bacteria to polypropylene wells after static incubation of *A. rhizogenes* strain K84 for 48h in ATM liquid medium versus corresponding planktonic cell density ( $OD_{570}$ ). Data correspond to 24 independent plates with at least four replicate wells per plate ( $n=142$ ).

The initial screen of approximately 1,700 transposon-derivative K84 mutants yielded two strains with a different surface-adhesion phenotype (Fig. 2). One of these mutants, M71, grew normally in ATM liquid medium (data not shown), but it was completely defective in attachment and subsequent biofilm formation on polypropylene wells (Fig. 2A).



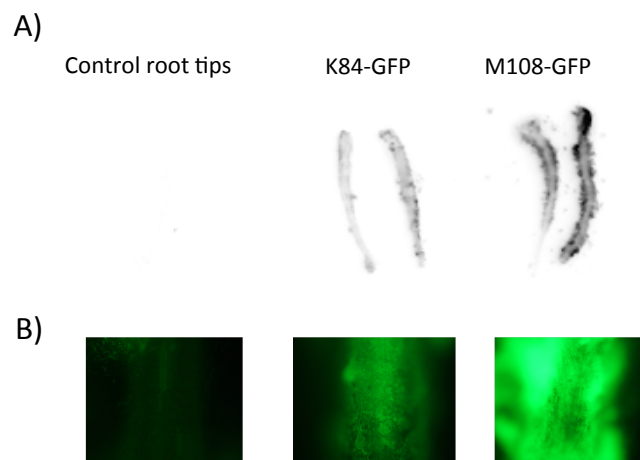
**Figure 2.** A) *wcbD* orthologous gene of *Agrobacterium rhizogenes* K84 is required for attachment and subsequent biofilm formation on polypropylene surface. Cristal violet (CV)-stained biofilms on polypropylene wells produced by wild-type strain K84, the *wcbD* mutant M71 and the complemented mutant M71 (pWcbD) after static incubation in ATM liquid medium for 48h. B) The *rkpK* mutant M108 attaches to polypropylene and forms denser biofilms than the wild-type K84. Normalized data of the ratio between DMSO-solubilized CV staining ( $Abs_{570}$ ) reflecting the surface-adherent cells, and the culture density ( $OD_{570}$ ) reflecting the planktonic cells, are presented for the wild-type K84, its *rkpK* mutant M108 and the complemented mutant M108 (pRkpK) after static incubation in ATM liquid medium for 48h.

Interestingly, this mutant attached and produced normal biofilms on the root surface of tomato (Fig. 3). GFP-labelled fluorescent wild-type and mutant strains exhibited the same level of bacterial attachment to washed root tips (Fig. 3A), and formed undistinguishable patterns of biofilm formation as also observed by epifluorescence microscopy (Fig. 3B).



**Figure 3.** The *wcbD* mutant M71 attaches and forms biofilms on the surface of tomato root tips. A) Attached bacteria expressing GFP were detected by a chemiluminescent detection imaging system on the surface of 1-cm tomato root tips incubated for 48h with GFP-labeled derivatives of the wild-type K84 and its *wcbD* mutant M71-GFP. No GFP-expressing bacteria were found on the surface of uninoculated control root tips. B) Visualization by fluorescence microscopy of representative tomato root tip surface-attached biofilms obtained after incubation for 48h with K84-GFP and its *wcbD* mutant M71-GFP. Green fluorescence structures were clearly observed on the surface of tomato root tips incubated with bacteria, whereas no such GFP-expressing structures were found on the surface of uninoculated control root tips.

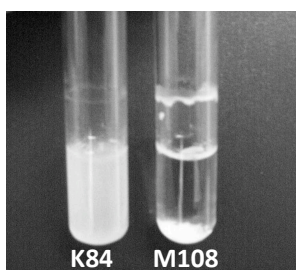
**The second K84 mutant, M108, attaches and forms visibly denser biofilms on both abiotic and root tip surfaces.** The mutant designated M108 showed visibly enhanced biofilms when grown in polypropylene wells (Fig. 2B), and also on the surface of tomato root tips (Fig. 4). This adhesion pattern carried over to the natural root surface, with GFP fluorescently-tagged M108 mutant strain, shows that this mutant formed visibly denser biofilms (Fig. 4A). In fact, the mutant biofilms were uniformly thicker than those formed by the wild-type K84 strain on the root surface as also observed by epifluorescence microscopy (Fig. 4B), with clearly higher number of GFP-expressing bacterial cells.



**Figure 4.** The *rkpK* mutant M108 attaches and forms denser biofilms than the wild-type strain K84 on the surface of tomato root tips. A) Attached bacteria expressing GFP were detected by a chemiluminescent detection imaging system on the surface of 1-cm tomato root tips incubated for 48h with GFP-labeled derivatives of the wild-type K84 and its *rkpK* mutant M108-GFP. No GFP-expressing bacteria were found on the surface of uninoculated control

root tips. B) Visualization by fluorescence microscopy of representative tomato root tip surface-attached biofilms obtained after incubation for 48h with K84-GFP and its *rkpK* mutant M108-GFP. Green fluorescence structures were clearly observed on the surface of tomato root tips incubated with bacteria, whereas no such GFP-expressing structures were found on the surface of uninoculated control root tips.

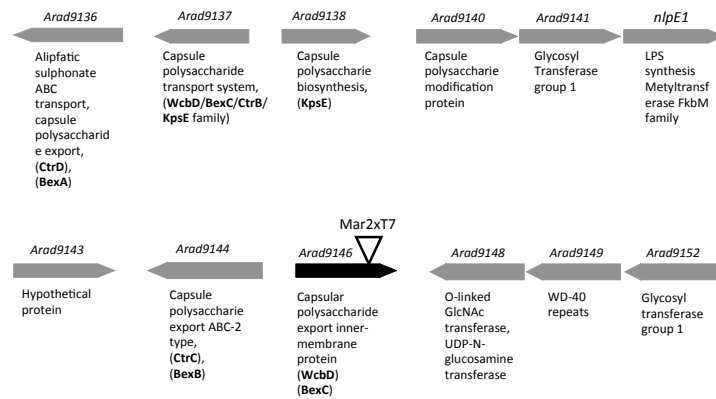
The M108 mutant strain exhibited more pronounced biofilm formation than the wild-type strain K84 also when grown in borosilicate culture tubes under shaking conditions. The M108 mutant produced very dense, but loose biofilms at the liquid/air interface of cultures, while strain K84 grew mainly in suspension as planktonic cells, forming only a slight biofilm (Fig. 5). The mutant also formed remarkable precipitated aggregate at the bottom of the tube, which was absent in the wild type strain (Fig. 4). Specifically, mutant M108 grew preferentially as surface-adherent biofilms (sessile) distinctly different from the wild-type K84 strain that grows, for the most part, as a planktonic suspension culture.



**Figure 5.** The *rkpK* mutant M108 grows mainly in a sessile stage (aggregates or biofilms) than in a planktonic way. Biofilm formation on borosilicate tubes by wild-type strain K84 and its derivative *rkpK* mutant M108 after growing for 48 h in ABM liquid medium under shaking (100

rpm). Strain K84 grew in suspension (planktonic cells), forming just a slight biofilm in the surface of the tube at the liquid-air interface, whereas *rkpK* mutant M108 formed aggregates which precipitated at the bottom, and formed clearly denser biofilm in the surface of the tube at the liquid-air interface, without no visible planktonic cells.

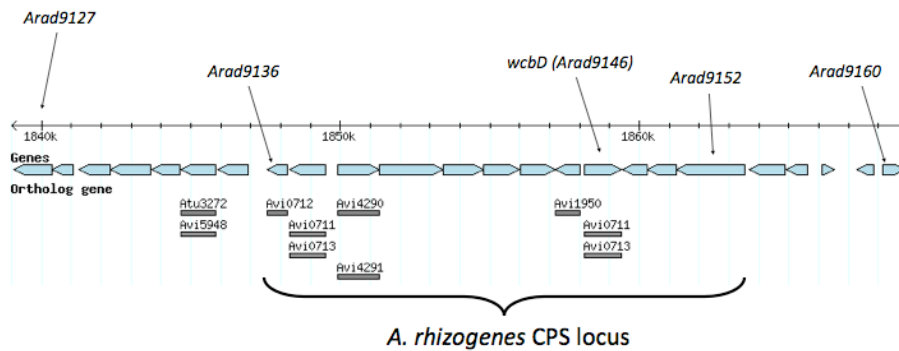
**Genetic analyses of the biofilm mutants.** Sequence analysis of the transposon-K84 DNA flanking region from genomic DNA of the mutant M71 localized the insertion site within the coding sequence of *Arad9146* gene. This gene is 1,212 bp long and is located on the chromosome 2, which is the 2.65 Mbp megaplasmid replicon of K84 genome (Slater *et al.*, 2009). The transposon insertion is located between nucleotides 141 and 142. The projected translated product of *Arad9146* gene shows the highest sequence similarity with the WcbD ortholog genes from *Erythrobacter* sp. [33% Identities (I) and 53% Similarity (S)], and from *Burkholderia cenocepacia* [33% I and 52% S], and with BexC ortholog from *Haemophilus influenzae* [35% I and 53% S]. Based on these amino acid sequence similarities, the *Arad9146* coding sequence is predicted to encode a capsular polysaccharide inner-membrane export protein (Kroll *et al.*, 1990; Lo *et al.*, 2001; Warawa *et al.*, 2009). In fact, the *wcbD* ortholog gene in *A. rhizogenes* strain K84 is part of a locus (extending from gene ID *Arad9136* to *Arad9152*) that is predicted to encode the biosynthesis and export of a group II capsular polysaccharide (CPS) (Fig. 6).



**Figure 6.** The *wcbD* ortholog gene in *A. rhizogenes* strain K84 is part of a locus dedicated for the biosynthesis and export of a group II capsular polysaccharide (CPS). The genetic structure of the *wcbD* ortholog gene locus (extending from *Arad9136* to *Arad9152*) where *Mar2xT7* transposon is inserted in mutant M71 (gene ID *Arad9146*) is presented. Genes related to CPS biosynthesis loci from other bacteria are bold highlighted. *BexA-C* genes belong to the CPS biosynthesis locus of *Haemophilus influenzae*, *CtrB-D* belong to that from *Neisseria meningitidis*, *KpsE* belong to that from *Escherichia coli* and *WcbD* belong to that from *Erythrobacter* sp. (28). Further information about the properties of these putative CPS proteins of *A. rhizogenes* strain K84 and their homologues is presented also in the supplemental material Table S2. *A. rhizogenes* strain K84 complete genome analyses and annotation are available from Virginia Tech Bioinformatics Institute Genome sequencing webpage: [agro.vbi.vt.edu/public/index.html](http://agro.vbi.vt.edu/public/index.html)

Interestingly, this locus is part of a larger genomic region (extending from gene ID *Arad9127* to *Arad9160*) in strain K84 that is virtually missing in the other fully sequenced genome of *A. tumefaciens* C58 and with only a few orthologous genes in the *A. vitis* S4 genome (Fig. 7).





**Figure 7.** The predicted CPS locus of *A. rhizogenes* strain K84 (from gene ID *Arad9136* to *Arad9152*) is part of a larger genomic region (from genes *Arad9127* to *Arad9160*) virtually missing in the other two complete sequenced *Agrobacterium* spp. genomes. Orthologous genes in the *A. tumefaciens* C58 (Atu genes) and *A. vitis* S4 (Avi genes) genomes are indicated. Further information about the properties of proteins from this anomalous region of the *A. rhizogenes* strain K84 genome and their closer homologues are presented in Table 3. *A. rhizogenes* strain K84 complete genome analyses and annotation are available from Virginia Tech Bioinformatics Institute Genome sequencing webpage: [agro.vbi.vt.edu/public/index.html](http://agro.vbi.vt.edu/public/index.html).

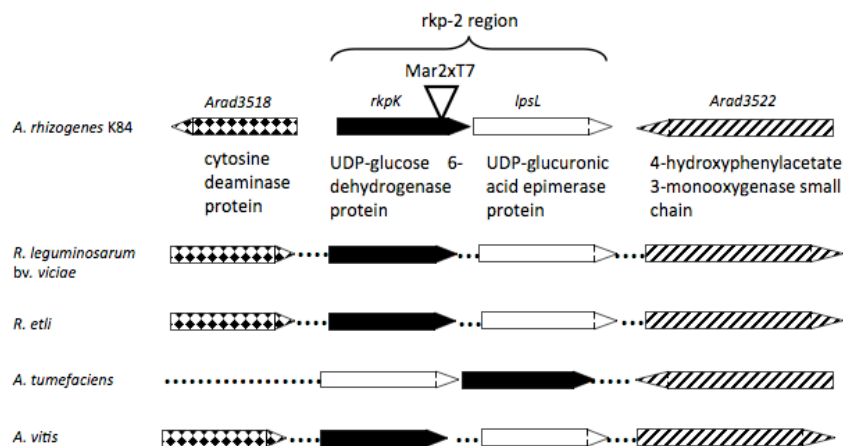
Moreover, the most highly related homologous for this K84 CPS locus genes are not from the *Rhizobiaceae* family (Table 3).

**Table 3.** The predicted CPS locus of *A. rhizogenes* strain K84 (from gene ID *Arad9136* to *Arad9152*) has very low similarity with genes from the *Rhizobiaceae* family. Properties of proteins of this anomalous region of strain K84 genome and their closer homologues are presented.

K84 ID gene	Source organism and ortholog gene	Amino acid identity (%)	Product
<i>Arad9136</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.	56	Capsule polysaccharide export transport system
<i>Arad9137</i>	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	40	Capsule polysaccharide export transport system
<i>Arad9138</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	38	Capsule polysaccharide synthesis
<i>Arad9140</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>	39	Capsule polysaccharide modification protein
<i>Arad9141</i>	<i>Methylobacterium</i> sp.	34	Glycosyl transferase group 1
<i>Arad9142</i>	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	25	Methyltransferase FkbM family
<i>Arad9143</i>			Hypothetical protein
<i>Arad9144</i>	<i>Burkholderia thailandensis</i>	41	Capsule polysaccharide export transport system
<i>Arad9146</i>	<i>Erythrobacter</i> sp.	33	Capsule polysaccharide export transport system
<i>Arad9148</i>	<i>Caulobacter</i> sp.	42	O-linked GlcNAc transferase
<i>Arad9149</i>			Hypothetical protein
<i>Arad9152</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>	30	Glycosyl transferase group 1

*A. rhizogenes* strain K84 complete genome analyses and annotation are available from Virginia Tech Bioinformatics Institute Genome sequencing webpage: [agro.vbi.vt.edu/public/index.html](http://agro.vbi.vt.edu/public/index.html).

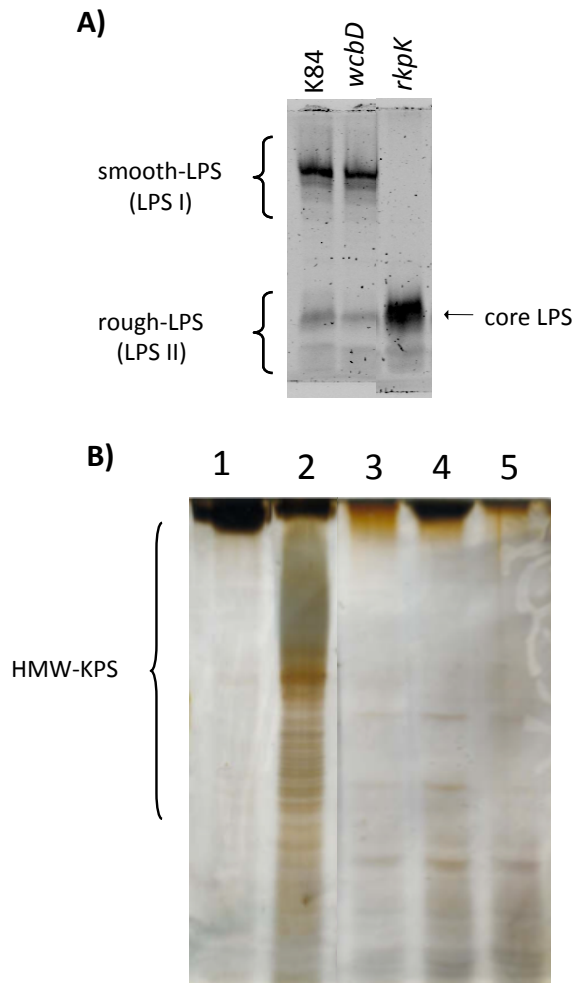
Sequence analysis of the mutant strain M108 localized the transposon insertion between nucleotides 302/303 of the 1,323 bp *Arad3519* coding sequence, which is located on the chromosome 1 of strain K84. This gene has been designated as *rkpK* based on the predicted amino acid sequence. The K84 *rkpK* gene shows the highest similarity to *mtpE* of *Mesorhizobium tianshanenese* [83% Identities (I) and 89% Similarity (S)], and *rkpK* orthologues of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [82% I and 89% S], *R. etli* [83% I and 89% S], and *Sinorhizobium meliloti* [79% I and 88% S], plus *exo5* of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* [82% I and 89% S]. The *rkpK* gene encodes a UDP-glucose 6-dehydrogenase (Kereszt *et al.*, 1998). In *A. rhizogenes* strain K84, the *rkpK* gene is part of a two-gene operon called *rkp-2* (Fig. 8), that also encodes the *lpsL* gene, which is predicted to specify a UDP-glucuronic acid epimerase function (Kereszt *et al.*, 1998). The synteny of the *rkp-2* locus is well conserved in *M. tianshanenese*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli* and *A. vitis* strains, but less so in the *A. tumefaciens* and *S. meliloti* strain (Fig. 8). This *rkp-2* operon is required for the lipopolysaccharides (LPS) synthesis including K-antigen capsular polysaccharides (KPS) produced by rhizobia strains (Kereszt *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2003).



**Figure 8.** The synteny of the *rkp-2* region of *A. rhizogenes* strain K84 is not conserved amongst the closer phylogenetic related species within the *Rhizobiaceae* family. Genetic structure of the *rkpK* orthologous gene locus where *Mar2xT7* transposon is inserted in mutant M108 (gene ID *Arad3519*) is presented. Shown below the *rkpK* gene of strain K84 are the homologous *rkpK* gene regions from the four closer phylogenetic species: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli*, *A. tumefaciens* and *A. vitis* (Slater et al., 2009). In all cases, orthologous genes from different species are indicated by identical fill patterns. Black dots between two genes indicate that they are not contiguous in the genome. *A. rhizogenes* strain K84 complete genome analyses and annotation are available from Virginia Tech Bioinformatics Institute Genome sequencing webpage: [agro.vbi.vt.edu/public/index.html](http://agro.vbi.vt.edu/public/index.html)

***wcbD* gene of *A. rhizogenes* K84 is required for attachment and biofilm formation on the abiotic surface.** Expression of a functional copy of *wcbD* in the M71 mutant (M71(pWcbD) strain), completely restored the attachment and biofilm deficiencies of the mutant (Fig. 2A). These results confirm that the *wcbD* locus plays an important role in surface adhesion and biofilm development phenotypes of mutant M71.

**Analyses of cell envelop polysaccharides. (1) *rkpK*, but not the *wcbD* gene, is required for lipopolysaccharide (LPS) synthesis.** Because both *wcbD* and *rkpK* genes are involved in strain K84 biofilm formation and showed high degree of similarity to functions involved in cell envelop polysaccharide synthesis, we examine the LPS profiles of these mutants in comparison to that of the wild-type strain. As shown in Fig. 9A, the wild-type strain K84, gives a characteristic LPS banding pattern after gel-electrophoretic separation, showing smooth (LPS I) and rough LPS (LPS II) (lipid A plus the core saccharide but without the O-antigen). Interestingly, the *wcbD* mutant does not generate any visible changes in this banding pattern; while, the *rkpK* mutant lacked the O-antigen fraction, and was concomitantly enriched in the rough LPS band (LPS II) (Fig. 9A). The colonies of the *rkpK* mutant were slightly less mucoid (drier) than the wild-type and exhibited a characteristic rough colony morphology.



**Figure 9.** A) Lipopolysaccharide (LPS) production of wild-type K84 and its transposon derivative mutans. Proteinase K-treated SDS-lysed cell extracts were separated in PAGE gels and LPS was visualized after staining as described in Material and Methods. In wild-type strain K84, smooth LPS and rough LPS (lipid A linked to the core oligosaccharide but without the O-antigen) migrate as distinct species. The smooth LPS (LPS I) produced by the wild-type strain K84 runs as a series of distinct bands. The rough LPS (LPS II) migrates faster on the gel and consists of one prominent upper band and a very faint lower band. Initial culture densities ( $OD_{600}$ ) were 0.506, 0.376 and 0.432 for strains K84, *wcbD* and *rkpK* mutants, respectively. B) Bacterial crude extracts were separated in PAGE gels and polysaccharides were visualized after Alcian blue treatment and silver staining. Lanes: 1, *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 (Non-producer of HMW-KPS); 2, *S. meliloti* strain AK6311 (HMW-KPS producer); 3, *A. rhizogenes* strain K84; 4, *wcbD* mutant; and 5, *rkpK* mutant.

**(2) Strain K84 does not produce the K-antigen capsular polysaccharide (KPS) typical of rhizobia.** Because of the relatedness of both WcbD and RkpK to functions involved in the synthesis of capsular polysaccharides, we were interested to examine whether strain K84 produces the high molecular weight K-antigen capsular polysaccharide (KPS) as described for other rhizobia (Reuhs *et al.*, 1993). As shown in Fig. 9B, the total LPS extract of *S. meliloti* strain AK631 separated by gel electrophoresis contains a prominent KPS fraction, which is absent in the KPS-deficient strain 1021. Importantly, *A. rhizogenes* strain K84 does not produce a related high molecular weight KPS (Fig. 9B). A faint banding pattern corresponding to low-molecular weight polysaccharides was observed in strain K84 and its *wcbD* and *rkpK* derivative mutants.

