



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



**“ANÁLISIS MOLECULAR DEL  
ANTAGONISMO MICROBIANO DE  
*BURKHOLDERIA GLADIOLI*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

M.C. EDUARDO SEYNOS GARCIA

**ASESOR DE TESIS:**

D.C. LUIS ERNESTO FUENTES RAMÍREZ

**PUEBLA, PUE.**

**NOVIEMBRE, 2019**



**BUAP**

Puebla, Pue. a 6 de noviembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado del alumno **Eduardo Seynos García**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


**"Análisis molecular del antagonismo microbiano de *Burkholderia gladioli*"**


A nuestro juicio, el alumno **Eduardo Seynos García** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

  
D.C. Jesús Muñoz Rojas

  
D.C. Alberto Ramírez Mata

  
D.C. Vianey Marín Cevada

  
D.C. Miguel Ángel Villalobos López

  
D.C. Miguel Castañeda Lucio

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio K11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
Tel (022) 228 52 80 Ext. 2532  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

## **AGRADECIMIENTOS**

### **INSTITUCIONALES**

A la BUAP por ser una de las mejores universidades públicas del país y contar con programas de posgrado de calidad.

Al ICUAP y al Centro de investigaciones en ciencias microbiológicas por haberme permitido cursar su programa de posgrado de nivel doctorado.

Al laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del cual forme parte y sin el cual no hubiese podido realizar la parte experimental del proyecto de investigación.

Al CONACYT por brindarme una beca para cursar mis estudios de doctorado y por el soporte económico destinado a mi proyecto de tesis CONACYT CB-2009 128235-Z.

A la VIEP por su apoyo económico para congresos nacionales e internacionales entre otras cosas.

## ACADÉMICOS

Al Doctor Luis Ernesto Fuentes Ramírez por ver en mi potencial para desarrollar esta tarea tan difícil denominada ciencia, por haber sido una parte importante en mi formación académica y por ser un ejemplo a seguir, gracias por todas las enseñanzas que hasta este momento me ha brindado.

A los doctores por sus extraordinarias clases e insustituibles enseñanzas, algunos de ellos formaron parte de mi comité y otros me aportaron con sus conocimientos (Jesús Muñoz, Alberto Mata, Vianey, Rocío, Antonio Munive, Miguel Villalobos, Miguel Castañeda, Ignacio Martínez, entre otros).

A todos los no académicos entre ellos a las secretarías Mary y Angeles por hacerme más fáciles los trámites.

A todos los integrantes que están o estuvieron de paso en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (Mtra. Rocío, Yuri, Vianey, Yagul, Roberto, Sonia, las rebecas, y todos los que se me estén olvidando).

A compañeros de posgrado que me apoyaron con sugerencias y partes técnicas para el proyecto (Guadalupe, Liliana López, Osvaldo, Laura y los que faltan).

A todos mis cuates por esos momentos inolvidables durante este periodo de mi vida (Rojan, Aco, Toñito, Israel, Joel, Danae, Chato, Rene, Roberto y los que faltan).

A mis compañeros de generación por ser parte de esta aventura (Miguel Aco, Denisse, Sonia, Cristina).

## **FAMILIA Y AMIGOS**

A mis padres (Margarita y Romualdo) por haberme brindado la oportunidad de venir a este mundo y permitirme formar parte del mundo científico, GRACIAS.

A Caro por ser tan paciente conmigo y por darme a mis dos hijos Rodrigo y Victor Emilio.

A toda mi familia por formar parte de esta etapa de mi vida y por su aliento para que yo siga adelante.

A todo el equipo de futbol “conacyt futbol team” por hacer más llevadero este viaje.

A todos los que me falten y se sientan excluidos también les agradezco por haber estado allí.

**POR ÚLTIMO, LE AGRADEZCO A LA VIDA Y A MI MICROBIOTA POR MANTENERMO SANO  
:b**

## ÍNDICE GENERAL

Descripción	Página
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Burkholderia</i>	1
1.2. <i>Burkholderia gladioli</i>	4
1.2.1. PATOGENICIDAD DE <i>B. gladioli</i> EN HUMANOS	4
1.2.2. EL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE <i>Burkholderia gladioli</i> .	5
1.2.3. <i>Burkholderia gladioli</i> Y SU RELACIÓN CON PLANTAS	12
1.2.4. OTRAS APLICACIONES DE <i>Burkholderia gladioli</i>	15
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>22</b>
4.1. <b>Objetivos particulares</b>	<b>22</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
5.1. Rastreo y selección de mutantes con actividades antimicrobianas disminuidas	23
5.2. Rescate y secuenciación de los genes interrumpidos por el transposón <i>Himar 1</i>	24
5.3. Ensayo para la detección de N-acil homoserina lactonas	25
5.4. Ensayo para la identificación de movimiento tipo Swarming	25
5.5. Ensayo para la cuantificación de toxoflavina	26
5.6. Análisis de la expresión del gen <i>toxA</i> a través de RT-PCR de punto final	26
5.7. Ensayos de virulencia en plantas	27
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
6.1. Seleccionar aquellas mutantes al azar de <i>B. gladioli</i> UAPS07070 que se vean afectadas en su capacidad antagónica en contra de diferentes microorganismos.	29
6.2. Identificar las regiones implicadas en la alteración de la capacidad antagónica de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	34
6.3. Restaurar el fenotipo silvestre en las mutantes de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	40
6.4. Elaborar un modelo que explique las interacciones y participación de los genes en el efecto antagónico de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	48
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>51</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>72</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>
ANEXO I. Secuencias	87
ANEXO II. Figuras complementarias	89
ANEXO III. Tablas complementarias	92