## Discussion

We have recently shown that the biocontrol agent *A. rhizogenes* K84 is able to form biofilms not only on abiotic but also on plant root surfaces, where biofilms become complex and structured, with cells adhered to surface and to each other (Abarca-Grau *et al.*, 2011b). Based on these observations we hypothesized that biofilm formation is an integral part of strain K84 host root colonization and its ability to serve as an efficient biocontrol agent. A genetic screen for *A. rhizogenes* K84 mutants deficient for adhesion and biofilm formation identified two loci encoding functions consistent with this prediction. The first mutant is located in a *wcbD* ortholog gene, which is required for attachment and biofilm formation on an abiotic surface, but is capable of forming seemingly unaltered biofilms on root tip surfaces. Bacterial cells counts, quimioluminescent detection and fluorescence microscopy evaluation of GFP-tagged wild-type and mutant strains clearly showed similar numbers of cells within the biofilms formed by both strains on the root surfaces, but also indicated that *wcbD* mutant was supported by a tightly adherent sub-population that remained attached to the root surface even after rigorous washing. Thus, in the *wcbD* we are altering an adhesion factor of this biocontrol agent K84 required for its interaction with the abiotic polypropilene substrate. The reason for the



observed differences in the abiotic vs. biotic adhesion phenotypes of *wcbD* mutant remains unclear, although similar differences in adhesion patterns have been also observed in *Pseudomonas putida* (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Yousef-Coronado *et al.*, 2008), *P. fluorescens* (Barahona *et al.*, 2010) and *Vibrio cholerae* (Mueller *et al.*, 2007) mutants. Physicochemical properties of the surfaces are important aspects of bacterial adhesion (Korber *et al.*, 1995), which could explain the observed difference in attachment to the polypropylene, which is hydrophobic, versus the likely hydrophilic root surface. Adhesion to these different substrates may require specific adhesion factors. Thus, we infer that the adhesion factor encoded by the *wcbD* locus is specific for adhesion to hydrophobic surfaces, with little or no role in adhesion to the root surface. Alternatively, the root surface could be coated with organic material released by root exudates, providing a nutrient source which might influence bacterial adhesion to the roots (Korber *et al.*, 1995; Watnick *et al.*, 1999).

Cell envelope polysaccharides, including capsular polysaccharides (CPS), are often involved in attachment to inert surfaces and plant tissues (Beveridge and Graham, 1991; Danhorn and Fuqua, 2007). Changes in the CPS content might be related to different hydrophobicity characteristics that could play a key role in surface adhesion selectivity as suggested by De

Castro *et al.* (2001). The *wcbD* gene is part of a predicted CPS locus in strain K84. It therefore likely that the *wcbD* mutant has an altered CPS component at the cell surface. The fact that *in trans* expression of *wcbD* restored normal adhesion and biofilm formation on the abiotic surface, strongly suggest that this locus of strain K84 encodes an adhesion factor that is important for attachment to the abiotic substrate, but has minimal, if any, role in adhesion to the natural plant surface. A typical bacterial capsule surrounding the cells was absent in strain K84 growing in liquid culture as confirmed by negative staining and transmission electronic microscopy. There is the possibility that the predicted K84 capsule would be a very loosely layer attached to the external membrane or constitute a microcapsule that is not readily discerned as described in other bacteria ( Beveridge and Graham, 1991; Patrick *et al.*, 2009). *Agrobacterium rhizogenes* is closely related to *R. leguminosarum* and *R. etli*, and less so to other *Agrobacterium* species (Slater *et al.*, 2009). This entire *wcbD* locus from *A. rhizogenes* strain K84 is virtually missing in *A. tumefaciens* C58 and *A. vitis* S4 genomes. Moreover, each gene present in this *wcbD* locus in strain K84 has very low similarity with genes from the *Rhizobiaceae* family, suggesting that this predicted CPS locus belongs to a larger DNA region that could be a genomic island in the K84 genome.

The second biofilm mutant we identified has an insertion in the *rkpK* gene, and resulted in the formation of denser biofilms on both the abiotic as well as on the root tip surfaces. This gene encodes for an UDP-glucose dehydrogenase, which is predicted to catalyze the conversion of UDP-glucose to UDP-glucuronic acid (Kereszt *et al.*, 1998). The contiguous *lpsL* gene in this *rkp-2* operon, is predicted to encode for an UDP-glucuronic acid epimerase, that will convert UDP-glucuronic acid to UDP-galacturonic acid (Kereszt *et al.*, 1998). Both UDP-saccharides are likely monomeric substrates for LPS (O-antigen) or KPS (K-antigen) biosynthesis, for that reason a *rkpK* mutant of *S. meliloti* was impaired in normal LPS and KPS production (Kereszt *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2003;). The *rkpK* mutation in *A. rhizogenes* strain K84 blocks the O-antigen biosynthesis, indicated by the enriched amounts of rough LPS (LPS II). Moreover, in this study we show that *A. rhizogenes* strain K84 does not produce the high-molecular weight K-antigen capsular polysaccharide (KPS). In *S. meliloti*, three genomic regions, named *rkp-1* (*rkpA-F*, *rkpG*, *rkpH*, *rkpI*), *rkp-2* (*rkpK-LpsL*) and *rkp-3* (*rkpL-Q*, *rkpR-T*) are required for KPS biosynthesis (Kereszt *et al.*, 1998, Putnoky *et al.*, 1990, Müller *et al.*, 2009). The fact that *A. rhizogenes* K84 genome lacks the *rkp-1* and *rkp-3* loci is in agreement with our analytical data showing that the strain K84 does not produce the characteristic KPS fraction observed in rhizobia.

Interestingly, the *rkpK* mutant strain grew preferentially in a sessile stage (aggregates or biofilms), rather than in suspension (planktonic), when grown in liquid culture under static and shaking conditions. This culture behaviour suggested that the lack of the O-antigen in the LPS from *rkpK* mutant enhances the adherence between cells, allowing higher bacterial numbers within the biofilms formed either on the abiotic or the root tip surfaces. One hypothesis to explore would be the fact that *rkpK* mutant lacks the O-antigen linked to the core and, subsequently, the core oligosaccharides would be exposed (Kannenberg *et al.*, 1998). Some of these core saccharides, such as N-acetyl-glucosamine, can act as potent intercellular and surface adhesins (Jefferson, 2009; Tomlinson and Fuqua, 2010). Although we can not infer the exact role of the O-antigen LPS in the formation of biofilms by strain K84 based on this *rkpK* mutant phenotype, it is likely that it could be necessary for an efficient root colonization by this biocontrol agent (Lerouge and Vanderleyden, 2001). In fact, the lack of the O-antigen LPS in the *rkpK* mutant could compromise its fitness, since others O-antigen mutants of several rhizobia species show decreased competitiveness when compared with their wild-types (Noel *et al.*, 2000; D'Antuono *et al.*, 2005).

Clearly biofilm formation is a highly complex system and involves a number of development-specific functions. The data presented here are a first step in dissecting the biofilm formation process in this important biocontrol agent, where the *wcbD* gene is required for attachment to polypropylene (cell-surface interactions), likely through the synthesis of a yet uncharacterized capsular polysaccharide (CPS), which is distinct from the K-antigen KPS produced by other rhizobial strains. In K84 genome, only a subset of the *rkp* genes (specifically the *rkpK-2* locus) are present. One of these genes, *rkpK*, is required for the synthesis of the O-antigen in the LPS from strain K84 and to form normal biofilms by this crown gall biocontrol agent.

**The biocontrol agent *Agrobacterium rhizogenes* K84 requires cyclic  $\beta$ -1,2 glucan regulated by a two-component system for proper motility and biofilm formation**

*Plant Pathology* (en preparación)

## Abstract

The crown gall biocontrol agent, *Agrobacterium rhizogenes* strain K84, is an efficient colonizer of roots, where it forms complex biofilms. Since motility is a very important factor in the colonization of surfaces and in biofilm formation, two derivative mutants of strain K84 defective in surface motility, one disrupted in *ndvB* gene, coding for the cyclic  $\beta$ -1,2 glucan synthetase, and other in *feuP* gene, coding for a response protein of the two-component system FeuP-FeuQ, were evaluated for swimming motility and biofilm formation. Both mutants exhibited reduced swimming halos, but the wild phenotype was restored by adding salt to the medium, which indicates that the defect is due to osmotic stress. Although the two mutants were able to attach and form biofilms on polypropylene surfaces, they did it at a lower extent than the wild-type strain. In conclusion, cyclic  $\beta$ -1,2 glucans seem not to be crucial but required for normal bacterial motility, hypoosmotic stress resistance and biofilm formation in biocontrol agent *A. rhizogenes* K84, through regulation by a two-component system.

## Introduction

*Agrobacterium rhizogenes* strain K84, a biocontrol agent for crown gall disease (reviewed by Penyalver *et al.*, 2000), attaches to and colonizes roots very efficiently (Shim *et al.*, 1987; Macrae *et al.*, 1988; Vicedo *et al.*, 1993; Peñalver *et al.*, 1996; Penyalver & López, 1999). Moreover, we have recently shown that K84 is able to form biofilms both on abiotic and plant root surfaces. In plant, these biofilms become multilayered and complex structures, with cells adhered to each other and to roots (Abarca-Grau *et al.*, 2011a).

A critical early step in infection process in *Rhizobiaceae* is the attachment to plant, which involves several adhesins and polysaccharides (Ausmees *et al.*, 2001; Laus *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2006). In fact, we have recently identified an adhesion factor related to a capsular polysaccharide locus in strain K84 (Abarca-Grau *et al.*, 2011b). After initial attachment to a surface, bacteria can assemble into biofilms. Motility, through several modes of translocation, influences the colonization and biofilm formation on surfaces since it allows an optimal positioning of bacteria in microniches (Berg, 2003). *Agrobacterium* spp. drive swimming motility through a small group of polar or subpolar flagella, being nonmotile mutants of *A. tumefaciens* deficient in biofilm formation under static conditions (Merritt *et al.*, 2007). *A. rhizogenes* strains do not swarm (Süle *et al.*, 2009a), but they can drive swimming and surface motilities in semi-solid media. Cells within biofilms are often enmeshed within a matrix largely composed of exopolysaccharides (Branda *et al.*, 2005). Motility and matrix production are involved in the formation of mature biofilms (Tomlinson *et al.*, 2010).



Periplasmic cyclic glucan polysaccharides are required in several bacterial species, such as *A. tumefaciens*, *Brucella abortus* and *Xanthomonas campestris*, for interactions with their respective hosts (Breedveld and Miller, 1994; Arellano-Reynoso *et al.*, 2005; Rigano *et al.*, 2007). Cyclic glucans are major cell envelope components in *Rhizobiaceae* (Breedveld and Miller, 1998) and, specifically, cyclic  $\beta$ -1,2-glucans seem to have an important function as periplasmic solutes for hypoosmotic adaptation (Breedveld and Miller, 1998). *Agrobacterium* spp. and *Sinorhizobium* spp. strains exhibit cyclic glucan levels that are inversely proportional to the osmolarity of their growth medium, with cyclic glucan synthesis enhanced at low osmotic strengths (Dylan *et al.*, 1990). Gene *ndvB* encodes an integral membrane glycosyltransferase that synthesizes cyclic glucans in the cytoplasm (Castro *et al.*, 1996; Ciocchini *et al.*, 2007), which are transported to the periplasmic compartment by a cyclic glucan exporter of the ATP-binding cassette transporter family, encoded by *ndvA* gene (Stanfield *et al.*, 1988). Sensing of environmental information in bacteria is often mediated by two-component phosphotransfer systems. They typically consist of a membrane-bound sensor kinase that communicates environmental cues to an intracellular response regulator via phosphorylation (West and Stock, 2001). In *Sinorhizobium meliloti* the two component system FeuP-FeuQ regulates transcription of *ndvA*, responding to extracellular osmotic conditions, with low osmolarity stimulating *ndvA* expression (Griffits *et al.*, 2008).

Although it is very likely that polysaccharides may also operate in host colonization, biofilm and biocontrol (Bais *et al.*, 2004) in K84 strain, there is no information about their exact role in all these important processes. In this study, we have investigated the involvement of a cyclic  $\beta$ -1-2-glucan

synthetase and a response protein of FeuP-FeuQ system encoding genes in bacterial motility and biofilm formation in the biocontrol agent *A. rhizogenes* K84.

## Materials and methods

### Bacterial strains

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) was used for growing *Escherichia coli*. *Agrobacterium rhizogenes* strain K84 was routinely grown on rich MG/L (Cangelosi *et al.*, 1992) or minimal AT (Tempe *et al.*, 1977) with 0.2% mannitol as a carbon source (ATM) media, both supplemented with biotin (2 µg/ml). Antibiotics were added to media at the following concentrations (µg/ml): for *Agrobacterium*, tetracycline (Tc), 10; gentamicin (Gm), 15; for *E. coli*, Tc, 20; Gm, 10; and Ampicilin, 50.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype, phenotype or characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
Strains		
<i>A. rhizogenes</i>		
K84	Non-pathogenic strain; crown gall biocontrol agent	Kerr (1972)
M90	<i>Mar2xT7</i> -induced mutant of K84; <i>ndvB</i> ( <i>Arad4726</i> ); motility and biofilm defective; Gm <sup>r</sup>	This study
M123	<i>Mar2xT7</i> -induced mutant of K84; <i>feuP</i> ( <i>Arad1490</i> ); motility and biofilm defective; Gm <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i>		
S17-1 ( $\lambda$ pir)	Pro <sup>-</sup> Res <sup>-</sup> Mod <sup>+</sup> <i>recA</i> ; integrated RP4-Tet::Mu <sup>-</sup> Kan::Tn7, Mob <sup>+</sup> , pir <sup>+</sup> , Sm <sup>r</sup>	Simon <i>et al.</i> (1983)
Plasmids		
pMar2xT7	Suicide vector for delivery of the mariner family transposon <i>MAR2xT7</i> , Amp <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Liberati <i>et al.</i> (2006)

<sup>a</sup> Abbreviations are: Mob<sup>+</sup>, mobilizes transfer to other plasmids; Ap<sup>r</sup>, resistance to ampicilin; Gm<sup>r</sup>, resistance to gentamicin. Sm<sup>r</sup>, resistance to streptomycin.

### **Transposon mutagenesis and *MAR2xT7* insertion-site identification**

The *MAR2xT7* transposon-induced mutagenesis library was generated in *A. rhizogenes* strain K84, and the insertion-site identification of selected mutants was performed according to Abarca-Grau *et al.* (2011b) and Liberati *et al.* (2006).

### **Surface motility assay**

The diameter of the growth colonies of the wild-type strain K84 onto solid (2%) and semi-solid (0,5%) agar plates of MG/L and GG/L (modified MG/L where the carbon source is 0.4% glycerol instead of mannitol) media was compared.

### **Mutant screen**

Transposon-induced mutants of strain K84 were screened in two steps. In the first screen, sets of 12 mutants were patched on semisolid GG/L medium in 15 cm diameter Petri dishes. Diameters of colonies were monitored at 4-6 days. Each potential mutant compromised in surface motility in this first screen was then screened again individually to quantify the defect.

### **Growth assays**

Growth rates in rich (MG/L and GG/L) and minimal (ATM) liquid media at 26°C were evaluated for wild-type and mutant strains, using the Bioscreen C system (Labsystems, Finland), with temporary shaking at intervals of 1 hour. The OD<sub>600</sub> was periodically recorded over 120 hours.

### **Swimming motility assays and sensitivity to osmotic stress**

Swimming was evaluated in quasi-liquid (0.25% agar) 1/20 diluted MG/L. A volume of 4  $\mu$ l of a  $10^9$  cfu/ml bacterial suspension was inoculated inside the medium. Plates were incubated face up at 26°C, and motility was assessed by measuring the diameter of the colonies at 4-6 days inside the medium.

The effect of osmolarity was evaluated in the quasi-liquid 1/20 diluted MG/L supplemented with 100 mM NaCl (Griffits *et al.*, 2008). Plates were inoculated, incubated and evaluated as described above.

### **Calcofluor assays**

The production of  $\beta$ -linked polysaccharides was assessed by streaking cultures of 48-72h of the different strains on MG/L supplemented with 0.02% Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor) (Sigma-Aldrich, MO, USA). After incubation at 26°C for 72h, plates were observed under UV irradiation.

### **Quantification of extracellular polysaccharide (EPS) production**

This assay was performed according to Crespo-Rivas *et al.* (2009). Briefly, strains were grown in 50 ml of GG/L in an orbital shaker (180 rpm) for 72h. Then, bacterial cultures were adjusted to an  $OD_{600}$  of  $10^7$  CFU/ml, and incubated again for another 72h. Afterwards,  $OD_{600}$  was monitored again

and culturable counts on MG/L were performed. After centrifugation at 10,000 x *g* for 15 min, supernatants were mixed with three volumes of acetone and EPS were recovered with a glass rod, dried at 60°C for 3h, and weighed.

### **Biofilm formation**

Biofilm formation was evaluated in ATM liquid medium in polypropylene 96-well microtitre plates. The amount of surface-attached cells was determined by the standard crystal violet assay after static incubation for 48h at 26°C (O'Toole & Kolter, 1998a; Abarca-Grau *et al.*, 2011b).

### **Statistical analysis**

Analysis of variance of data collected from the surface motility, swimming, osmotic stress and biofilm experiments was performed with the InfoStat software.

## Results

### Surface motility

Strain K84 grew at the same rate on MG/L and GG/L liquid media (data not shown), and the diameter of the growth colonies onto both solid agar media was also similar. However, the growth colonies of strain K84 were significantly larger on GG/L than MG/L when semi-solid media were inoculated (Table 1), reflecting somehow a type of surface motility.

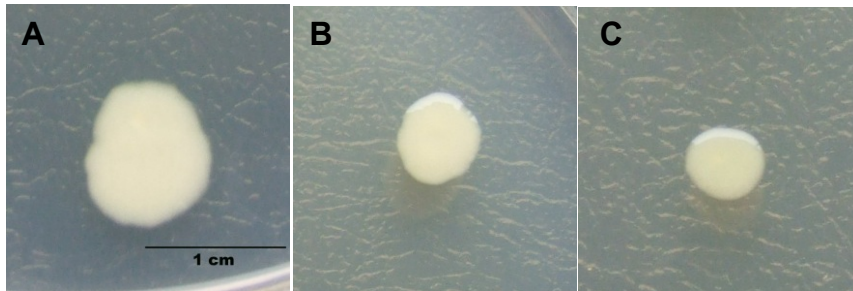
**Table 1.** Diameter (mm) of the growth colonies of strain K84 on solid and semi-solid media.

	MG/L	GG/L
Solid	10 ± 0,1	10 ± 0,2
Semi-solid	15, 5 ± 0,5	24 ± 0,4

### Selection of mutants

A genetic screen for K84 mutants deficient in surface motility identified mutants M90 and M123, which grew normally in GG/L liquid medium (data not shown), but were partially defective in surface motility, showing a reduction of approximately 40 and 50%, respectively, in colony diameter respect to the wild-type strain (Fig. 1).





**Figure 1.** Colonies of *A. rhizogenes* strain K84 (A) and its derivative mutants M90 (*ndvB*) (B) and M123 (*feuP*) (C) patched on semisolid (0.5% agar) GG/L medium.

### Genetic analysis of selected mutants

Sequence analysis of the transposon-K84 DNA flanking region from genomic DNA of the mutant M90 localized the insertion site within the coding sequence of the 8,511 bp *Arad4726* gene, which has been designated as *ndvB*. This gene is located on chromosome 1 of strain K84, and the transposon is inserted between nucleotides 6,938 and 6,939. The translated product of *ndvB* gene shows the highest similarity with a transmembrane  $\beta$ -1,2 glucan biosynthesis protein from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 [75% Identities (I) and 86% Similarity (S)], the glycosyltransferase 36 from *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 [75% I and 86% S] and a beta-1,2-glucan production associated transmembrane protein from *R. etli* CIAT 652 [75% I, 86% S]. Gene *ndvB* is predicted to encode the cyclic  $\beta$ -1,2 glucan synthetase (Breedveld & Miller, 1998).

The insertion site in mutant M123, after sequence analysis of the transposon-K84 DNA flanking region from genomic DNA, was disrupting the *Arad1490* gene of strain K84, which has been designed as *feuP*. This gene is

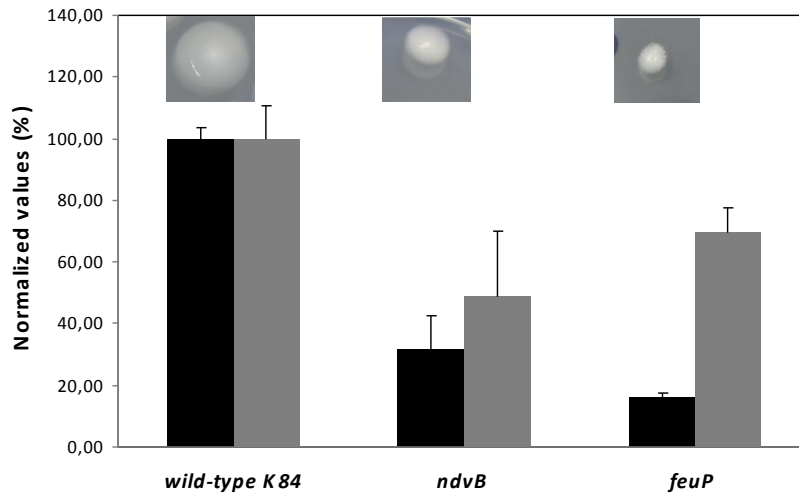
672 bp long and is located on chromosome 1 of strain K84, and the transposon is inserted between nucleotides 536 and 537. The translated product of *feuP* from strain K84 shows the highest similarity with the response protein of the osmosensory two-component system FeuP-FeuQ from *Rhizobium leguminosarum* [94% I and 96% S], and a two-component response regulator protein from *R. etli* Kim 5 [93% I and 96% S].

### **Bacterial growth**

Both *ndvB* and *feuP* mutants grew at wild-type rates and reached the same final yields as the wild-type parent when grown in rich medium GG/L. However, when grown in ATM minimal medium, they grew more slowly than strain K84, and reached a lower yield in stationary phase (data not shown).

### **Swimming motility and sensitivity to osmotic stress**

Both mutants were partially defective in swimming motility (Fig. 2, black bars). Whereas *ndvB* mutant showed a reduction of 30%, compared with the wild-type strain, *feuP* mutant showed a drastic loss of more than 80%. In pictures of Fig. 2 we can observe the growth diameter of the mutant colonies inside the agar in comparison with those of K84. However, when medium was supplemented with extra salt, the swimming defect was partially restored in both mutants (Fig. 2, grey bars).



**Figure 2.** Normalized values of swimming halos of strain K84 and the mutants *ndvB* and *feuP* in 1/20 diluted MG/L medium (black bars) and 1/20 MG/L supplemented with 100mM NaCl (grey bars). Each bar represents the mean value and the standard deviation of two independent experiments with three replicate plates per experiment (n=6).

### Extracellular polysaccharide (EPS) production

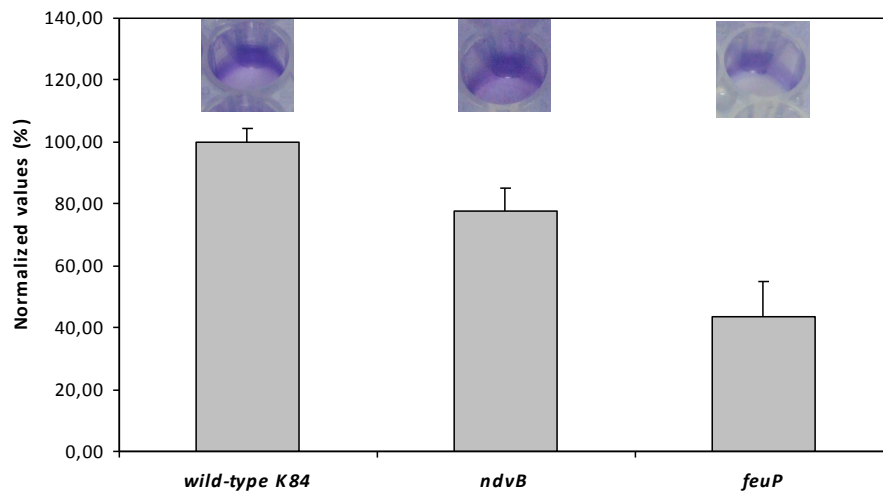
The fluorescence intensity by Calcofluor of mutants *ndvB* and *feuP* was similar to that of K84 strain (data not shown). Dry weight of EPS in supernatants from both mutants did not show significant differences with that from wild-type strain (Table 2).

**Table 2.** Extracellular polysaccharide production by K84 strain and its derivative motility mutants.

Strains	Dry weight EPS (mg)	Dry weight EPS (mg)/OD <sub>600</sub>
K84	92,75 +/- 16,60	188,92 +/- 40,10
Mutant <i>ndvB</i>	88,80 +/- 5,20	162,28 +/- 3,30
Mutant <i>feuP</i>	75,56 +/- 5,60	92,75 +/- 16,60

### Biofilm formation

In spite of the fact that both mutants were able to form biofilms on polypropylene wells, values of DMSO-solubilized crystal violet stain ( $A_{600}$ ) of attached bacteria were significantly lower than those from the wild-type strain, more than 20% and 50 % for *ndvB* and *feuP* mutants, respectively (Fig. 3).



**Figure 3.** Normalized values of the  $A_{600}$  of DMSO-solubilized crystal violet stain of strain K84 and the mutants *ndvB* and *feuP* in polypropylene plates, as a measure of the biofilm formation ability according to the amount of attached cells to wells. Each bar represents the mean value and the standard deviation of two independent microtiter plates with at least four replicate wells per plate ( $n \geq 8$ ).

## Discussion

The crown gall biocontrol agent *A. rhizogenes* K84 efficiently colonizes the roots, and this interaction with the host can be driven by the formation of biofilms (Abarca-Grau *et al.*, 2011a). Since motility is a very important factor in the colonization of surfaces and biofilm formation (Berg, 2003), two mutants of K84 strain with altered surface motility phenotypes, *ndvB* and *feuP*, were selected and studied. Gene *ndvB* encodes an integral membrane glycosyltransferase that synthesizes cyclic glucans in the cytoplasm (Castro *et al.*, 1996; Ciocchini *et al.*, 2007), which are transported to the periplasmic compartment by a cyclic glucan exporter protein encoded by the *ndvA* gene (Stanfield *et al.*, 1988). An osmosensory two-component regulatory system (FeuP-FeuQ) is required in *S. meliloti* for cyclic glucan export by regulating *ndvA* gene (Griffits *et al.*, 2008).

Besides defects in surface motility, *ndvB* and *feuP* mutants were defective in swimming motility. Since cyclic glucan levels in *Rhizobiaceae* are inversely proportional to the osmolarity of growth medium, with synthesis enhanced at low osmotic strengths (Breedveld and Miller, 1998), because they act as relevant periplasmic solutes (Miller *et al.*, 1986), we tested the addition of supplemental NaCl to the swimming medium. In these conditions, swimming phenotype was partially restored. Results are in agreement with previous studies on *ndv* mutants of *A. tumefaciens* (Zorreguieta *et al.*, 1990) and *feuP* mutants of *S. meliloti* (Griffits *et al.*, 2008), confirming the role of cyclic glucans in growth and motility under hypoosmotic stress (Breedveld and Miller, 1998; Griffits *et al.*, 2008), and the sensing of these environmental conditions through a two-component system FeuP-FeuQ (Griffits *et al.*, 2008). A model in which FeuQ functions as a sensor that

transduces environmental information through a response regulator, FeuP, to multiple downstream transcriptional targets, including the cyclic glucan exporter gene *ndvA*, has been suggested in *S. meliloti* (Griffits *et al.*, 2008). Recently, it has been described a modulator of this signaling system, FeuN, that interacts directly with FeuQ to attenuate phosphorylation of FeuP (Carlyon *et al.*, 2010). Since *feuN* locus is also present in the chromosome of *A. rhizogenes* strain K84, the regulation of FeuP-FeuQ system in strain K84 is probably similar to that described for *S. meliloti*.

The defect in surface motility shown by *ndvB* mutant could be explained by some changes in the properties of the cell envelopes, which can occur in cells that failure to synthesize cyclic  $\beta$ -glucans (Breedveld and Miller, 1994), but we do not know yet the nature of these changes. Calcofluor has the capacity to bind to a wide range of exopolysaccharides, especially those containing (1-3) and (1-4)  $\beta$ -D-glucan linkages (Wood, 1980). Therefore, calcofluor binding and extracellular polysaccharide assays suggest that the *ndvB* and *feuP* mutations are not affecting to the production of any major exopolysaccharide produced by strain K84.

Both mutants were able to attach to and form biofilms on polypropylene surfaces, but at a decreased rate than wild type strain, suggesting that cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans are not crucial for attachment and biofilm formation; however, they could play some minor role in the development of biofilms *in vivo*. It is likely that cyclic glucans, which influence on cell motility and resistance to osmotic stress, determine in some degree the biofilm formation. It is usual that, under static culture conditions, a deficiency in motility limit the ability of cells to interact with and subsequently attach to surfaces and form biofilms. In fact, several studies with *ndv* (former *chv*

gene) mutants of *A. tumefaciens* C58 have indicated that cyclic glucans may be involved in the attachment to plant cells, showing altered polysaccharide synthesis and colonization of roots (Douglas *et al.*, 1985; Puvanesarajah *et al.*, 1985; Matthyse *et al.*, 2005). The accumulation of periplasmic cyclic  $\beta$ -glucans may be advantageous and/or essential for cells to adapt to changing osmotic conditions (Breedveld and Miller, 1998) that likely *Agrobacterium* species face in the soil and rhizosphere. Therefore, the next step will be to investigate the behaviour of these mutants in the rhizosphere.

In summary, our results confirm and support a model in which cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans are required for proper bacterial motility, hypoosmotic stress resistance and biofilm formation in the biocontrol agent *A. rhizogenes* strain K84 and its regulation by an osmosensory two-component regulatory system.

**The carboxy terminal protease CtpA controls  
motility and biofilm formation in the  
biocontrol agent *Agrobacterium rhizogenes*  
K84 through proper exopolysaccharide  
production**

*Applied and Environmental Microbiology*  
(en preparación)



## Abstract

The crown gall biocontrol *Agrobacterium rhizogenes* strain K84 forms biofilms during colonization of the plant roots. Bacterial motility is a major factor in colonization of surfaces and biofilm formation. A genetic screen for K84 mutants deficient in surface motility identified disruptions in an orthologous gene of the carboxy-terminal protease *ctpA*. While the *ctpA* cells grew normal in minimal and complex liquid media, they showed decreased surface and swimming motilities in semi-solid media, likely due to a rise in susceptibility to desiccation in semi-solid media. Loss of *ctpA* function increased sensitivity to hypo-osmotic stress, indicating an alteration in the permeability of the cell envelope. Also, the *ctpA* mutant secreted less amounts of exopolysaccharides to the medium than the wild-type. On the other side, the *ctpA* mutant bound to polypropylene surface, but forming biofilms with less adherent cells than those of the wild-type strain. Expression of a functional copy of *ctpA* in the mutant background restored its pleiotropic phenotype. In summary, the carboxy-terminal protease CtpA of the biocontrol agent K84 is required for normal motility and biofilm formation through the proper exopolysaccharide production.

## Introduction

*Agrobacterium* spp. are soil-borne bacteria causing crown gall and other diseases in a wide variety of plants (Pulawska, 2010). Plant tumours can be controlled by treating the root system with the highly efficient biocontrol agent *A. rhizogenes* strain K84 (reviewed by Penyalver *et al.*, 2000). Strain K84 attaches to and colonizes the roots forming biofilms (Vicedo *et al.*, 1993; Peñalver *et al.*, 1996; Penyalver and López, 1999; Abarca-Grau *et al.* 2011b). Motility is considered a phenomenon enabling bacteria to colonize and to form biofilms on solid surfaces, including plant roots (Harshey, 2003; Danhorn and Fuqua, 2007). It has recently been reported that *A. rhizogenes* strains do not swarm (Süle *et al.*, 2009a), but strain K84 displays surface motility in semi-solid media (Abarca-Grau *et al. unpublished results*; capítulo III). Motility defective mutants of strain K84 show reduced ability to form biofilms growing in static conditions (Abarca-Grau *et al. unpublished results*; capítulo III).

Proteolysis is important in regulating the virulence of many bacterial pathogens (Kovach *et al.*, 1995), probably due to the importance of periplasmic proteases for stress response during host invasion, as described in the human pathogen *Brucella suis* (Bandara *et al.*, 2005). In fact, the carboxy-terminal protease CtpA has been shown to play an important role in desiccation tolerance in *Rhizobium leguminosarum* (Gilbert *et al.*, 2007), which is a genetically close species of *A. rhizogenes* K84 (Slater *et al.*, 2009). In this work, we show that the *ctpA* gene is required in the biocontrol agent *A. rhizogenes* K84 for normal bacterial motility and biofilm formation via exopolysaccharide production.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) was used for growing *Escherichia coli*. *Agrobacterium rhizogenes* strain K84 was routinely grown on rich MG/L (Cangelosi *et al.*, 1992) supplemented with biotin (2 µg/ml). AT (Tempe *et al.*, 1977) or AB (Chilton *et al.*, 1974) minimal media, with 0.2% mannitol as a carbon source (called ATM or ABM, respectively) and supplemented with biotin (2 µg/ml) were also used. Antibiotics were added to media at the following concentrations (µg/ml): for *Agrobacterium*, tetracycline (Tc), 10; gentamicin (Gm), 15; kanamycin (Km), 100 and neomycin (Nm), 100; for *E. coli*, Tc, 20; Gm, 10; Ampicilin (Ap), 50 and Km, 50.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype, phenotype or characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
Strains		
<i>A. rhizogenes</i>		
K84	Non-pathogenic strain; crown gall biocontrol agent	Kerr (1972)
M130	<i>Mar2xT7</i> -induced mutant of K84; <i>ctpA</i> ( <i>Arad4892</i> ); motility, exopolysaccharide and biofilm defective; Gm <sup>r</sup>	This study

---

*E. coli*

DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
S17-1 ( $\lambda$ pir)	Pro <sup>-</sup> Res <sup>-</sup> Mod <sup>+</sup> <i>recA</i> ; integrated RP4- Tet::Mu <sup>-</sup> Kan::Tn7, Mob <sup>+</sup> , pir <sup>+</sup> , Sm <sup>r</sup>	Simon <i>et al.</i> (1983)
Plasmids		
pMar2xT7	Suicide vector for delivery of the mariner family transposon <i>MAR2xT7</i> , Amp <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Liberati <i>et al.</i> (2006)
PBBR1-MCS-2	RK2-based cloning vector, Km <sup>r</sup>	Kovach <i>et al.</i> 1995
pCtpA	1362 bp PCR fragment containing the <i>Arad4892</i> cloned into pBBR1-MCS-2 that complements the 130 mutation	This study

<sup>a</sup> Abbreviations are: Mob<sup>+</sup>, mobilizes transfer to other plasmids; Ap<sup>r</sup>, resistance to ampicillin; Gm<sup>r</sup>, resistance to gentamicin. Sm<sup>r</sup>, resistance to streptomycin, Km<sup>r</sup> resistance to kanamycin, Tet<sup>r</sup>, resistance to tetracycline.

### DNA manipulations

Plasmid DNA was isolated from *E. coli* by an alkaline lysis-based procedure kit following manufacturer's instructions (Qiagen). Standard recombinant DNA techniques were used as described by Sambrook *et al.* (1989). Plasmids were introduced into *Agrobacterium* spp. Cells by electroporation (Mersereau, 1990) or by biparental cross streak mating using *E. coli* S17-1( $\lambda$ pir) harboring the plasmid of interest as the conjugative donor (Simon *et al.*, 1983). Genomic DNA from *Agrobacterium* spp. strains

was isolated using a kit and following manufacturer's instructions (Epicentre).

### **Transposon mutagenesis and insertion-site identification**

The *MAR2xT7* transposon-induced mutagenesis library was generated in *A. rhizogenes* strain K84, the insertion-site identification of the *ctpA* mutant were performed according to Liberati *et al.* (2006) and Abarca-Grau *et al.* (2011a), capítulo II.

### **Gene cloning**

A fragment of 1.375 bp containing the entire *ctpA* gene (*Arad4892*) was obtained by PCR amplification of genomic DNA from strain K84 using the specific designed forward 5'-TAAGGTACCGAAAGGCACGCAATGATAC-3' and reverse 5'-TTAACTAGTAAGCGCCGGGTCTGTTTC-3' primer set and cloned between the *KpnI* and *SpeI* sites of the broad host range vector pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995), to give pCtpA.

### **Surface motility screen**

Transposon-induced mutants of strain K84 were screened in two steps. In the first screen, sets of 12 mutants were patched on semi-solid (0.5% agar) GG/L medium (modified MG/L medium where the carbon source is 0.4% glycerol instead of mannitol) in 15 cm diameter Petri dishes.

Diameters of colonies were monitored at 4-6 days. Each potential mutant compromised in surface motility in this first screen was then re-screened individually to quantify the defect.

### **Growth assays**

Growth rates in rich (GG/L) and minimal (ATM) liquid media at 26°C were evaluated for wild-type and *ctpA* mutant strains, using the Bioscreen C system (Labsystems, Finland), with temporary shaking at intervals of 1 hour. The OD<sub>600</sub> was recorded over 120 hours.

### **Swimming motility and sensitivity to hypo-osmotic stress**

Swimming motility was evaluated in quasi-liquid (0.25% agar) 1/20 diluted MG/L medium. A volume of 4 µl of a 10<sup>9</sup> cfu/ml bacterial suspension was inoculated inside the medium. Plates were incubated face up at 26°C, and motility was assessed by measuring the diameter of the growth halo inside the medium at 4-6 days. The effect of high osmolarity on growth was evaluated on the same swimming medium supplemented with 100 mM NaCl according to Griffiths *et al.* (2008). Plates were inoculated, incubated and evaluated as described above for swimming assays.

### **Calcofluor binding and quantification of extracellular exopolysaccharide (EPS) production**

The production of  $\beta$ -linked polysaccharides was assessed by streaking cultures of 48-72h of the different strains on solid MG/L supplemented with 0.02% Fluorescent Brightener 28 (calcofluor, Sigma-Aldrich, MO, USA). After incubation at 26°C for 72h, plates were observed under UV irradiation. Total carbohydrate amounts of the exopolysaccharides (EPS)-containing supernatants were determined using the anthrone-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method, which measures the total reducing sugars content in a given sample (Morris, 1948). Briefly, cultures were grown in 1/20 diluted MG/L at 26°C for 72h and 1 ml culture samples were prepared by centrifugation to remove cells. This cell-free culture fluid was assayed for EPS content via sulphuric acid hydrolysis in the presence of the colorimetric indicator anthrone. To this end, 250  $\mu$ l anthrone solution (2% w/v in ethyl acetate) were added to 1 ml culture sample, then hydrolysed with 2,5 ml concentrated sulphuric acid. The absorbance at 620 nm was measured and amounts of carbohydrates were calculated using a standard curve of known concentrations of glucose (0-100  $\mu$ g/ml). Exopolysaccharide values were normalized to the OD<sub>600</sub> of each culture.

### **Biofilm formation**

Biofilm formation was evaluated in ATM liquid medium in 96-well microtitre polypropylene plates. The amount of surface-attached cells was determined by the standard crystal violet assay after static incubation for

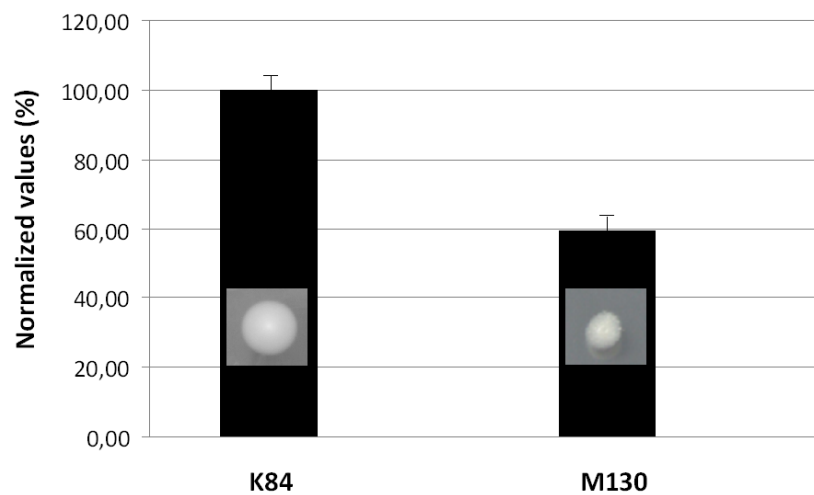
48h at 26°C according to O'Toole and Kolter (1998) and Abarca-Grau *et al.* (2011b; capítulo I).



## Results

### Identification of a *ctpA* mutant from strain K84 with a reduced surface motility

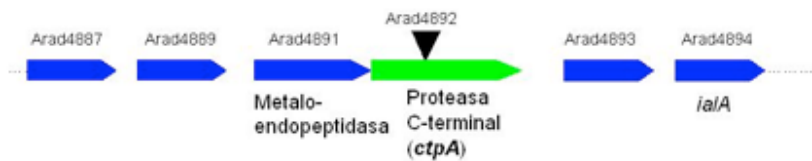
A genetic screening for K84 mutants deficient in surface motility identified the mutant M130, which grew normally in GG/L liquid medium (data not shown), but was partially defective in surface motility, showing a reduction of ca. 60% in colony diameter respect to the wild-type strain (Fig. 1).



**Figure 1.** The M130 mutant exhibits a decrease swimming phenotype in semi-solid medium. Normalized values are shown 4 days after inoculation on 1/20 MG/L medium (0,25 % agar). Each bar represents the mean value and the standard deviation of at least two independent experiments with three replicate plates per experiment ( $n \geq 6$ ). Plates show representative growth halos inside the medium.

## Genetic analyses

Sequence analysis of the transposon-K84 DNA flanking region from genomic DNA of the mutant M130 localized the insertion site within the coding sequence of the 1,326 bp *Arad4892* gene, which has been designated as *ctpA*. This gene is located on chromosome 1 of strain K84, and the transposon is inserted between nucleotides 244 and 245. The translated product of *ctpA* gene shows the highest similarity with the C-terminal processing protease CtpA protein from *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 [88% Identities and 95% Similarity], and from C-terminal processing peptidase protein from *R. etli* GFN42 [87% Identities and 95% Similarity]. The genetic structure of the *ctpA* locus of *A. rhizogenes* strain K84 is shown in Fig. 2.

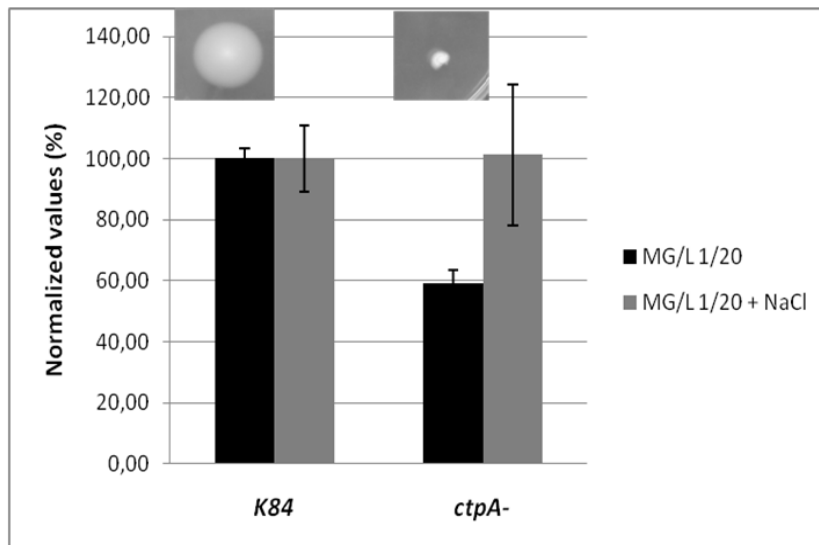


**Figure 2.** The *ctpA* gene of *A. rhizogenes* strain K84 is the second gene of two-gene locus.

## Swimming motility and sensitivity to osmotic stress

The *ctpA* mutant was also partially defective in swimming motility, showing a reduction of ca. 40% in the diameter of the growth halo inside the medium respect to the wild-type (Fig. 3). However, when salt was added to the medium, the swimming defect was fully restored (Fig. 3),

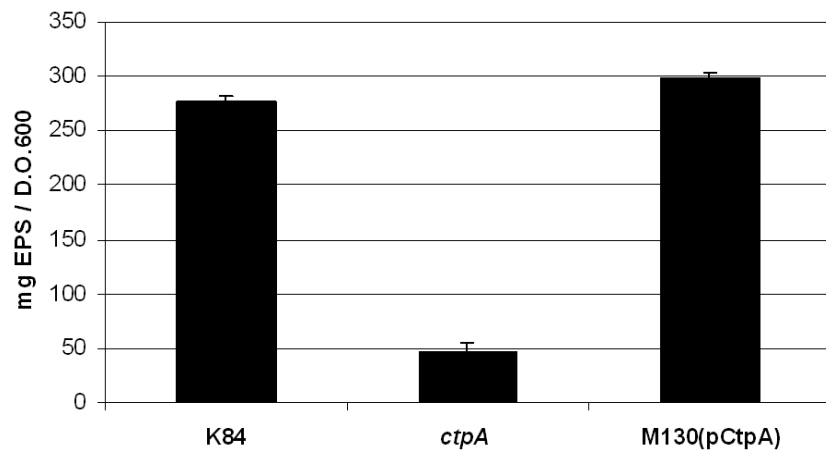
suggesting that the motility defect is due to a lower tolerance to hypo-osmotic stress in the *ctpA* mutant.



**Figure 3.** The *ctpA* mutant exhibits a decreased swimming motility in quasi-liquid (0.25% agar) 1/20 diluted MG/L medium. Normalized values are shown 6 days after inoculation. Each bar represents the mean value and the standard deviation of at least two independent experiments with three replicate plates per experiment ( $n \geq 6$ ). Gray bars represent the diameter of growth halos inside the same medium supplemented with 100 mM NaCl. The *ctpA* mutant recovers the wild type phenotype.

### Calcofluor binding and exopolysaccharide production

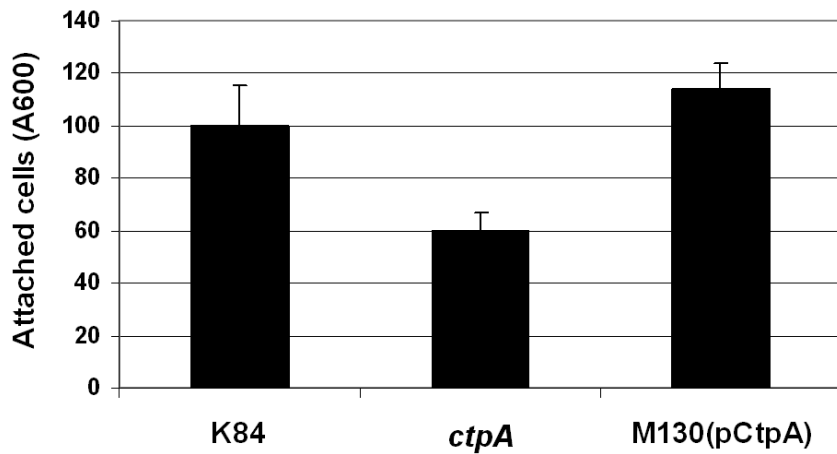
The fluorescence intensity of the *ctpA* mutant colonies in presence of calcofluor was just slightly lower than that of the wild-type strain K84 (data not shown). However, as shown in Fig. 4, the total amount of carbohydrates in the EPS-containing supernatant from the *ctpA* mutant was significantly lower than that from wild-type supernatants. The cloned *ctpA* gene from strain K84 fully restored EPS production in the M130 mutant background (Fig. 4).



**Figure 4.** A *ctpA* mutation decreases exopolysaccharide production. Exopolysaccharides (EPS) were determined from the supernatants of wild-type K84 strain and the *ctpA* mutant, as well the supernatant of M130 mutant strain containing the complementing plasmid pCtpA. The total carbohydrate content was determined by the anthrone-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> assay (Morris, 1948). The amount of carbohydrate was normalized to the OD<sub>600</sub> of the culture. Each bar represents the mean value and the standard deviation of a representative experiment with two replicate cultures.

## Biofilm formation

In spite of the fact that *ctpA* mutant was able to attach to and form biofilms on polypropylene wells, values of DMSO-solubilized crystal violet stain ( $A_{600}$ ) of attached bacteria were significantly lower than those reached by the wild-type strain (Fig. 5). *In trans* expression of the *ctpA* gene in the M130 mutant background fully restored the capability to form biofilms (Fig. 5).



**Figure 5.** A *ctpA* mutation decreases biofilm production. Biofilm formation of wild-type K84 strain and the *ctpA* mutant, as well the M130 mutant strain containing the complementing plasmid pCtpA, was measured by the  $A_{600}$  values of DMSO-solubilized crystal violet from adherent cells to polypropylene wells after cells were grown in ATM liquid medium for 4 days. Each bar represents the mean value and the standard deviation of two independent experiments with six replicate wells per strain and experiment ( $n \geq 12$ ).

## Discussion

Proteolysis is known to control key processes in bacterial pathogens and CtpA proteases have been characterized in other model bacteria such as *E. coli* (Hara *et al.*, 1991) and *P. aeruginosa* (Reiling *et al.*, 2005). However, this important physiological process is virtually unknown in symbionts or pathogens belonging to the *Rhizobiaceae*. To our knowledge, the link between the *ctpA* gene and desiccation tolerance has only been established in *Rhizobium leguminosarum* within this bacterial family (Gilbert *et al.*, 2007). As reported for *R. leguminosarum*, our *A. rhizogenes* *ctpA* mutant displays impaired growth on semi-solid nutrient rich media, as reflected by a smaller colony diameter in surface motility assays. The fact that the *ctpA* mutant can grow normal in GG/L broth suggests that it is not a component of the GG/L medium that inhibits growth. The *ctpA* mutant from strain K84 is also greatly impaired in swimming motility. Both surface and swimming motility phenotypes might be due to an increase in susceptibility to desiccation on semi-solid media (Gilbert *et al.*, 2007).

A link between exopolysaccharide (EPS) production and the desiccation tolerance phenotype observed in the *ctpA* mutant from *R. leguminosarum* has been suggested (Gilbert *et al.*, 2007). Our experimental results demonstrate that the *ctpA* mutant produces less amounts of carbohydrates in EPS-containing supernatants, what suggest that the surface motility and desiccation tolerance observed phenotypes can be related to a defect in EPS production. Supporting this hypothesis is the fact that EPS have been shown to increase desiccation tolerance (Robertson and Firestone, 1992; Ophir and Gutnick, 1994) and act as surfactant since they

contribute to hydrate the bacterial cells reducing surface tension (Harshey, 2003).

Recently, we have shown that this biocontrol agent form biofilms not only on abiotic but also on plant root surfaces, where biofilms become complex and structured, with cells adhered to surface and to each other (Abarca-Grau *et al.* 2011b; capítulo I). In spite of the fact that the *ctpA* mutant from *A. rhizogenes* strain K84 attached to polypropylene wells, and formed biofilms, amounts of attached bacteria were lower than those from the wild-type. Biofilm matrix is mainly composed by EPS, which suggest that the CtpA protease from strain K84 is controlling the production of an EPS with certain role in biofilm formation.

When provided *in trans*, the *ctpA* gene was able to complement the mutation in the mutant strain M130, confirming the role of CtpA proteolysis in motility and biofilm formation through proper EPS production. Nevertheless, the exact roles played by CtpA in *Agrobacterium*-plant interactions remain to be elucidated. The evaluation of the ability of this *ctpA* mutant for root colonization and biocontrol efficacy, in comparison with the wild-type strain K84, would contribute to throw light on the complex mechanisms employed by this organism to control crown gall disease.

## **Discusión general**



Las bacterias pueden encontrarse en la naturaleza en estado planctónico, es decir, con movimiento libre, independientes unas de otras, o en estado sésil, formando biopelículas. Un elemento clave de la adaptación de las bacterias a un hábitat es su capacidad para establecerse en un determinado nicho, y uno de los mecanismos más importantes para ello es la adhesión o agregación (Davey y O'Toole, 2000). Se postula que el 99% de todas las células bacterianas están formando biopelículas y tan sólo un 1% están en estado planctónico o libre (Watnick y Kolter, 2000). Las biopelículas bacterianas existen desde hace millones de años, como parte de una exitosa estrategia para colonizar la mayoría de hábitats, aunque la importancia de esta forma de vida bacteriana ha sido reconocida por la comunidad científica principalmente en las dos últimas décadas (Watnick y Kolter, 2000; Harrison *et al.*, 2005). El término biopelícula se aplica hoy día, en muchas ocasiones, a lo que previamente se llamaba agregado o microcolonia. Mediante la adhesión, las bacterias no solamente se establecen sobre una superficie, sino que pueden formar comunidades y obtener beneficios adicionales de la versatilidad fenotípica de sus vecinas. Puesto que el modo de vida biopelícula es ubicuo, es probable que este tipo de comunidades sésiles sean críticas para la persistencia de las distintas especies bacterianas (Davey y O'Toole, 2000).

Desde las primeras observaciones de la colonización de la rizosfera de las plantas por los microorganismos (Rovira *et al.*, 1974) hasta la actualidad, se ha puesto de manifiesto que la forma más frecuente de organización bacteriana sobre las distintas superficies vegetales es también la biopelícula (Rudrappa *et al.*, 2008). Aunque los microorganismos pueden colonizar diferentes tejidos, como el sistema vascular, las semillas, los tallos y las hojas, es de destacar que la rizosfera, donde tienen lugar complicados

procesos ecológicos, es capaz de albergar a gran número de especies bacterianas adaptadas a la misma (Danhorn y Fuqua, 2007). La rizosfera constituye un ambiente muy favorable para la formación de biopelículas, las cuales implican mecanismos complejos y sofisticados, y a la vez sensibles a multitud de factores, tanto ambientales como intrínsecos a los organismos vivos con los que interactúan (Morris y Monier, 2003; Rudrappa *et al.*, 2008).

Las especies del género *Agrobacterium*, tanto patógenas como no patógenas, están entre los habitantes naturales del suelo y de la rizosfera de gran número de especies vegetales (Moore y Cooksey, 1981; Mougél, 2000; Pulawska, 2010). Al igual que ocurre en otras bacterias de plantas, la capacidad de formar biopelículas puede facilitar el desarrollo de algunas características cruciales para la biología de *Agrobacterium* sp., como son su supervivencia en el huésped y fuera de él, su potencial para colonizar las raíces de las plantas y su carácter patógeno (Danhorn y Fuqua, 2007). En la primera parte de esta memoria se ha demostrado que cepas de las principales especies del género *Agrobacterium*: *A. tumefaciens* (biovar 1), *A. rhizogenes* (biovar 2) y *A. vitis* (biovar 3) son capaces de formar biopelículas *in vitro* tanto en superficies abióticas como bióticas (ápices radiculares *ex planta* y raíces de tomate). Esta capacidad se había descrito previamente sólo en la cepa C58 de *A. tumefaciens*, siendo la primera vez que se demuestra en cepas de las otras dos especies. Como una primera aproximación, los modelos experimentales usando superficies abióticas son muy útiles para una caracterización inicial de la estructura de las biopelículas. Después, los estudios *ex planta* constituyen una segunda aproximación a los complejos procesos que tienen lugar en la naturaleza

cuando una bacteria pasa del modo de vida planctónico al modo de vida en forma de biopelícula.

En nuestro trabajo hemos observado que, en cepas del género *Agrobacterium*, la capacidad para unirse y posteriormente formar una biopelícula *in vitro* depende de la especie (biovar), la superficie y las condiciones de cultivo. Por tanto, la capacidad de formar biopelículas en la naturaleza podría también ser muy variable dependiendo de la especie vegetal hospedadora, el tejido de la planta y las condiciones ambientales. Sin olvidar que, en la naturaleza, las biopelículas están formadas por comunidades multi-especies (Davey y O'Toole, 2000), lo cual hace el sistema mucho más complejo para la realización de estudios *in vivo*. Las biopelículas constituyen un modo de vida que conlleva varias ventajas para las bacterias implicadas. Funcionan como estructuras que incrementan la resistencia frente a diferentes tipos de estrés ambiental, tales como la desecación, la radiación U.V., la predación y la presencia de antibióticos, constituyendo nichos protectores para el microorganismo; y, además, permiten establecer consorcios metabólicos y facilitan la transferencia horizontal de genes. La biopelícula es una forma de mantener una cantidad umbral de células en una localización específica y durante períodos suficientemente extensos como para permitir la interacción con la planta huésped. Con nuestro estudio queda patente que tanto cepas patógenas como no patógenas de las especies *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son capaces de adherirse y agregarse formando biopelículas *in vitro*, independientemente de su capacidad para formar tumores. Dado que las células de *Agrobacterium* deben encontrar una herida para transformar la célula vegetal, la forma biopelícula les podría conferir ventajas al garantizar la larga supervivencia de gran número de células en las raíces, hasta

encontrarse con una herida receptiva que permita desencadenar el proceso de inducción tumoral en la planta. No obstante, un estudio con mayor número de cepas patógenas pondría en evidencia si existe correlación entre la capacidad de formar biopelícula *in vitro* y la mayor o menor virulencia de las cepas bacterianas.

La cepa no patógena K84 de *A. rhizogenes* es una importante herramienta biotecnológica para el control de la enfermedad causada por *Agrobacterium* sp. El tratamiento de las raíces de las plantas, mediante inmersión en una solución acuosa del agente de biocontrol inmediatamente antes de la plantación, controla la aparición de tumores en suelos infectados (López *et al.*, 1994; Penyalver *et al.*, 2000). La capacidad de síntesis del antibiótico específico contra cepas patógenas de *Agrobacterium*, agrocina 84, contribuye claramente a su eficacia como agente de biocontrol (Cooksey y Moore, 1982; López *et al.*, 1989; Penyalver *et al.*, 2009), pero, además, la cepa presenta otras muchas características fenotípicas y genéticas que la hacen única y digna de estudio como agente modelo de biocontrol. Entre éstas, es relevante su capacidad de formar biopelículas en las raíces de las plantas, estrategia que le puede conferir ventajas en la colonización, persistencia y un posible bloqueo de las heridas en las raíces, evitando o dificultando la infección por parte del patógeno.

Por ello, como segundo objetivo de esta tesis nos centramos en la búsqueda de genes implicados en la formación de biopelículas en el agente de biocontrol K84. Inicialmente se creó una librería de mutantes al azar de la cepa K84 que se evaluó en placas de polipropileno, y posteriormente los mutantes defectuosos fueron caracterizados, tanto fenotípica como

genéticamente. El resultado fue la identificación de dos mutantes afectados en la formación de biopelículas. El mutante *wcbD* no fue capaz de adherirse al polipropileno, pero sin embargo formó biopelículas sobre la superficie de ápices radiculares de tomate. Este dato sugiere que los mecanismos implicados en la adhesión a estos dos tipos de superficies inertes y vivas, respectivamente, no son necesariamente los mismos, como se ha observado también en otras especies bacterianas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2007). El gen *wcbD* de la cepa K84 está situado en un locus con varios genes relacionados con la síntesis y el transporte de polisacáridos capsulares (CPS). Este locus (CPS) del genoma de la cepa K84 no se encuentra en los genomas de otras especies próximas de la familia *Rhizobiaceae* (16 genomas secuenciados), por lo que podría tratarse de una posible región variable o isla genómica adquirida por procesos de transferencia horizontal de genes. Sería interesante conocer si realmente se trata de una característica de las cepas de la especie *A. rhizogenes* (biovar 2) o es un accidente ocurrido únicamente en la cepa K84.

La adhesión es una etapa inicial y necesaria para la formación de biopelículas, y se sabe que las bacterias interaccionan con los tejidos vegetales mediante adhesinas, que incluyen polisacáridos y proteínas de superficie, estando mediado el contacto inicial por una activa movilidad (Danhorn y Fuqua, 2007). Los componentes de la superficie bacteriana son, por tanto, cruciales para la formación de biopelículas en todas las especies bacterianas estudiadas. Además, concretamente en las rizobiáceas se ha descrito la importancia tanto de los polisacáridos de superficie (que incluyen exopolisacáridos, lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares) como de los glucanos cíclicos (que están en el periplasma bacteriano) en su interacción con la planta (Schulman y Kennedy, 1979; Matthyse, 1983;

Bohin, 2000; Ormeño-Orillo, 2005; De Castro *et al.*, 2007; Tomlinson *et al.*, 2010).

Por otro lado, el mutante *rkpK* presentó un fenotipo hiperproductor de biopelícula tanto en superficies inertes como vivas. El gen *rkpK* se sitúa en el locus *rkp-2*, relacionado con la síntesis de lipopolisacáridos (LPS) y de polisacáridos capsulares (KPS) descritos en *Rhizobium* (Kereszt *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2003). En este trabajo, se ha observado que el mutante *rkpK* muestra una clara alteración en su LPS respecto a la cepa K84 y, además, presenta un comportamiento anormal en la interacción célula-célula, ya que, en cultivo líquido, las células parecen adherirse unas a otras y precipitar formando agregados, a diferencia de la cepa salvaje, que mayoritariamente se encuentra en forma planctónica. Por tanto, una alteración del LPS implica una alteración en la formación de biopelículas. Los análisis bioquímicos realizados muestran que la cepa K84 no produce el polisacárido capsular KPS típico de *Rhizobium*. Este hecho está en concordancia con los análisis genéticos, que muestran que el genotipo de K84 no posee dos *loci* requeridos para la síntesis de cápsula en *Rhizobium* (De Castro *et al.*, 2007). Sin embargo, no descartamos la existencia de otro tipo de polisacárido capsular, que, a pesar de los intentos realizados no hemos podido poner en evidencia mediante tinción microscópica ni extracción química, siendo una posible alternativa utilizar microscopía de transmisión (TEM) y/o anticuerpos u otros estabilizadores de cápsula.

Como parte de un tercer objetivo se evaluó una selección de tres mutantes de movilidad en superficie en cuanto a su capacidad de formar biopelículas *in vitro* y aspectos relacionados. Se sabe que la movilidad está también implicada en la formación de biopelículas en muchos

microorganismos (Danhorn y Fuqua, 2007), y se ha descrito que los mutantes en movilidad tienden a ser menos competitivos que las cepas móviles (Turnbull *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2006). Los mutantes *ndvB* y *feuP*, implicados en la síntesis y regulación de los polisacáridos periplásmicos  $\beta$ -(1,2) glucanos cíclicos (GC), fueron capaces de adherirse al polipropileno, aunque su capacidad de formar biopelícula en esta superficie se vió disminuida respecto de la cepa silvestre. Los glucanos cíclicos tienen una función importante en el equilibrio osmótico de las células bacterianas, y su síntesis está regulada por el sistema de dos componentes FeuP-FeuQ que responde al estrés osmótico (Lequette *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2008; Carlyon *et al.*, 2010). Por tanto, es probable que en el suelo y en la rizosfera se produzca un estrés hipoosmótico y que, gracias a los GC producidos, la cepa K84 sea capaz de enfrentarse a este estrés pudiendo sobrevivir y colonizar las raíces. Los estudios realizados con mutantes similares en la especie próxima *R. meliloti* muestran que la deficiencia en la síntesis de GC conlleva una menor efectividad en la simbiosis y en la interacción con el huésped (Griffitts *et al.*, 2008). También se ha visto que mutantes de *A. tumefaciens* C58 no productores de GC son menos efectivos en la colonización de raíces de tomate *in vitro* (Matthysse *et al.*, 2005). Por tanto, será de gran interés conocer en un futuro próximo el comportamiento de estos dos mutantes de K84 respecto a su capacidad de colonizar la rizosfera y su eficacia como agente de biocontrol.

Otro tercer mutante deficiente en movilidad en superficie que se estudió fue el mutante *ctpA*. El gen *ctpA* codifica una proteasa carboxilo-terminal que se ha relacionado con la tolerancia a la desecación en *R. leguminosarum* (Gilbert *et al.*, 2007). El mutante *ctpA* muestra un fenotipo gravemente afectado en movilidad en superficie, movilidad tipo

“swimming”, capacidad de formar biopelículas *in vitro*, y contenido en EPS respecto de la cepa silvestre K84, estando pendiente la evaluación de su capacidad para colonizar las raíces y formar biopelículas *in vivo*. Los EPS bacterianos tienen un papel importante en la movilidad, ya que actúan como surfactantes y protegen a la célula de la desecación (Becker y Pühler, 1998; Tomlinson *et al.*, 2010). Además, son de vital importancia en la formación de biopelículas, ya que forman parte de la matriz en la cual se encuentran inmersas las células bacterianas (Danhorn y Fuqua, 2007; Tomlinson *et al.*, 2010). Al complementar genéticamente el mutante *ctpA* observamos una restauración de los fenotipos estudiados. Este hecho evidencia el importante papel de la proteasa periplásmica CtpA en estas capacidades tan importantes para un agente de biocontrol como la cepa K84.

Utilizando como modelo *A. tumefaciens* C58, ya que se trata de la especie y cepa bacteriana más estudiada genéticamente en cuanto a la formación de biopelícula del género *Agrobacterium*, se ha realizado la comparación de los genes relacionados con la formación de biopelículas en dicha bacteria y sus posibles homólogos en el genoma de la cepa K84 (Tabla 1).

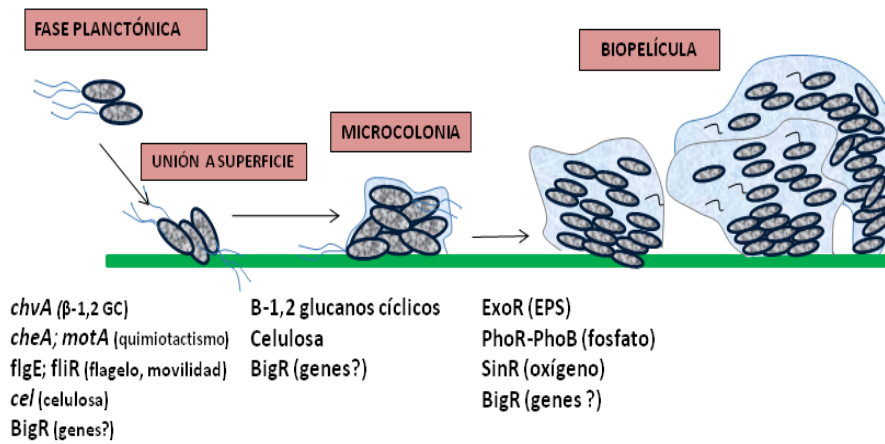


**Tabla 1.** Genes y proteínas relacionados con la capacidad de formación de biopelículas en *Agrobacterium tumefaciens* C58 descritos en la bibliografía y sus posibles homólogos en el genoma de *Agrobacterium rhizogenes* K84.

<i>A. tumefaciens</i> C58			<i>A. rhizogenes</i> K84		
Gen/Proteína	Anotación	Función	Gen	Anotación	%Identidad (aa)
<i>chvA (ndvA)</i>	Atu2728	Síntesis $\beta$ -1,2-glucano	<i>chvA (ndvA)</i>	Arad4720	68%
<i>chvB (ndvB)</i>	Atu2730	Síntesis $\beta$ -1,2-glucano	<i>chvB (ndvB)</i>	Arad4726	71%
CheA	Atu0517	Proteína quimiotaxis	CheA	Arad0850	71%
<i>motA</i>	Atu0560	Motor flagelar	<i>motA</i>	Arad0871	80%
<i>flgE</i>	Atu0574	Síntesis flagelo	<i>flgEf</i>	Arad0910	47%
<i>fliR</i>	Atu0582	Síntesis flagelo	<i>fliR</i>	Arad0920	58%
<i>celA</i>	Atu3309	Síntesis celulosa	<i>celA</i>	Arad9974	69%
<i>exoR</i>	Atu1715	Regulador negativo producción EPS	<i>exoR2</i>	Arad2114	78%
PhoR-PhoB	Atu0419- Atu0425	Sistema de dos componentes sensor de Pi	PhoR-PhoB	Arad0764- Arad0772	75-94%
SinR	Atu2384	Regulador transcripcional, homólogo FNR	SinR	Arad3443	85%
BigR	Atu3666	Regulador transcripcional	<i>noIRch</i>	Arad8112	53%

En cuanto a los genes caracterizados relacionados con la formación de biopelículas en *A. tumefaciens* C58, se encuentran el gen *cheA* (Merrit *et al.*, 2007), relacionado con procesos de quimiotactismo, que tiene su ortólogo en K84 (Tabla 1), y los genes *flgE*, *fliR* y *motA* (Merrit *et al.*, 2007; Armitage *et al.*, 1993), implicados en la síntesis y rotación del flagelo bacteriano, de los cuales también encontramos sus respectivos ortólogos (Tabla 1). Aunque en la búsqueda de genes de K84 implicados en la formación de biopelículas llevada a cabo en esta tesis no hemos puesto en evidencia

ninguno de estos genes, el análisis de tres mutantes afectados en movilidad en la cepa K84 ha puesto de manifiesto que la movilidad también es un requisito para la formación de biopelículas *in vitro* por parte de esta cepa. Entre los genes relacionados con la formación de biopelículas en la cepa C58, hay tres genes relacionados con síntesis de polisacáridos. Dos de ellos, *chvA* (*ndvA*)-*chvB* (*ndvB*), relacionados con la síntesis de GC (Douglas *et al.*, 1982). Estos genes los encontramos en la cepa K84 de *A. rhizogenes* (Tabla 1). El gen *cela*, implicado en la biosíntesis del exopolisacárido celulosa (Matthysse *et al.*, 2005), también tiene su ortólogo en K84. Además, en *A. tumefaciens* C58 se han identificado otros genes reguladores implicados en la formación de biopelículas, como *exoR*, que regula la síntesis de EPS (Tomlinson *et al.*, 2010), el sistema de dos componentes PhoR-PhoB que responde a los niveles de fosfato inorgánico (Danhorn *et al.*, 2004), o el regulador SinR, que es sensible a los niveles de oxígeno (Ramey *et al.*, 2004). Estos cuatro genes reguladores también se encuentran en el genoma de la cepa K84; por tanto, es muy probable que la capacidad de formar biopelículas en la cepa K84 se regule de modo similar y responda a estos mismos factores ambientales. Otro gen regulador descrito en *A. tumefaciens* C58 es BigR (Barbosa y Benedetti, 2007), un represor transcripcional, pero todavía se desconoce qué genes regula y la función específica que desempeña. En el genoma de K84 se encuentra un gen regulador anotado como *noIRch*, que presenta un 53% de identidad con BigR y que se puede tratar del mismo gen (Tabla 1). Según toda la información disponible (Tabla 1), en la Figura 1 se muestra un diagrama con el posible papel de estos genes y proteínas en las distintas etapas de la formación de biopelículas en la cepa C58.



**Figura 1.** Papel de los distintos genes y proteínas implicados en las distintas fases de formación de biopelícula en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58.

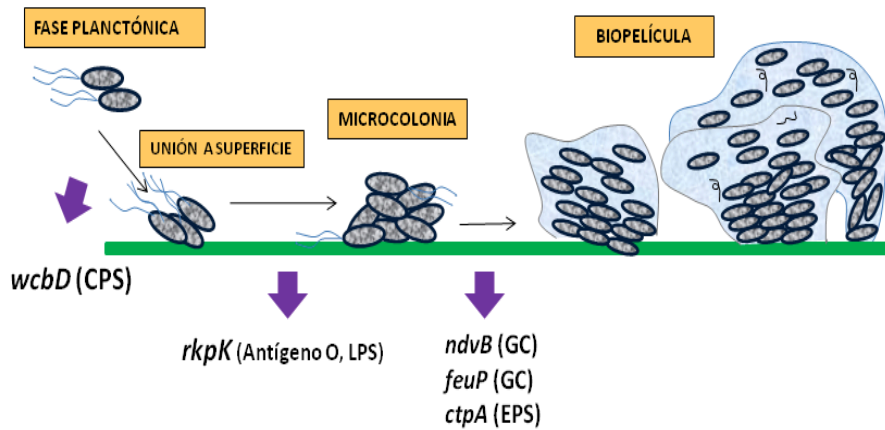
A partir de la información recopilada en esta tesis, proponemos un pequeño modelo inicial de formación de biopelícula en el agente de biocontrol K84, que incluye los genes identificados y caracterizados en este trabajo (Tabla 2), asociándolos, a su vez, con posibles etapas concretas del proceso de formación de la biopelícula (Figura 2).

**Tabla 2.** Genes relacionados con la capacidad de formar biopelículas en el agente de biocontrol K84 de *Agrobacterium rhizogenes*. Genes descritos y caracterizados en este estudio.

<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K84		
Nombre del gen	Anotación genoma	Función asignada
<i>wcbD</i>	Arad4196	Proteína exportadora polisacárido capsular
<i>rkpK</i>	Arad3519	UDP-glucosa-6-deshidrogenasa
<i>ndvB (chvB)</i>	Arad4726	Sintetasa $\beta$ -1,2-glucano cíclico
<i>feuP</i>	Arad1490	Proteína de respuesta sistema de dos componentes. Regulación $\beta$ -1,2-glucano cíclico
<i>ctpA</i>	Arad4892	Proteasa carboxilo-terminal

El gen *wcbD*, implicado en la síntesis y el transporte de polisacáridos capsulares, está relacionado con la adhesión de la célula a la superficie a colonizar, por tanto, con las primeras etapas de formación de biopelículas (Tabla2; Figura 2). El gen *rkpK*, implicado en la síntesis del antígeno O del LPS, parece afectar a la interacción célula-célula. Los genes *ndvB*, *feuP* y *ctpA* están implicados en la síntesis y el transporte de GC periplásmicos y de EPS, sin que parezca influir en la capacidad de adhesión, ya que los mutantes en estos genes son capaces de unirse y formar biopelícula; por tanto, su importancia podría radicar en las fases de maduración de la

biopelícula, donde se requiere la matriz extracelular (Tabla 2; Figura 2).



**Figura 2.** Modelo de la formación de biopelículas en el agente de biocontrol K84 de *Agrobacterium rhizogenes*.

En trabajos futuros sería interesante evaluar estos mutantes en otros aspectos como, por ejemplo, su capacidad de colonizar raíces y su capacidad de biocontrol en planta. Por otra parte, no se ha obtenido aún lo que podríamos denominar el “mutante ideal” para evaluar la importancia de la formación de biopelículas en este agente de biocontrol, que sería aquel mutante nulo incapaz de formar biopelícula tanto en superficies bióticas como abióticas. Seguramente, no lo hemos hallado debido a que aún no hemos saturado el genoma y sólo se han obtenido 5 mutantes hasta la fecha.

En definitiva, los resultados recogidos en esta memoria aportan nuevos datos sobre la capacidad de formar biopelículas en especies no estudiadas

anteriormente, como son *A. rhizogenes* y *A. vitis*. Así, se ha demostrado esta capacidad en ambas especies observándose que las tres especies de *Agrobacterium* analizadas no se comportan de la misma manera en la adhesión a determinadas superficies y la agregación célula a célula. Además, se han obtenido mutantes de la cepa K84 de *A. rhizogenes* que, analizados genotípicamente, han permitido identificar genes concretos que afectan a fenotipos implicados en el proceso de formación de biopelícula, como la movilidad en superficie y la movilidad tipo "swimming". Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la relevancia de ciertos componentes de la envoltura celular bacteriana, como son los lipopolisacáridos (LPS), glucanos cíclicos (GC), polisacáridos capsulares (CPS) y exopolisacáridos (EPS), en la capacidad de *Agrobacterium* spp. para formar biopelículas.

Los resultados de toda esta tesis son especialmente relevantes en cuanto que contribuyen a un mejor conocimiento del agente de biocontrol K84, y aunque el papel de cada gen identificado debería ser confirmado en ensayos de colonización *in vivo* y de biocontrol, las aportaciones de este trabajo abren nuevas vías de investigación sobre los complejos mecanismos de actuación empleados por los agentes bacterianos de control biológico para colonizar el huésped y controlar las enfermedades.

## Conclusiones

1. La formación de biopelículas sobre sustratos inertes en cepas patógenas y no patógenas de *Agrobacterium* spp. depende de la especie (biovar), la superficie a colonizar y las condiciones de cultivo.
2. Las biopelículas pueden constituir un mecanismo eficaz de colonización del huésped, dado que *Agrobacterium* spp. forma estructuras complejas, compuestas por numerosas células adheridas unas a otras y/o a la superficie radicular.
3. Una posible cápsula en el agente de control biológico *A. rhizogenes* K84 actúa como un factor de adhesión en interacciones célula-superficie.
4. El antígeno O del lipopolisacárido de la cepa K84 se requiere para una interacción célula-célula correcta, y, en consecuencia, para la formación normal de las biopelículas.
5. El polisacárido  $\beta$ -1-2-glucano cíclico en la cepa K84 es necesario para una óptima viabilidad en condiciones de baja osmolaridad, una correcta movilidad y para la formación de biopelículas.
6. La proteasa periplásmica CtpA controla la movilidad y formación de biopelículas en el agente de biocontrol K84 a través de la correcta producción de exopolisacáridos.

## **Bibliografía general**



**Abarca-Grau, A. M., Marco-Noales, E., Gámez, M. A., López, M. M. and Penyalver, R.** 2006. Biofilm production by *Agrobacterium* species on inert and plant surfaces. Page 111-112 in: Proc. 11<sup>th</sup> Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria (ICPPB). Edinburgh, Scotland, U.K.

**Abarca-Grau, A.M., Burbank, L.P., de Paz, H.D., Crespo-Rivas, J.C., Marco-Noales, E., López, M.M., Vinardell, J.M., von Bodman, S. B. and Penyalver, R.** 2011a. Role for *Agrobacterium rhizogenes* K84 cell envelope polysaccharides in surface interactions. J Bacteriol. (enviado 9 Junio 2011; JB05399-11).

**Abarca-Grau, A. M., Penyalver, R., López, M. M. and E. Marco-Noales.** 2011b. Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as well as on root surfaces. Plant Pathol. **60**:416-425.

**Abe, M., Amemura, A. and Higashi, S.** 1982. Studies on cyclic beta-(1,2)-glucan obtained from periplasmic space of *Rhizobium trifolii* cells. Plant soil. **64**:315-324.

**Albereda, M., Dardanelli, M. S., Souse, C., Megias, M., Temprano, F., et al.** 2006. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. FEMS Microbiol Lett. **259**:67-73.

**Albiach, M. R. and López, M. M. 1992.** Plasmid heterogeneity in Spanish isolates of *Agrobacterium tumefaciens* from thirteen different hosts. Appl Environ Microbiol **58**:2683-2687.

**Ambros, P. F., Matzke, A. J. M. and Matzke, M. A.** 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by in situ hybridization. EMBO J. **5**:2073.

**An, D., Danhorn, T., Fuqua, C. and Parsek, M. R.** 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **103**:3828-3833.

**Anderson, A. R. and Moore, L. W.** 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. Phytopathology. **69**:320-323.

**Ankenbauer, R. G. and Nester, E. W.** 1990. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. J Bacteriol. **172**:6442-6446.

**Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S. Biones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., et al.** 2005. Cyclic beta- 1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. Nat Immunol. **6**:618-625.

**Armitage, J. P. and Schmitt, R.** 1997. Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti*-variations of a theme? Microbiology. **143**: 3671-3682.

**Ashby, A. M., Watson, M. D. and Shaw, C. H.** 1987. A Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis towards the plant wound product aceto-syringone. FEMS Microbiology Letters. **41**:189.

**Ausmees, N., Jacobsson, K. & Lindberg, M.** 2001. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Microbiology. **147**:549–559.

**Bais, H. P., Fall, R. and Vivanco J. M.** 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology. **134**:307-319.

**Baldani, J. I., Weaver, R. W., Hynes, M. F., Eardly, B. D.** 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover *Rhizobia*. *Appl Environ Microbiol.* **58**:2308-2314.

**Ballas, N. and Citovsky, V.** 1997. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:10723-28.

**Bandara, A. B., Sriranganathan, N., Schurig, G. G. and Boyle, S. M.** 2005. Carboxyl-terminal protease regulates *Brucella suis* morphology in culture and persistence in macrophages and mice. *J Bacteriol.* **187**:5767–5775.

**Barahona, E., Navazo, A., Yousef-Coronado, F., Aguirre de Cárcer, D., Martínez-Granero, F., Espinosa-Urgel, M., Martín, M. and Rivilla, R.** 2010. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ. Microbiol.* **12**:3185-3195.

**Barbosa, RL, Benedetti, CE.** 2007. BigR, a transcriptional repressor from plant-associated bacteria, regulates an operon implicated in biofilm growth. *Journal of Bacteriology.* **189**: 6185-6194.

**Bardin, S., Dan, S., Osteras, M., Finan, T. M.** 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* **178**:4540-7.

**Bardin, S. D. and Finan, T. M.** 1998. Phosphate assimilation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics:* **148**:1689-1700.

**Bazzi, C.** 1983. Biological control of crown gall in Italy. International Workshop on crown gall. Wädenswill. Switzerland. 1-15.

**Becker, A. and Pühler, A.** 1998. Production of exopolysaccharides. The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaint, A. Kondoros and P. J. J. Hooykaas, (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 97-118.

**Bell, CR. and Ramey, WD.** 1991. Hybrid biovars of *Agrobacterium* species isolated from conifer roots. Can J Microbiol. **37**:34-41.

**Berg, H. C .** 2003. The rotary motor of bacterial flagella. Annu Rev Biochem. **72**:19-54.

**Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol **84**:188-98.

**Beveridge, T.J. and Graham, L.L.** 1991. Surface layers of bacteria. Microbiol. Reviews **55**:684-705.

**Binns, A. N. and Thomashow, M. F.** 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Annu. Rev. Microbiol. **42**:575-606.

**Bloemberg, G. V., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Stuurman, N., Lugtenverg, B. J. J.** 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. Mol Plant Microbe Interact. **13**:1170-1176.

**Bohin, J. P.** 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proeobacteria. FEMS Microbiol Lett. **186**:11-19.

**Bouzar, H., Jones, J. B., Hodge, N. C.** 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology*. **83**:733-739.

**Bouzar, H.** 1994. Letter to the editor: Request for a judicial opinion concerning the type species of *Agrobacterium*. *Int. Syst. Bacteriol.* **44**:373-374.

**Bouzar, H., Chilton, W. S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J.B., Hodge, N.C.** 1995. A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Appl Environ Microbiol.* **61**:65-73.

**Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A. and Khemici, E.** 1991. Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie*.**11**: 901-908.

**Bouzar, H. and Jones, J.B.** 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int J Syst Evol Microbio.* **51**:1023-6

**Bradbury, J. F.** 1986. Guide to plantpathogenic bacteria. Pp. 332. CAB International Mycological Institute.

**Branda, S. S, Vik, S., Friedman, L., Kolter, R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**:20-26.

**Breedveld, M.W., Miller, K.J.** 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiological Reviews* **58**: 145-161.

**Breedveld, M.W., Miller, K.J.** 1998. Cell-surface\_ -glucans. In *Rhizobiaceae*. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, eds, pp 81–96. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Boston, London.

**Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L.P. T. M. and Zehnder, A. J. B.** 1990. Osmotically-induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. J Gen Microbiol. **136**:2511-2519.

**Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P.T. M. and Zehnder, A. J.B.** 1991. Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic beta-(1,2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1. Arch Microbiol. **156**:501-506.

**Breedveld, M. W. and Miller, K. J.** 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. Microbiological Reviews. **58**:145-161.

**Briones, A. M., Okabe, S., Umeniya, Y., Ramsing, N.-B., Reichardt, W. and Okuyana, H.** 2002. Influence of different cultivars on populations of an ammonium-oxidizing bacteria in the root environment of rice. App Environ Microbiol. **68**:3067-3075.

**Brisset, M. N., Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T. J., Collmer, A.** 1991. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea. Applied and Environmental Microbiology. **5**:3178-3182.

**Brom, S., Gracia de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Davila, G., Romero, D., Palacios, R.** 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. J Bacteriol. **174**:5183-5189.

**Buchholz, W. G. and Thomashow, M. F.** 1984. Comparison of T-DNA oncogene coplasmids of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmids with limited and wide host ranges. J Bacteriol. **175**:5477-5487.

**Buendía-Clavería, A .M., Ollero, F. J. Yang, S. S and Gil-Serrano, A. M.** 2001. Determination of the chemical structure of the capsular polysaccharide of strain B33, a fast-growing soya bean-nodulating bacterium isolated from an arid región of China Biochem J. **357**:505-511.

**Buendía-Clavería, A. M., Moussaid, A., Ollero, F. J. et al.** 2003. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology*. **149**:1807-1818.

**Burr, T. J., Bishop, A. L., Katz, B. H., Blanchard, L. M. and Bazzi, C.** 1998. A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. *Phytopathology*. **77**:1424-1427.

**Burr, T. J.** 1999. Compendium of Stone Fruit Disease. The American Phytopathological Society. P. 52-53.

**Caetano-Anolles, G. and Bassam, B. J.** 1993. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **42**: 189–200.

**Caiazza, N. C. and O'Tolle, G. A.** 2004. Sad B is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol.* **186**:4476-4485.

**Caiazza, N.C., Merrit, J. H., Brothers, K. M. and. O'Toole, G. A.** 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomona aeruginosa* PA14. *J Bacteriol.* **189**:3603-3612.

**Campbell, G.R.O., Sharypova, L.A., Scheidle, H., Jones, K.M., Niehaus, K., Becker, A., Walker, G.C.** 2003. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J.Bacteriol.* **185**:3853–62.

**Cangelosi, G.A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A., Leigh, J.A. & Nester, E.W.** 1987. Common *loci* for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides synthesis and their roles in plant interactions. *J Bacteriol.* **169**: 2086-2091.

**Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J. A., Chang Lee, C., Theines, C. and Nester, E. W.** 1989. Role for *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of  $\beta$ -1,2-glucan. *J Bacteriol.* **171**:1609-1615.

**Cangelosi, G. A., Best, E. A., Martinetti, G., Nester, E. W.** 1992. Methods for genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods in Enzymology.* **204**:384-397.

**Carmichael, I. Harper, I. S., Coventry, M. J., Taylor, P. W. J. and Hickey, W. J.** 1999. Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. *J Appl Microbiol. Symposium Suppl.* **85**:45S-51S

**Carlyon, R. E., Ryther, J. L., Van Yperen, R. D. and Griffiths, J. S.** 2010. FeuN, a novel modulator of two-component signaling identified in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol.* **77**:170-182.

**Castro, O. A., Zorreguieta, A., Ielmini, V., Vega, G. and Ielpi, L.** 1996. Cyclic beta-(1,2)-glucan synthesis in *Rhizobiaceae*: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *J Bacteriol.* **178**: 6043–6048.

**Characklis, W. G. And Marsha, K. C.** 1990. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. *Biofilms eds., Wiley and Sons, New York* 3-15.

**Chen, S.Y. and Xiang, G. W.N.** 1986. A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strains of *A. tumefaciens* from grapevine. *Acta Microbiologica Sinica.* **26**:193-199.

**Cheng, H. P. and Walker, G. C.** 1998a Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol.* **180**:20-26.

**Cheng, H. P., Walker, G. C.** 1998b. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology.* **180**:5183-5191.



**Chesnokova, O., Coutinho, J. B., Khan, I. H., Mikhail, M. S. and Kado C.I.** 1997. Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a band strain on virulence. *Mol Microbiol.* **23**:579-590.

**Chilton, M. D., Currier, T. C, Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA.* **71**:3672-3676.

**Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell.* **11**: 263-267.

**Chilton, M. D., Saiki, R. K. et al.** 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumour cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* **77**:4060-4064.

**Chin-A-Woeng, T., de Priester, W. van der Bij, A. and Lugtenberg, B.J.J.** 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:79-86.

**Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F.** 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp Rev Food Sci and Food Saf.* **2**:22-32.

**Christie, P. J.** 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J.Bacteriol.* **179**:3085-94.

**Chyi, Y. S., Jorgensen, R. A., Goldstein, D., Tanksley, S. D. and Loiza-Figueroa, F.** 1986. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Molecular and General Genetics.* **204**:64-69.

**Ciocchini, A. E., Guidolin, L. S., Casabuono, A. C., Couto, A. S., de Iannino, N. I. and Ugalde, R. A.** 2007. A glycosyltransferase with a length-controlling activity as a mechanism to regulate the size of polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**: 16492–16497.

**Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D., Zambryski, P.** 1992. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. *Science*. **256**:1802-1805.

**Citovsky, V., Guralnick, B., Simon M. N. and Wall, J. S.** 1997. The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single stranded DNA complexes involved in nuclear import. *J Mol Biology*. **271**(5):718-27.

**Clare, B. G., Kerr, A. and Jones, D. A.** 1990. Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease. *Plasmid*. **23**:126-137.

**Clare, B. G.** 1993. *Agrobacterium*: Biological plant disease control. in advanced engineered pesticides: 129-146. Ed. L. Kim. M.Dekker.Inc. New York.

**Conn, H. J.** 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bacteriol*. **44**:353-360.

**Cooksey, D. A. and Moore, L. W.** 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology*. **72**:919-921.

**Costerton, J. W.** 1995. Overview of microbial biofilm. *J Indus Microbiol*. **15**:137-140.

**Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. **41**:435-464.

**Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Cladwell, D. E., Korber, D. R., Lappinscott, H. M.** 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* **49**:711-45.

**Crespo-Rivas, J.C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendia-Claveria, A.M., Ollero, F.J., Lopez-Baena, F.J., Murdoch, P.D., Rodriguez-Carvajal, M.A., Soria-Diaz, M.E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D.P., Mosely, J.A., Thomas-Oates, J.E., van Brussel, A.A.N., Gil-Serrano, A., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E.** 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 cgs mutants are unable to nodulate determinate and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 575-588.

**Cubero, J.** 1998. Detección y movimiento de *Agrobacterium tumefaciens* en distintas especies vegetales. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

**Currier, T. C. and Nester, E. W.** 1976. Evidence for diverse types of large plasmids in tumor inducing strains of *Agrobacterium*. *J Bacteriol.* **126**:157-165.

**D'Antuono, A.L., Casabuono A., Couto, A., Ugalde, R.A., Lepek, V.C.** 2005. Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**:446-457.

**Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* **182** (12): 3593-6.

**Danhorn, T. and Fuqua, C.** 2007. Biofilm formation by plant associated bacteria. *Annual Review in Microbiology.* **61**: 401-422.

**Danhorn ,T., Hentzer, M., Givskow, M., Parsek, M., Fuqua, C.** 2004. Phosphorous limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* throughy the PhoR-PhoB regulatory system. Journal of Bacteriology. **189**:4492-501.

**Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. and Kolter, R.** 2000. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell to cell interactions withing Echeriachia coli biofilms. Mol Microbiol. **37**:424-432.

**Darvill, A. and Albersheim, P.** 1984. Phytoalexins and their elicitors a defense against microbial infection in plants. Annu Rev Plant Physiol. **35**:243-275.

**Das, A.** 1988. *Agrobacterium tumefaciens vir E* operon encodes a single standed DNA binding protein. Proc Natl Acad Sci USA. **85**:2909-2913.

**Davey, M.E. and O'Toole, G. A.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Rev. **64**: 847-67.

**Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. and. Greenberg, E. P.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science .**280**:295-298.

**Deasey, M. C. and Matthyse, A. G.** 1984. Interactions of wild-type and cellulose-minus mutant of *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco mesophyll and tobacco tissue culture cells. Pytopathology. **74**:991.

**De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z.** 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transfer. Biotechnol Bioeng. **43**:1131-38.

**De Castro, C., De Castro, O, Molinaro, A and Parrilli M.** 2002. Structural determination of the O-chain polysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens*, strain DSM 30205. Eur J Biochem. **269**:2885-8.

**De Castro, C., Bedini, E., Nunziata, R., Rinaldi, Mangoni, L. and Parrilli, M.** 2003. Elucidation of the O-chain structure from the lipopolysaccharide of *Agrobacterium tumefaciens*, strain C58. Carbohydr Res. **338**:1891-4.

**De Castro, C., Carannante, A., Lanzetta, R., Nunziata, R., Piscopo, V. and Parrilli, M.** 2004. Elucidation of Two O-chain structures from the lipopolysaccharide fraction of *Agrobacterium tumefaciens* F/1. Carbohydr Res. **339**:1891-4.

**De Castro, C., Gargiulo, V., Lanzetta, R. and Parrilli, M.** 2007. *Agrobacterium rubi* DSM6772 Produces a lipophilic polysaccharide capsular whose degree of acetylation is growth modulated. Biomacromolecules: **8**:1047-1051.

**DeCleene, M. and DeLey, J.** 1976. The host range of crown gall. Botanical Gazette. **42**:389-466.

**Deng, W., Chen, L., Wood, D. W., Metcalfe, T., Liang, Gordon, M.P., Comai, L., Nester, E. W.** 1998. *Agrobacterium* Vir D2 protein interact with plant host cyclophilins. Proc Natl Acad Sci USA. **9**:7040-45.

**Denny, T. P.** 1999. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria. Eur J Plant pathol. **105**:417-430.

**Depicker, A., Schell, J., Van Montagu, M.** 1977. Comparative study of Ti-plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* by use of restriction enzymes. Biochem Soc Trans. **5**:931-2.

**Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K., Murphy, P.** 1998. Opines and opine-like molecules in plant-*Rhizobiaceae* interactions. En: The *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant-associated bacteria. Cap. 9.173-198. Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. eds. Kluwer Academic Publishers.

**Donner, S. C., Jones, D. A., McCure, N. C., Rosewarne, G. M., Tate, M.E., Kerr, A., Fajardo, N. N. and Clare, B. G.** 1993. Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **42**:185-194.

**Douglas, C., Halperin, W. and Nester, E. W.** 1982. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachments to plant cells. *J Bacteriol*. **152**:1265-1275.

**Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. and Nester, E. W.** 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol*. **161**:850-860.

**Durrenberger, F., Cramer, A., Hohn, B. and Koukolikova-Nicola, Z.** 1989. Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **86**:9154-9158.

**Dylan, T., Ielpi, L., Stanfiels, S., Kashyap, L., Douglas, C, Yanofsky, M. Nester, E., Helinski, D. R. and Ditta, G.** 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**:4403-4407.

**Dylan, T., Helinski, D. R. and Ditta, G. S.** 1990. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta- (1,2)-glucan. *J Bacteriol*. **172**:1400-1408.

**Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D.R. Ditta, G.S.** 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium ndv* mutants. *Journal of Bacteriology* **172**: 1409-1417.

**Ellis, J. G., Kerr, A., Van Montagu, M. and Schell, J.** 1979. *Agrobacterium* genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiological Plant Pathology*. **15**:311-319.

**Ellis, J.G. and Murphy.** 1981. Four new opines from crown gall tumours: their deletion and properties. *Molecular and General Genetics*. **181**:36-43.

**Ellis, J. G., Kerr, A., Petit, A. and Tempé, J.** 1982a. Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids the role of agrocinopines. *Mol and General Genetics*. **186**:269-74.

**Ellis, J. G., Murphy, P. J. and Kerr, A.** 1982b. Isolation and properties of transfer regulatory mutants of the nopaline Ti-plasmid pTiC58. *Mol and General Genomics*. **186**:275-281.

**Engler, G., Holsters, M., Van Montagu, M., Schell, J., Hernalsteens, J. P., Schilperoort, R.** 1975. A plasmid determined property in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics*. **138**:345-349.

**Engler, G., Depicker, A., Maenhaut, R., Villarroel, R., Van Montagu, M., Schell, J.** 1981. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol*. **152**:183-208.

**Escobar, M. A., Civerolo, E. L. Summerfelt, K. R. and Dandekar. A. M.** 2001. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenensis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **98**:13437-13442.

**Escobar, M. A., Leslie, C. A., McGranahan, G. H. and Dandekar, A. M.** 2002. Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci*. **163**:591-597.

**Espinosa-Urgel, M., Salido, A. and Ramos, J.L.** 2000. Genetic análisis of functions involved in adhesión of *Pseudomonas putida* to sedes. J. Bacteriol. **182**:2363-2369.

**Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., Ramos, J. L.** 2002. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. Microbiology. **148**:341-243.

**Faivre-Amiot, A.** 1982. Le galle du collet. Phytoma. **6**: 45-47.

**Faivre-Amiot, A.** 1984. Les tumeurs à *Agrobacterium*. Phytoma. **8**:27-31.

**Farrand, S. K., and Wang, C.** 1992. Do we really understand crown gall control by *Agrobacterium radiobacter* strain K84? Pages 287-293 in: Biological Control and Plant Diseses. E. S. Tjamos and G. G. Papavizas eds. Plenum Press, New York.

**Farrand, S. K., Slota, J. E. Shim, J. S. and Kerr, A.** 1985. Tn5 insertion in the agrocin 84 plasmid: the conjugal nature of pAgK84 and the location of determinats for transfer and agrocin 84 production. Plasmid. **13**:106-117.

**Farrand, S. K., Van Berkum, P. B. and Oger, P.** 2003 *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**:1681-1687.

**Finan, T. M., Kunkel, B., Vos, G. D., Signer, E. R.** 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J Bacteriol *167*: 66-72.

**Finan, T. M., Oresnik, I., Bottacin, A.** 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. J Bacteriol. **170**:3396-403.

**Flemming, H.-C., Neu, T. R., and D. J. Wozniak.** 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. J. Bacteriol. **189**:7945-7947.



**Forsberg, L. S. and Carlson, R. W.** 1998. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strain CE358 and CE359: the complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **273**:2747-2758.

**Fraysse, N., Coudere, F. and Poisot, V.** 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem.* **270**:1365-1380.

**Frirdich, E. and Whitfield, C.** 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J Endotoxin Res.* **11**:133-144.

**Fuqua, C.** 2010. Passing the baton between laps: adhesion and cohesion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Mol Microbiol* **77**:533-536.

**Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L. and Hirsch, A. M.** 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol.* **56**:195-206.

**Gage, D. J.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**: 280-300.

**Ganderton, L., Chawla, J., Winters, C., Wimpenny, J. and Stickler, D.** 1992. Scanning electron-microscopy of bacterial biofilms on indwelling bladder catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **11**:789-796.

**Garret, C. M. E.** 1987. Problems of *Agrobacterium tumefaciens* in planting material and its control. *Bulletin OEPP/EPPO.* **17**:263-268.

**Garret, E. S., Perlegas, D. and Wozniak, C. J.** 1999. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J Bacteriol.* **181**:7401-7404.

**Geiger, O., Weissborn, A. C. and Kennedy, E. P.** 1991. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol.* **173**:3021-3024.

**Geiger, O., Rohrs, V., Wissenmayer, B., Finan, T. M. and Thomas-Oates, J. E.** 1999. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol.* **32**:63-73.

**Gelvin, S.B.** 1998. *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol.* **180**:4300-2.

**Gelvin, S. B.** 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* **51**:223-56.

**Genetello, C., Larebeke, N., Holsters, M., De Picker, A., Van Montagu, M. and Schell, J.** 1977. Ti plasmids of *Agrobacterium* as conjugative plasmids. *Nature.* **265**:561-562.

**Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. and Ugalde, R. A.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form  $\beta$ -(1,2)-glucan. *J Bacteriol.* **169**:80-884.

**Ghannoum, M., O'Toole, G. A.** 2004. *Microbial biofilms.* ASM Press, Washington, DC.

**Gheysen, G., Villarreal R. y Van Montagu, M.** 1991. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA MIGRATION. *Genes Dev.* **5**:287-297.

**Gibiansky, M. L., Conrad, J. C., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A., Stopka, W. G, Zelasko, D. C. Shrou, J. D, Wong, G. C. L.** 2010. Bacteria use Type IV pili to walk upright and detach from surfaces. *Science*. **330**:197.

**Gilbert, K. B., Vanderlinde, E. M. and Yost, C. K.** 2007. Mutagenesis of the carboxy terminal protease CtpA decreases desiccation tolerance in *Rhizobium leguminosarum*. *FEMS Microbiol Lett*. **272**:65-74.

**Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K, Gondon, J., Vandin, M., IartchoukLiu, F., Epp, A., Wollam, C., Allinger, M, Doughty, D., Scott, C., Lappas, C, Markelz, B., Fanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. and Slater, S.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. **294**:2323-2328.

**Goryachev, A. B., Toh, D., Boon Wee, K., Lee, T., Zhang, H., Zhang, L.** 2005. Transition to quorum sensing in an *Agrobacterium* population: a stochastic model. *PLoS Computational Biology*. **1**:e37.

**Griffits J. S., Carlyon, R. E., Erickson, J. H., Moulton, J. L., Barnett, M. J., Toman, C. J. and S. R. Long.** 2008. A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol. Microbiol*. **69**:479-490.

**Guralnick, B., Thomsen, G., Citovsky, V.** 1996. Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus oocytes* by a modified VirE2 protein of *Agrobacterium*. *Plant Cell*. **8**:363-373.

**Guyon, P., Chiton, M. D., Petit, A. and Tempé, J.** 1980. Agropine in “null type” crown gall tumors: evidence for generality of the opine concept. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **77**:2693-2697.

**Hara, H., Yamamoto, Y., Higashitani, A., Suzuki, H. and Nishimura, Y.** 1991. Cloning, mapping, and characterization of the *Escherichia coli prc* gene, which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3. *J Bacteriol.* **173**:4799–4813.

**Harrison, J. J., Turner, R. J. and Ceri, H.** 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cation in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* **7**:981-994.

**Harshey, R. M.** 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Ann. Rev. Microbiol.* **57**:249-273.

**Hawes, M. C., Smith, L. Y. and Howarth, A. J.** 1988. *Agrobacterium tumefaciens* mutants deficient in chemotaxis to root exudes. *Molecular Plant-Microbe interactions.* **1**:182-186.

**Hendson, M., Askjaer, L., Thomson, J. A. and Van Montagu, M.** 1983. Broad-host range agrocin of *Agrobacterium tumefaciens*. *App Environ Microbiol.* **45**:1526-1532.

**Hengge, R. and Bukau, B.** 2003. Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. *Mol Microbiol.* **49**:1451–1462.

**Herchale, T. C., Zhang, H. S., Ried, C. L., Carle, S. A., Zheng, D., Basaran, P., Thaker, M., Burr, A. T and Burr, T. J.** 2001. Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco. *Phytopathology.* **91**:966-972.

**Herman, L., Jacobs, A., Van Monagu, M. and Depicker, A.** 1990. Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Molecular and General Genetics.* **224**(2):248-256.

**Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M. Ramos, J. L. and O´Toole, G. A.** 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm

formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. Mol Microbiol. **49**:905-918.

**Hisamatsu, M.** 1992. Cyclic (1,2)- $\beta$ -D-glucans (cylosophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. Carbohydr Res. **231**:137-146.

**Hoekema, A., De Pater, B. S., Fellingner, A. J., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A.** 1984. The limited host range of an *Agrobacterium tumefaciens* strain extended by a cytokinin gene from a wide host range T-region. EMBO Journal. **3**:3043.

**Holmes, B. and Roberts, P.** 1981. The classification, identification and nomenclature of *Agrobacteria*. J Appl Bact. **50**:443-467.

**Hooykaas, P. J., Den Dulk-Ras, H. I., Ooms, G., Schilperoort, R. A.** 1980. Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. **143**:1295-1306.

**Hopwood, D.A.** 1978. Extrachromosomally determined antibiotic production. Ann Review of Microbiol. **32**:373-92.

**Howard, E., Zupan, J.R., Citovsky, V., Zambryski, P.C.** 1992. The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. Cell. **68**: 109-18.

**Huang, W. M., Cangelosi, G. A., Halperin, W., Nester, E. W.** 1990. A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. J Bacteriol. **172**:1814-1822.

**Hume, E. B. H., Baveja, J., Muir, B., Schubert, T.L., Kuman, N., Kjelleberg, S., Griesser, H. J., Thissen, H., Read, R., Poole-Warren, L. A.** 2004. The control of biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. Biomeaterial. **25**:5023-5030.

**Hynes, M. F., Brucksch, K and Priefer, U.** 1988. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. Arch Microbiol. **150**:326-332.

**Hynes, M. F. and McGregor, N. F.** 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol Microbiol. **4**:567-74.

**Hwang, H. H., Mysore, K. S. and Gelvin, S. B.** 2006. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein are less susceptible to *Agrobacterium* transformation. Molecular Plant Pathology. **7**:473-484.

**Ielpi, L., Dylan, T, Ditta, G. S., Helinski, D. R. and Stanfield, S. W.** 1990. The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes 319 kDa protein involved in the production of  $\beta$ -(1,2)-glucan. J Bio Chem. **265**:2843-2851.

**Iñón de Iannino, N. and Ugalde, R. A.** 1989. Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of  $\beta$ -(1,2) glucan. J Bacteriol. **171**:2842-2849.

**Jayaswall,R. K., Veluthambi, K., Gelvin, S. B. and Slighton, J. L.** 1987. Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Echerichia coli* by a *virD*-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. **169**:5035-5045.

**Jefferson, K.K.** 2009. Poly-N-acetyl-glucosamine as a mediator of bacterial biofilm formation. p. 175-188 In M. Ullrich (ed.), Bacterial polysaccharides. Caister Academic Press, Bremen, Germany.

**Jenal, U. and Malone, J.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. Ann Rev Genetics. **40**:385-407.

**Jin, S., Komari, T., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1987. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. . Bacteriol. **169**:4417-4425.

**Jin, S., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G. and Nester, E.W.** 1990a. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. J. Bacteriol **172**:494-4950.

**Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Gordon, M. P., Nester, E.W.** 1990b. The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation. J.Bacteriol. **172**:525-530.

**Jin, S. G., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., Nester, E. W.** 1990c. Phosphorylation of the VirG protein in *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. J Bacteriol. **172**:4945-50.

**Jones, D. A., Ryder, M. H., Clare, B. G., Farrand, S. K. and Kerr, A.** 1988. Construction of a *Tra* deletion mutant of pAgk84 to safeguard the biological control of crown gall. Molecular general Genetics. **212**:207-214.

**Jones, D. A. and Kerr, A.** 1989. *Agrobacterium radiobacter* K1026, a genetically engineered derivative of strain K84, for biological control of crown gall. Plant Disease. **73**:15-18.

**Jones, J. B. and Rajú, B. C.** 1988. Systemic movement of *A. tumefaciens* in symptomless stem tissue of *Chrysanthemum morifolium*. Plant disease . **72**:51-54.

**Joos, H., Inzé, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M. and Schell J.** 1983. Genetic analysis of T.DNA transcripts in nopaline crown gall. Cell. **32**:1057-1067.

**Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M. and Allardet-Servent, A.** 1998. Unconventional genomic organization in the Alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol.* **180**:2749-2755.



**Juretschko, S. K., Loy, A., Lehner, A. and Wagner, M.** 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol.* **25**: 84-99.

**Kado, C. I.** 1991. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **10**:1-32.

**Kahl, G.** 1982. Molecular biology of wound healing: the conditioning phenomenon. P 211-267. En G. Kahl y J.S. Schell (Ed.). *Molecular biology of plant tumors.* Academic Press Lid. Londres.

**Kalogeraki, V. S. and Winans, S. C.** 1998. Wound-released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid. *J Bacteriol.* **180**:5660-5667.

**Kalogeraki, V. S., Zhu, J., Stryker, J. L., Winans, S. C.** 2000. The right end of the *vir* region of an octopine-type Ti plasmid contains four new members of the *vir* regulon that are not essential for pathogenesis. *J Bacteriol.* **182**:1774-8.

**Kannenberg, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S. S. and R Carlson, R. W.** 1998. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis and functions. En: *The Rhizobiaceae.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

**Kao, J. C., Perry, K. L., Kado, C. I.** 1982. Indoleacetic acid complementation and its relation to host range specifying genes on the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet.* **188**:425-32.

**Karatan, E. and Watnick, P.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol and Molecular biology reviews.* **73**:310-346

**Karbarz, M. J., Kalb, S. R., Cotter, R. J. and Raetz, C. R. H.** 2003. Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. J Biol Chem. **278**:39269-39279.

**Keane, P.J., Kerr, A., New, P.B.** 1970. Crown gall of stone fruits. II Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. Australian J. Biol. Sci. **23**:585-595.

**Keevil, C. W. and Walker, J. T.** 1992. Nomarski DIC microscopy and image analysis of biofilm. Binary Comput. Microbiol. **4**: 93-95.

**Kereszt, A., Kiss, E., Reuhs, B.L., Carlson, R.W., Kondorosi, A. and Putnoky, P.** 1998. Novel rkp gene cluster of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the *rkpK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. J. Bacteriol. **180**:5426-5431.

**Kerr, A.** 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. Journal of Applied Bacteriology. **35**: 493-497.

**Kerr, A.** 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. Plant Disease. **64**:25-30.

**Kerr, A.** 1989. Commercial release of a genetically engineered bacterium for the control of crown gall. Agricultural Science. **2**:41.

**Kerr, A.** 1992. Biological control of crown gall: seed inoculation. J Appl Bacteriol. **35**:493-497.

**Kerr, A. and Htay.** 1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production. Physiological Plant Pathology. **4**:41.

**Kerr, A. and Panagopoulos, C. G.** 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathologische Zeitschrift*. **90**:172-179.

**Kerr, A. Manigault, P. Tempé, J.** 1977. Transfer of virulence in vivo and *in vitro* in *Agrobacterium* nature. **10;265(5594)**:560-1.

**Kerstens, K. & De Ley, J.** 1984. *Agrobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N. R., Ed.), pp. 244-54. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Kim, J. G., Park, B. K., Kim, S. U., Choi, D., Nahm, B. H., Moon, J. S., Reader, J., Farrand, S. K. and Hwang, I.** 2006. Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**:8846-88.

**Kjelleberg, S. and Givskov, M.** (ed). 2007. *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations*. Horizon Bioscience, Norfolk UK.

**Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*. **48**:1511-1524.

**Klee, H., Horsch, R. et al.** 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann Rev Plant Physiol*. 467-486.

**Knauf, V. C. and Nester, E. W.** 1982. Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plamid*. **8**:45-54.

**Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz, K. Z., Korber, H. et al.** 1989. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **86**:8467-8471.

**Korber, D.R., Lawrence, J.R., Lappin-Scott, H.M., and Costerton, J.W.** 1995. Growth of microorganisms on surfaces. p. 15-45 *In* Lappin-Scott and Costerton (eds.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. **166**:175-176.

**Kraigsley, A., Ronney, P. D, Findel, S. E.** 2002. Hydrodynamic influences biofilm formation and growth, en <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/biofilms4Web.html>

**Kroll, J. S., B. Loynds, L. N. Brophy, and E. R. Moxon.** 1990. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsular polysaccharide export. *Mol. Microbiol.* **4**:1853–1862.

**Kuchma, S. L. and O'Toole, G. A.** 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechn.* **11**:429-433.

**Lai, E. M. and Kado, C. I.** 1998. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous *pilus* of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* **180**:2711-2717.

**Lastra, B.** 1998. *Agrobacterium* spp. en cultivares de vid de Galicia: distribución, caracterización de cepas bacterianas y sensibilidad de cultivares portainjertos. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W. and Kijne, J. W.** 2006. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol.* **59**: 1704–1713.

**Lawrence, J. R., Korba, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. And Caldwell, D. E.** 1991. Optical sectioning of microbial biofilm. *J Bacteriol.***173**:6558-6567.

**Leemans, J., Deblaere, R., Willmitzer, L., DeGreve, H., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M., Schell, J.** 1982. Genetic identification of functions or T<sub>L</sub>-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* **1**:147-152.

**Lehoczky, J.** 1968. Spread of *A. tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *Phytopathology.* **63**:239-246.

**Lequette, Y., Odberg-Ferragut, C., Bohin, J. P. and Lacroix J. M.** 2004. Identification of *mdoD*, and *modG* paralog which encodes a two-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated preiplasmic glucan backbone structures. *J Bacteriol.* **186**:3695-3702.

**Lerouge, I. and Vanderleyden, J.** 2002. O-antigen structural variation:mechanisms and possible roles in animal/plant microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev.* **26**:17-47.

**Liberati N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., Ausubel, F.M.** 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **103**:2833-2838.

**Lippincott, B.B. y Lippincott, J.A.** 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **97**:620-628.

**Lippincott J.A., Lippincott B.B and Starr M.P.** 1981. The genus *Agrobacterium*. En *The Prokaryotes*.pp 842-845. Ed. M.P. Starr H., Stolp H.G., Truper A., Balows H.G., Schlegel. Springer Verlag.Berlin.

**Listgarten, M.A.** 1976. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *Arch Oral boil.* **47**: 1-18.

**Llop , P., Murillo, J., Lastra, B. and López, M. M.** 2009. Recovery of nonpathogenic mutant bacteria from tumors caused by several *Agrobacterium tumefaciens* strain: a frecuente event?. *App and Environ Microbiology.* **75**:6504-6514.

**Lo, R.Y.C., McKerral, L.J., Hills, T.L. and Kostrzynska, M.** 2001. Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect. Immun.* **69**:4458-4464.

**López, M.M.** 1988. Características de los aislados españoles de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. y su control biológico mediante *Agrobacterium radiobacter* K84. *Tesis Doctoral.* E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Valencia.

**López, M. M.** 2001. Integrated control of crown gall in Mediterranean countries (CGMED). Proyecto INCO-DC: International Cooperation with Developing Countries (1994-1998).

**López, M. M. and Montesinos, E.** 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. En: *Patología Vegetal. Volumen 1, Capítulo 15*: 515-558. Ed. G. Llácer; M. M. López; A. Trapero; A. Bello. Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma-España.

**López, M. M., Salcedo, C. I., Orive, R. J. and Temprano, F. J.** 1983. Características de aislados españoles de *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*. Análisis Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, serie agrícola. **24**:239-249.

**López, M. M., Gorris, M. T., Temprano, F. J. and Orive, R. J.** 1987. Results of seven years of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* in Spain. EPPO (Eur. Mediterr. Plant Prot. Organ) Bull. **17**:273-280.

**López, M. M., Gorris, M. T and Montojo, A. M.** 1988. Opine utilization by Spanish isolates of *A. tumefaciens*. Plant Pathology. **37**:565-572.

**López, M. M., Gorris, M. T., Salcedo, C. L., Montojo, A. M. and Miro, M.** 1989. Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on stone fruit trees. Applied and Environmental Microbiology. **55**:741-746.

**López, M. M., Peñalver, R., Piquer, J. and Vicedo, B.** 1994. Tumores en cuello y raíces de frutales causados por *Agrobacterium tumefaciens*: epidemiología y control. Fruticultura Profesional. **67**:11-33.

**Lucas, M. M., Peart, J. L., Brewin, N. J. and Kannenberg, E. L.** 1996. Isolation of monoclonal antibodies reacting with the core component of lipopolysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 and mutant derivatives. J Bacteriol. **178**:2727-2733.

**Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. and Bloemberg, G. V.** 2002. Microbe-Plant interactions: principles and mechanisms. Antonie van Leeuwenhoek. **81**:373-383.

**Lyautey, E., Jackson, C. R., Cyrou, J., Rols, J. L. and Garabetian, F.** 2005. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. Microb Ecol. **50**:589-601.

**Macrae, S., Thomson, J. A. and Van Staden, J.** 1988. Colonization of tomato plants by two agrocin-producing strains of *Agrobacterium tumefaciens*. App. Environ. Microbiol. **54**:3133-3137.

**Makin, S. A. and Beveridge, T. J.** 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology*. **142**:299-307.

**Marsh, P. D.** 1995. Dental plaque. In: *Microbial Biofilms* (Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W., Eds.), pp. 282-300. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R.** 1971. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol*. **68**:337-48.

**Marshall, K.C.** 1985. Mechanisms of bacterial adhesion to solid-water interfaces. In *Bacterial Adhesion. Mechanisms and Physiological Significance*. Ed. D. C. Savage. M. Fletcher. Pp.133-61. New York: Plenum.

**Martí, R., Cubero, J., Daza, A., Piquer, J., Salcedo, C. I., Morente, C., López, M. M.** 1999. Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants. *Eur J Plant Pathol*. **105**:39-50.

**Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F. and Espinosa-Urgel, M.** 2010. Lap-F, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol Microbiol*. **77**:549-461.

**Matthysse, A. G.** 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol*. **154**:906-915.

**Matthysse, A. G.** 1985. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to host cells. Abstracts 6<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Maryland: 46-47.

**Matthysse, A. G.** 1987. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **169**:313-323.



**Matthysse, A. G.** 2006. The genus *Agrobacterium*. Prokaryotes; 5:91-114.

**Matthysse, A. G, McMahan, S.** 1998. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD*, and *attR* mutants. Applied and Environmental Microbiology. **64**: 2341-2345.

**Matthysse, A. G., Holmes, K.V., Gurlitz H.G.** 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. Journal of Bacteriology **145**, 583-595.

**Matthysse, A. G., Marry, M., Krall, L., Kate, M., Ramey, B. E., Fuqua, C., White, A. R.** 2005. The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular Plant-Microbe Interactions **18**:1002-1010.

**Mattick, J. S.** 2002. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol. **55**:289-314.

**Matsumoto, S., Ito, Y., Hosoi, T., Takahashi, Y. and Machida, Y.** 1990. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plantDNA. Mol Gene Genet. **223**:309-316.

**Mayerhofer, R. Z., Zoncz-Kalman, C., Nawrath, G., Bakkeren, A., Cramer, A, Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J. and Hohn, C.** 1991. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. EMBO J. **10**:697-704.

**McClure, N. C., Ahmadi, A-R. and Clare, B. G.** 1998. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of grown gall disease. Appl and Environ Microbiol. **64**:3977-3982.

**McIntire, F. C., Peterson, W. H. and Riker, A. J.** 1942. A polysaccharide produced by the crown-gall organism. J Biol Chem. **143**:491-496.

**Melchers, L. S., Thompson, D.V., Iodler, K.B., Schilperoot, R.A. and Hooykaas, P. J. J.** 1986. Nucleotide sequence of the virulence gene *virG* of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid: significant homology between *virG* and the regulatory genes *ompR*, *phoB*. and *dye* of *E.coli*. Nucleic. Acids.Research. **14**:9933-9940.

**Melchers, L. S., Regensburg-Tuink, T.J.F., Bourret , R.B., Sedee, N.J.A. Schilperoot, R. A. and Hooykaas, P.J.J.** 1989. Membrane topology and functional analysis of the sensory protein *VirA* of *Agrobacterium tumefaciens*. EMPO J. **8**:1919-1925.

**Merritt, P. M, Danhorn, T and Fuqua, C.** 2007. Motility and Chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. J Bacteriol. **189**:8005-8014.

**Mersereau, M., Pazour, G. J., Das, A.** 1990. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Gene. **90**:149-151.

**Metts, J., West, J., Foares, S. H. and Mathtsysse, A.G.** 1991. Characterization of three *Agrobacterium tumefaciens* avirulent mutants with chromosomal mutations that affect induction of *vir* genes. J Bacteriol. **171**:1080-1087.

**Mikkelsen, H., Duch, Z., Lilley, K. S. and Welch.** 2007. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. **189**:2411-2416.

**Miller, K. J., Kennedy, E. P. & Reinhold, V. N.** 1986. Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. Science. **231**: 48-51.

**Miller, K. J. and Gore, R. S.** 1992. Cyclic beta-1,6-1,3 glucans of *Bradyrhizobium:functional* analogs of the cyclic beta-1,2-glucans of *Rhizobium*? *Curr Microbiol.* **24**:101-104.

**Minsavage, G. V., Mudgett, M. B., Stall, R. E. and Jones, J. B.** 2004. Importance of *opgH(Xcv)* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. *Mol Plant-Microbe Interact.* **17**:152-161.

**Molinaro, A. C., De Castro, R., Lanzetta, M. Rarrilli, A., Raio and Zoina, A.** 2003. Structural elucidation of a novel core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from the new bacterial species *Agrobacterium larrymoorei*. *CarbohydrRes.* **338**:2721-2730.

**Moore, L. W.** 1976. Latent infections and seasonal variability of crown gall development in seedlings of *Prunus* species. *Phytopathology.* **66**:1097-1101.

**Moore, L. W. and Cooksey, D. A.** 1981. Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions. In *Biology of Rhizobiaceae*, ed. Giles K. L. and Atherly a. C. 15-46. Acad. Press. New York.

**Moore, L.W. and Allen, J.** 1986. Controlled heating of root-pruned dormant *Prunus* spp. Seedlings before transplanting to prevent crown gall. *Plan dis.* **70**:532-536.

**Morris, D. L.** 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science.* **108**:254-255.

**Morris, C. E. and Monier, J. M.** 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology.* **41**: 236-241.

**Mougel, C.** 2000. Structure génétique des populations d' *Agrobacterium* spp.: Effet sélectif de la plante et implication dans la diffusion conjugative du plasmide Ti. Tesis Doctoral. Universidad de Lyon. Francia.

**Mueller, R.S., McDoug, D., Cusumano, D., Sodhi, N., Kjelleberg, S., Azam, F. and Bartlett, D.H.** 2007. *Vibrio cholera* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic colonization. J. Bacteriol. **189**:5348-5360.

**Mukhopadhyay, P., Williams, J. and Mills, D.** 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. J Bacteriol. **170**:5479-5488.

**Müller, M.G., Forsberg, L.S., and Keating.** 2009. The *rkp-1* cluster is required for secretion of Kdo homopolymeric capsular polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. J. Bacteriol. **191**:6988-7000.

**Nair, G. R., Liu, Z. Y. and Binns, A. N.** 2003. Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. Plant Physiol. **133**:989-999.

**Narasimhulu, S. B., Deng, X., Sarria, R. Gelvin, S. B.** 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. The Plant Cell. **8**:873-886.

**Nesme, X., Bennedra, T., Collin, E.** 1990. Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula* L. x *P. alba* L. en pépinière forestière. **10**:581-588.

**New, P.B. and Kerr, A.** 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *Journal of Applied Bacteriology* **34**:233-236.

**New, P. B. and Kerr, A.** 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. J Appl Bacteriology. **35**:279-287.

**Noel, K.D., Forsberg, L.S., Carlson, R.W. rmander, B.** 2000. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. J Bacteriol. **182**:5317-5324.

**Normander, B., Hendriksen, N. B., Nybroe, O.** 1999. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* **65**:4646-51.

**Nyvad, B.** 1993. Microbial colonization of human tooth surfaces. *Acta Pathol. Microbiol Immunol Scan.* **101** (Suppl.32) 7-454.

**Okada, Y., Horiyama, S. and Koizumi, K.** 1985. Studies on inclusion complexes of non-steroidal anti-inflammatory agents with cyclophosphamide-A. *Yakugaku Zasshi* **106**:240-247.

**Okinaka, Y., Yang, C-H., Perna, N. T. and Keen, N. T.** 2002. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. *Mol Plant Microbe Interact.* **15**:619-629.

**Ophel, K., Kerr, A.** 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **40**:326-241.

**Ophel, K., Nicholas, P. R., Magarey, P. A., Bass, A. W.** 1990. Hot water treatment of dormant grape cuttings reduces crown gall. Incidence in a field nursery. *Am J Enol Vitic.* **41**:325-329.

**Ophir, T. and Gutnick, L.** 1994. A role for exopolysaccharide in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:740-745.

**Ormeño-Orillo, E.** 2005. Lipopolisacáridos de *Rhizobiaceae*: estructura y biosíntesis. *Revisión Revista Latinoamericana Microbiología.* **47**:165-175.

**Östberg, Y., Carroll, J. A., Pinne, M., Krum, J. G., Rosa, P. and Bergström, S.** 2004. Pleiotropic effects of inactivating a carboxyl-terminal protease, CtpA, in *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol. **186**:2074-2084.

**O'Toole, G. A. and Kolter, R.** 1998a. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol. **30**:295-304.

**O'Toole, G. A. and Kolter, R.** 1998b. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology **28**:449-461.

**O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. **54**:47-79.

**Otten, L., Canaday, J., Gerard, J. C., Fournier, P., Crouzet, P., Paulus, F.** 1992. Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids – a review. Mol Plant Microbe Interactions. **5**:279-287.

**Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix J. M., Robert-Baudouy, J. and Bohin, J. P.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. J Bacteriol. **183**:3134-3141.

**Palacio-Bielsa, A., González-Abolafio, R., Álvarez, B., Lastra, B., Cambra, M.A., Salcedo, C.I., López, M.M. and Panyalver, R.** 2009. Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumours. Plant Pathology **58**: 584-593.

**Panagopoulos, C. G. and Psallidas, P. G.** 1973. Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. (E.F. Smith & Townsed) Conn. Journal of Applied Bacteriology. **36**:233-240.

**Panagopoulos, C. G., Psallidas P.G. y Alivazatos A. S.** 1978. Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. Proceedings of the 4th International conference on Plant Pathogenic Bacteria. Angers. pps. 221-228.

**Parada, M., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A. M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F. J., Gil-Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J. E.** 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*s. Mol Plant-Microbe Interact. **19**:43-52.

**Patrick, S., Houston, S., Thacker, Z. and Blakely, G. W.** 2009. Mutational analysis of genes implicated in LPS and capsular polysaccharide biosynthesis in the opportunistic pathogen *Bacterioides fragilis*. Microbiology. **15**:1039-1049.

**Pearce, Bazin and Lynch.** 1995. The rhizosphere as a biofilm. In Lappin-Scott and Costerton (eds.), Microbial biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Penalver, R., Serra, M. T., Durán-Vila, N., López, M. M.** 1996. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* B6 and *Agrobacterium radiobacter* K84 to tomato root tips. Applied and Environmental Microbiology. **62**: 3530-3534.

**Penyalver, R. and López, M. M.** 1999. Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strain K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. Applied and Environmental Microbiology. **65**:1936-1940.

**Penyalver, R., Vicedo, B., López, M. M.** 2000. Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. European Journal of Plant Pathology. **106**:801-810.

**Penyalver, R., Oger, P., López, M. M. and Farrand, S. K.** 2001. Iron-binding compounds from *Agrobacterium* spp.: Biological control strain

*Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophore. Appl. Environ. Microbiol. **67**:654-664.

**Penyalver, R., Sánchez, J.J., Petit, A., Salcedo, C.I., López, M.M.** 2004. Tumorigenic *Agrobacterium* sp. Isolated from weeping fig in Spain. Plant. Dis. **88**:428.

**Penyalver, R., Oger, P. M, Shengchang, S., Álvarez, B., Salcedo, C. I., López, M. M., Farrand, S. K.** 2009. The S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene *ahcY* of *Agrobacterium radiobacter* strain K84 is required for optimal growth, antibiotic production and biocontrol of crown gall disease. Molecular Plant-Microbe Interactions. **22**:713-724.

**Peñalver, R., Vicedo, B., Salcedo, C. I., López, M. M.** 1994. *Agrobacterium radiobacter* strain K84, K1026 and K84 Agr<sup>-</sup> produce an antibiotic-like substance, active *in vitro* against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas*. Biocontrol Science and Technology. **4**: 259-267.

**Peralta, E. G. and Ream, L. W.** 1985. T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA. **82**:5112-6.

**Petit, A. and Tempé, J.** 1985. The function of T-DNA in nature. En *Molecular form and function of the plant genome*. pp. 625-636. Ed. L. Van Vloten-Doting, G.S.P. Groot, T.C. Hall. Plenum Press, New York.

**Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J., Morel, G.** 1970. Recherches sur les guanidines des tissus de grown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique entre les souches d'*Agrobacterium* et les tumeurs qu'elles induisent. Physiologic Végétale. **8**:205-213.

**Petit, A., Tempé, J., Kerr, Al, Holsters, M., Van Montegu M. and Schell, J.** 1978B. Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. Nature. **271**:570-571.



**Pinochet, J., Fernandez, C., Cunill, M., torrents, J., Felipe, A., López, M., Lastra, B. and Penyalver, R.** 2002. Response of new inerspecific gybrids for peach to rootknot and lesión nematodes, and crown gall. *Acta Horticultrae*. **592**:707-716.

**Pliego, C., Weert, de S., Lamers, G., de Vicente, A., Bloemberg, G., Cazorla, F. M and Ramos, C.** 2008. Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocato roots and *Rosellinia necatrix hyphae*. *Environ Microbiol.* **10**: 3295-3304

**Popoff, M. Y., Kersters, K., Kiredjian, M., Miras, I. and Coynault, C.** 1984. Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin. *Ann. Microbiol.* **135**:427-442.

**Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulonse, J. and Nesme, X.** 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl Environ Microbiol.* **72**:7123-7131.

**Pratt, L. A. and Kolter, R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* **30**:285-294.

**Price, N. P. J., Kelly, T. M., Raetz, C. R. H. and Carlson, R. W.** 1994. Biosynthesis of a structurally novel lipid A in *Rhizobium leguminosarum*: identification and characterization of six metabolic steps leadin from UDP-GlcNAc to 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-lipid IV. *J Bacteriol.* **176**:4646-4655.

**Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and. Lejeune, P.** 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**:5993-6002.

**Pu, X., Goodman, R. N.** 1993. Attachment of agrobacteria to grape cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**:2572-2577.

**Pulawska, J.** 2010. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents tumorigenic *Agrobacterium* spp. *J. of plant Pathol.* **92**:S87-S98.

**Putnoky, P., G. Petrovics, A. Kereszt, E. Grosskopf, D. T. Ha, Z. Banfalvi, and A. Kondorosi.** 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J Bacteriol* **172**:5450-8.

**Puvanesarajah, V., Schell, F. M., Stacey, G., Douglas, C. J. and Nester, E.W.** 1985. Role for 2-linked  $\beta$ -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* **164**:102-106.

**Raetz, C. R. H.** 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* **59**:129-170.

**Raetz, C. R. H. and Whitfield, C.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* **71**:635-700.

**Raio, A., Zoina, A., Moore, L. W.** 1997. The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant Pathol.* **46**:320-328.

**Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Von Bodman, S. B and Fuqua, C.** 2004a. Biofilm formation in plant-microbe association. *Current Opinion in Microbiology.* **7**:602-609.

**Ramey, B. E., Matthyse, A. G., Fuqua, C.** 2004b. The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *Molecular Microbiology.* **52**: 1495-1511.

**Ramos, C., Molbak, L., Molin, S.** 2000. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rate. *Appl Environ Microbiol.* **66**:801-9.

**Reader, J. S., Ordoukhanian, P. T., Kim, J., Crécy-Lagard, V., Hwang, I., Farrand, S. K., and Schimmel, P.** 2005. Major biocontrol of plant tumors targets tRNA synthetase. *Science.* **309**:1533.

**Reiling, S. A., Jansen, J. A., Henley, B. J. Sinngh, S., Chattin, C., Chandier, M. and Rowen D. W.** 2005. Prc protease promotes mucoidy in mucA mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **151**:2251-2261.

**Relic, B., Andjelkovic, M., Rossi, L., Nagamine, Y. and Hohn, B.** 1998. Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis by subcellular localization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:9105-10.

**Reuhs, B. L., Carlson, R. W. and Kim, J. S.** 1993. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic Acid-Containing Polysaccharides that are structurally analogous to group II K Antigens (Capsular Polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **175**:3570-3580.

**Rigano, L. A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M. R., Abramowicz, L., Torres, P. S., Yun, M., Castagnaro, A. P., El Oirdi, M., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J. M., Bouarab, K. and Vojnov, A. A.** 2007. Bacterial cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell.* **19**:2077-2089.

**Robertson E. B and Firestone M. K.** 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1284–1291.

**Robinette, D. and Matthyse, A. G.** 1990. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J Bacteriol. **172**:5742-5749.

**Roberts, W. P., Tate, M. E. and Kerr, A.** 1977. Agrocin 84 is a 6-N-phosphoramidate of an adenine nucleotide analogue. Nature. **265**:379-381.

**Rodríguez-Carvajal, M. A, Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Ruiz-Sainz, J. E., Buendía-Clavería, A. M., Ollero, F. J., Yang, S. S. and Gil-Serrano, A. M.** 2001. Determination of the chemical structure of the capsular polysaccharide of strain B33, a fast-growing soya bean-nodulating bacterium isolated from an arid region of China. Biochem J. **357**:505-511.

**Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S. and Ruíz- Saínz, J. E.** 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. FEMS Microbiol Lett. **272**:127-132.

**Rodríguez-Palenzuela, P., Burr, T. J. and Collmer, A.** 1991. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. J Bacteriol. **173**:6547-6552.

**Rogowsky, P. M., Close, T. J., Chimera, J. A., Shaw, J. J. and Kado, C. I.** 1987. Regulation of the vir genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. J Bacteriol. **169**:5101-5112.

**Rosenberg, C. and Huguet, T.** 1984. The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumour induction. Mol Gen Genet. **196**:533-536.

**Rovira, A. D. and Campbell, R.** 1974. Scanning electron microscopy of microorganisms on the roots of wheat. Microb Ecol. **1**:15-23.

**Rüberg, S., Pühler, A. and Becker, A.** 1999. Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology*. **145**:603-611.

**Ruinen, J.** 1961. The phyllosphere I. An ecologically neglected milieu. *Plant Soil*. **15**: 81-109.

**Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L. and Bais, H. P.** 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS*. 64:153-166.

**Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J. A. & Zorreguieta, A.** 2006. Proteins exported via the PrsD–PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol*. **188**: 4474–4486.

**Ryder, M. H., Slota, J. E., Scarim, A. and Farrand, S. K.** 1987. Genetic analysis of agrocin 84 production and immunity in *Agrobacterium* spp. *J Bacteriol*. **169**:4184-4189.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. A.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. **184**:1140-54.

**Sawada, H. and Ieki, H.** 1992. Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann Phytoph Soc Japan*. **58**:37-45.

**Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, Matsumoto, S.** 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus

*Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. International. J. Syst. Bacteriol. **43**:694-702.

**Schmitt, R.** 2002. *Sinorhizobial* chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. Microbiology. **148**:627-631.

**Schroth, M.N., Thompson, J.P., Hildebrand D.C.** 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* - *A. radiobacter* group from soil. Phytopathology **55**:645-647.

**Schulman, H. and Kennedy, E. P.** 1979. Localization of membrane-derived oligosaccharides in the outer envelope of *Escherichia coli* and their occurrence in other gram-negative bacteria. J Bacteriol. **137**:686-688.

**Sciaky, D. Montoya, A. L., Chilton, M. D.** 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. Plasmid. **1**:238-253.

**Semenov, A. M., Van Bruggen, A. H. C. and Zelenev, V. V.** 1999. Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. Microb Ecol. **37**:116-128.

**Setubal, J.C., Wood, D., Burr, T., Farrand, S. K., Goldman, B.S., Goodner, B., Otten, L. and Slater S.** 2009. The Genomics of *Agrobacterium*: insights into its Pathogenicity, Biocontrol and Evolution, p.91-112. En R. W. Jackson ed., Plant Pathogenic Bacteria. Caister Academic Press. Norfolk, UK.

**Shaw, C. H., Ashby, A. M. and Watson, M. D.** 1986. Plant tumor induction. Nature. **324**:415.

**Sheng, J. and Citovsky, V.** 1996. *Agrobacterium*-Plant Cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. The Plant Cell. **8**:1669-1710.

**Shim, J. S., Farrand, S. K. and Kerr, A.** 1987. Biological control of crown gall: Construction and testing of new biocontrol agents. *Phytopathology*. **77**:463-466.

**Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M, Sakagami, Y. and Machida, Y.** 1990. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **87**:6684-6688.

**Silipo, A., De Castro, C., Lazetta, R., Molinaro, A. and Prilli, M.** 2004. Full structural characterization of the lipid A components from the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 lipopolysaccharide fraction. *Gycobiology*. **14**:805-15.

**Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A.** 1983. Vector plasmid for *in vivo* and *in vitro* manipulations of gram-negative bacteria. p. 98-106 *In* A. Pühler (ed.), *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.

**Singh, P.K. et al.** 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. **417**:552-555.

**Slater, S.C., B.S. Goldman, B. Goodner, J.C. Setubal, S.K. Farrand, E.W. Nester, T.J. Burr, L. Banta, A.W. Dickerman, I. Paulsen, L. Otten, G. Suen, R. Welch, N.F. Almeida, F. Arnold, O.T. Burton, Z. Du, A. Ewing, E. Godsy, S. Heisel, K.L. Houmiel, J. Jhaveri, J. Lu, N.M. Miller, St. Norton, Q. Chen, W. Phoolcharoen, V. Ohlin, D. Ondrusek, N. Pride, S.L. Stricklin, J. Sun, C. Wheeler, L. Wilson, H. Zhu, and D.W. Wood.** 2009. Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J Bacteriol*. **191**:2501-2511.

**Smit, G.** 1988. Adhesins from *Rhizobiaceae* and their role in plant-bacterium interaction. Ph.D. thesis. Leiden University, Leiden. The Netherlands.

**Smit, G., Logman, T. J. J., Boerrigter, M. E. T. I., Kijne, J. W. and Lugtenberg, B. J. J.** 1989. Purification and partial characterization of the Ca<sup>2+</sup> dependent adhesion from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, which mediates the first step in attachment of Rhizobiaceae cells to plant root hair tips. *J Bacteriol.* **171**:4054-4062.

**Smith, E. F. and Townsend, C. O.** 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science.* **25**:671-673.

**Sobiczewski, P., Karczewski, J. and Berczynski, S.** 1991. Biological control of crown gall *Agrobacterium tumefaciens* in Poland. *Fruit Science Reports* **18**:125–132.

**Spielmann, A. and Simpson, R. B.** 1986. T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. *Mol Gene Genet.* **205**:34-41.

**Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P.** 1985a. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry.* **27**:2781-2785.

**Stachel, S. E., Nester, E. W. and Zambryski, P.** 1985b. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* **83**:379-383.

**Stachel, S. E. and Nester, E. W.** 1986. The genetic and transcriptional organization of *vir* región of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* **5**:1445-1454.

**Stachel, S. E. and Zambryski, P. C.** 1986. *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell.* **46**:325-333.



**Stachel, S. E., Timmerman, B., Zambryski, P.** 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* *vir* gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5'virD gene products. EMBO J. **6**:857-863.

**Stanfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. and Ditta, G.S.** 1988 The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for beta-(1,2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. J Bacteriol. **170**: 3523–3530.

**Steck, T. R., Morel, R. and Kado, C. I.** 1988. Vir box sequences in *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 and A6. Nucleic Acids Research. **16**:8736.

**Stickler, D.J., King, J. B., Winters, C. and Morris, S. L.** 1993. Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. J Infect. **27**: 133.

**Stockwell, V. O., Moore, L. W. and Loper, J. E.** 1993. Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84. Environment. App. And Environmental Microbiology. **59**:2112-2120.

**Stockwell, V. O., Kawalck, M. D., Moore, L. W. and Loper, J. E.** 1996. Transfer of pAgK84 from the biocontrol agent *Agrobacterium radiobacter* K84 to *A. tumefaciens* under field conditions. Phytopathology. **86**:31-37.

**Stonier, T.** 1956. Labelling crown gall bacteria with <sup>32</sup>P for radioautography. Journal of Bacteriology. **72**:259-268.

**Stonier, T.** 1960. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology* **79**:889-898.

**Stonier, T.** 1978. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. J Bacteriol. **79**:889-898.

**Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G, Costerton, J. W.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* **56**:187-209.

**Süle, S., Cursino, L., Zheng, D., Hoch, H. C. and Burr, T. J.** 2009a. Surface motility and associated surfactant production in *Agrobacterium vitis*. *Lett Appl Microbiol.* **49**:596-601.

**Süle, P., T. Wadhawan, N.J. Carr, S.M. Horne, A.J. Wolfe, and B.M. Prüß.** 2009b. A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**:299-304.

**Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A., Ream, W.** 1996. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. **178**:1207-1212.

**Sutherland, I.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* **147**:3-9.

**Sykes, L. C. and Matthyse, A. G.** 1986. Time required for tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. *App Environ Microbiology.* **52**:597-598.

**Taylor, M. W., Schupp, P. J., Dahllof, I., Kjelleberg, S. and Steinberg, P. D.** 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ Microbiol.* **6**: 121-130.

**Tempé, J. and Goldmann, A.** 1982. Occurrence and biosynthesis of opines. En: *Molecular biology of plant tumors.* Ed. G. Khal and J. S. Schell. Capítulo 15: 428-449. Academic Inc. London LTD.

**Tempé, J. and Petit, A.** 1982. Opine utilization by *Agrobacterium*. *Molecular Biol of Plant Tumors*:451-459. Ed. G. Kahl, J. S. Schell Academic Press, New York.

**Tempé, J. and Petit, A.** 1983. La piste des opines. En Pühler A. (ed): Molecular Genetics and Plant Interaction pp. 14. Berlin: Springer-Verlag.

**Tempé, J., Petit, A., Holsters, M., Van Montagu, M., Schell, J.** 1977. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. Proceedings of National Academy of Sciences. **74**:2848-2849.

**Tinland, B., Hohn, B. and Puchta, H.** 1994. *Agrobacterium tumefaciens* transfer single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. Proc Natl Acad Sci USA. **91**:8000-8004.

**Tomlinson, A. D., Ramey-Hartung, B., Day, T. V., Merritt, P. M. and Fuqua, C.** 2010. *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. Microbiology. **156**:2670-2681.

**Tujula, N. A., Holmstrom, C., Mussmann, M., Amann, R., Kjelleberg, S. and Crocetti, G. R.** 2006. A CARD-FISH protocol for identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. J Microbiol Methods. **65**:604-607.

**Turnbull, G. A., Morgan, J. A. W., Whipps, J. M. and Saunders, J. R.** 2001. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment in bacterial-plant interactions. FEMS Microb Ecol. **35**:57-65.

**Tzfira, T., and Citovsky, V.** 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: Biology and biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. **17**: 147–154.

**Unger, L., Ziegler, S. F., Huffman, G. A., Knauf, V. C., Peet, R., Moore, L. W., Gordon, M. P., Nester, E. W.** 1985. New class of limited-host-range *Agrobacterium* mega-tumor including plasmid lacking homology to the

transferred DNA of a wide-host-range, tumor-inducing plasmid. *J Bacteriol.* **164**:723-730.

**Vande Broek, A. and Vanderleyden, J.** 1995. Review: genetics of the *Azospirillum* plant root association. *Crit Rev Plant Sci.* **14**:445-466.

**Veluthambi, K., Krishnan, M., Gould, J. H., Smith, R. H. and Gelvin, S. B.** 1989. Opines stimulate induction of the *vir*-genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Bacteriol.* **171** (7):3696-3703.

**Vicedo, B.** 1995. Transferencia de plásmidos entre *Agrobacterium tumefaciens* y *A. radiobacter* en ensayos de lucha biológica. Caracterización molecular y comportamiento de los transconjugantes. Tesis Doctoral. Universitat de València.

**Vicedo, B., Peñalver, R., Asíns, M.J., López, M.M.** 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra<sup>-</sup> mutant strain K1026. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**: 309-315.

**Vidaver, A.K.** 1982. Biological control of plant pathogens with prokaryotes. En *Phytopathogenic Prokaryotes*. Vol.2:387-397. Ed. M.S. Mount y G.H. Lacy. Academic Press. New York.

**Vroom, J. M, De Grauw, K. J, Gerristen, H. C., Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., et al.** 1999. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3502-11.

**Walker, J. T., Mackerness, C. W., Rogers, J. and Keevil, C. W.** 1995. Heterogeneous mosaic-a haven for waterborne pathogens. In: *Microbial Biofilms* (Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W., Eds.), pp. 196-204. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Walker, T. S., Bais, H. P., Deziel, E., Schweitzer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., Vivanco, J. M.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formations, and root exudation. *Plant Physiol.* **134**:3210-3331.

**Wanner, B. L.** 1996. P assimilation and control of the Pho regulon, p1357-1381. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schacchter, and H. E. Unberger (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol.2. ASM Press, Washington, D.C.

**Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Zambryski, P.** 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell.* **38**:455-462.

**Wang, K., Herrera-Estrella, A. and Van Mopntagu, M.** 1990. Overexpression of *virD1* and *vir D2* genes in *Agrobacterium tumefaciens* enhances T-complex formation and plant transformation. *J Bacteriol.* **172**:4432-4440.

**Warawa, J.M., Long, D., Rosenke, R., Gardner, D. and Gherardini, F.** 2009. Role for the Burkholderia pseudomallei capsular polysaccharide encoded by the wcb operon in acute disseminated melioidosis. *Infect. Immun.* **77**:5252-5261.

**Watnick, P. I. and Kolter, R.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholera* biofilm. *Mol Microbiol.* **34**:586-595.

**Watnick, P.I., Fullner, K.J. and Kolter, R.** 1999. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**:3606-3609.

**Watson, B., Currier, M.P., Gordon, M.P., Chilton, M.D., Nester, E.W.** 1975. Plasmid required for virulence of *A. tumefaciens*. *Journal of Bacteriology.* **123**: 255-264.R.

**Watson, R. J., Chan, Y-K, Wheatcroft, R., Yang, A-F., Han, S.** 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J Bacteriol.* **170**:927-34.

**Watt, M., Hugenholtz, P., White, R. and Vinall, K.** 2006. Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environ Microbiol.* **8**:871-884.

**Webster, J., Dos Santos, M. and Thomson, J. A.** 1986. Agrocin-producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevines isolates. *App Environ Microbiol.* **52**:217-219.

**Weller, S.A., Stead, D.E., O'Neill, T.M., Hargreaves, D., McPherson, G.M.** 2000. Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 strains and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathology* **48**:43-50.

**Wells, D. H., Chen, E. J., Fisher, R. F. and Long, S. R.** 2007. ExoR is genetically coupled to the ExoS-ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol.* **64**: 647-664.

**West, A.H., Stock, A.M.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Science* **26**: 369-376.

**White, F. F and Nester, E. W.** 1980. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J. Bacteriol.* **144**:710-720.

**White, P. R., and Braun, A.C.** 1941. Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science.* **94**:239-241.

**White, P. R. and Braun, A. C.** 1942. A cancerous neoplasms of plants: Autonomous bacteria-free crown-gall tissue. *Cancer Res.* **2**:597-617.

**Whiteley, M. et al.** 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. **413**: 860-864.

**Willmitzer, L., Dhaese, P., Schreier, P. H., Schmalenbach, W., Van Montagu, M. and Schell, J.** 1983. Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell*. **32**:1045-1056.

**Wimpenny, J. W. T, Colasanti, T.** 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilm based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology*. **22**: 1-16.

**Winans, S.C., Allenza, P., Stachel, S. E., McBride, K. E. and Nester, E. W.** 1987. Characterization of the *virE* operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. *Nucleic Acids Research*. **15**:825-837.

**Winans, S.C., Kerstetter, R. A. and Nester, E. W.** 1988. Transcriptional regulation of the *vir A* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. **170**:4047-4054.

**Winans, S. C.** 1992. Two-Way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological Reviews*. **56**:12-31.

**Wood, J. W.** 1980. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res*. **85**: 271-287.

**Wood, D. W., Stubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P, Okura, V. K. Zhou, Y., Chen, L. Wood, G.E. et al.** 2001. Genome sequence of the planta pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. 2001-2328.

**Wright, E. L., Deakin, W. J. and Shaw, C. H.** 1998. A chemotaxis cluster from *Agrobacterium tumefaciens*. *Gene*. **220**:83-89.

**Yanofsky, M. L., Montoya, A., Rubin, R., Krul, W., Gordon, M., Nester, E.** 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gene Genet.* **201**:237-246.

**Yanofsky, M. F. and Nester, E. W.** 1986. Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* **168**:244-250.

**Yanofsky, M. F., Porter, S. W. G., Young, C., Albright, L. A., Gordon, M. P. and Nester, E.W.** 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell.* **47**:471-477.

**Yao, J. and Allen, C.** 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* **188**:3697–708.

**Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E, Kerr, A., Sawada, H.** 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**:89-103.

**Young, J.M., Kuykendall, L.K., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H.** 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* a reply to Farrand *et al.* 2003. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1689-1695.

**Yousef-Coronado, F., Travieso, M.L. and Espinosa-Urgel, M.** 2008. Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surface by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**:118-124.

**Yusibov, V. M., Steck, T. R., Gupta, V. and Gelvin, S. B.** 1994. Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:89-103.



**Zaenen, I., Van Larebeke, N. Van Montagu, M. Shell, J.** 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Bio.* **86**:109-127.

**Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K., Goodman, H. M.** 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:361-370.

**Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J.** 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* **2**:2143-2150.

**Zambryski, P. C.** 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* **43**:465-90.

**Zevenhuizen, L. P. T. M.** 1986. Selective synthesis of polysaccharides by *Rhizobium trifolii* strain TA-1. *FEMS Microbiol Lett.* **35**:43-47.

**Zevenhuizen, L. P. T. M.** 1997. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydr Polym.* **33**:139-144.

**Zhang, X. Q., Bishop, P. L. and Kupferle, M. J.** 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Wat Sci Tech.* **37**:345-348.

**Zheng, D., Zhang, H., Carle, S., Hao, G., Holden, M. R. and Burr, T. J.** 2003. A *luxR* homolog, *aviR*, in *Agrobacterium vitis* is associated with induction of necrosis on grape and a hypersensitive response on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **16**:650-658.

**Zobell, C. E.** 1943. The effects of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol.* **46**:39-56.

**Zorreguieta, A., Ugalde, R. A. and Leloir, L.F.** 1985. An intermédiaire in cyclic 1-2 $\beta$  glucan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **126**:352-357.

**Zorreguieta, A. and Ugalde, R. A.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in  $\beta$ -D(1,2) glucan synthesis. *J Bacteriol.* **167**:951.

**Zorreguieta, A., Cavaignac, S., Geremia, R. A. & Ugalde, R. A.** 1990. Osmotic regulation of 1,2-b-glucan synthesis in members of the family *Rhizobiaceae*. *J Bacteriol.* **172**:4701±4704.

**Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S. K., Winnens, S. C.** 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol.* **182**:3885-3895.

**Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., Zambryski, P.** 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The plant journal.* **23**:11-28.