## Índice de tablas

		<b>Página</b>
Tabla 1.	Porcentaje de identidad de los genes de seis mutantes derivadas de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	35
Tabla 2.	Nombre del gen putativo identificado en la secuencia de las seis mutantes derivadas de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	35
Tabla 3.	Identidad de los péptidos de QS y LysR identificados en <i>B. gladioli</i> UAPS07070	37
Table 4.	Putativas cajas lux de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	44
Table S1	Plásmidos y cepas bacterianas.	92

## Índice de figuras

		Página
Figura 1.	Árbol filogenético de <i>Burkholderia</i> sensu lato.	2
Figura 2.	Estructura química del ácido bongkreki.	6
Figura 3.	Estructura química de la Toxoflavina.	7
Figura 4.	Estructura química general de Enaciloxina y sus derivados.	8
Figura 5.	Estructura química general de Gladiolina.	9
Figura 6.	Estructura química general de Icosalide A1.	9
Figura 7.	Estructura química de lagriamide.	10
Figura 8.	Estructura química de los antimicrobianos producidos por <i>B. gladioli</i> Lv. StA.	11
Figura 9.	Lesiones producidas por <i>B. gladioli</i> en hojas de gladiola.	13
Figura 10.	Actividad antagónica de <i>B. gladioli</i> en medio sólido.	17
Figura 11.	Ensayos de doble capa.	29
Figura 12.	Ensayos de antagonismo de <i>B. gladioli</i> UAPS07070 y sus 13 mutantes derivadas en diferentes medios de cultivo en contra de la cepa sensible <i>Acinetobacter</i> sp. UAPS0169.	30
Figura 13.	Curva de crecimiento bacteriano en medio Luria Bertani.	32
Figura 14.	Ensayos de antagonismo en contra de diferentes cepas sensibles.	34
Figura 15.	Representación del tamaño de cada uno de los genes interrumpidos en las seis mutantes derivadas de <i>B. gladioli</i> UAPS07070.	36
Figura 16.	Mapa físico del <i>loci</i> de los genes <i>tofl</i> y <i>tofr</i> de las mutantes BG1232 y BG87, respectivamente.	37
Figura 17.	Ensayo para detección de producción de autoinductores de QS producidos por proteínas homólogas a LuxI.	38
Figura 18.	Detección de toxoflavina.	39
Figura 19.	RT-PCR de punto final del gen <i>toxA</i> .	40
Figura 20.	Ensayos de antagonismo en contra de la cepa sensible <i>Acinetobacter</i> sp.	41
Figura 21.	Detección de autoinductores de tipo AHLs de cadena corta empleando la cepa reportera <i>C. violaceum</i> CV026.	42
Figura 22.	Detección de acil homoserina lactonas.	42
Figura 23.	Detección de toxoflavina por espectrofotometría.	43
Figura 24.	Papel del QS en el desplazamiento tipo swarming de <i>B. gladioli</i> .	45
Figura 25.	Papel del regulador LysR en el desplazamiento tipo swarming de <i>B. gladioli</i> .	46
Figura 26.	Ensayos de virulencia en cebolla.	47
Figura 27.	Ensayos de virulencia en lechuga.	47
Figura 28.	Modelo teórico de la regulación de la biosíntesis de toxoflavina en UAPS07070.	49
Figura S1.	Análisis de la proteína Tofl putativa en Interproscan platform.	89
Figura S2.	Análisis de la proteína ToFR putativa en Interproscan platform.	90
Figura S3.	Plásmido p87-2.	90
Figura S4.	Plásmido p1232.	91
Figura S5.	Plásmido p79-1.	91
Figura S6.	Plásmido pAHL-7.	92
Figura S7.	Plásmido pQSR-15.	92

## RESUMEN

El fenotipo de antibiosis en agar Luria Bertani (LB) en contra de la cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169 fue evaluado en cerca 6000 mutantes con inserción aleatoria del transposón *Himar1* derivadas de *B. gladioli* UAPS07070. Al ser comparadas con la cepa silvestre trece mutantes redujeron su capacidad antagónica en contra de la cepa sensible. Las mutantes defectivas exhibieron menor afectación en la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas en medio mínimo con fuente de carbono específica (glucosa, glicerol, ácido succínico, acetato de sodio, gluconato de sodio y fructosa) en comparación con el medio LB. Únicamente se obtuvo la secuencia e identificación del gen inactivado por el evento de transposición para seis de las trece mutantes. Los genes identificados están relacionados al sistema de regulación de Quorum Sensing (QS) (BG1232 y BG87), a un regulador de tipo LysR (BG79), a las enzimas glutamato deshidrogenasa (BG33) y NAD(P)H flavina oxidoreductasa (BG41) y a una proteína de tipo lectina de unión a fucosa (BG12). La producción de toxoflavina, el desplazamiento tipo swarming y la patogenicidad a plantas fue evaluada solamente en tres mutantes. La cepa silvestre produce toxoflavina (importante factor de virulencia en plantas con propiedades antimicrobianas) en agar LB. No se detectaron señales de toxoflavina en las mutantes de QS y del regulador LysR. La expresión transcripcional del gen *toxA* (síntesis de toxoflavina) no fue detectada por RT-PCR de punto final en las mutantes de los sistemas de regulación en comparación con UAPS07070. La participación de la toxoflavina como compuesto antimicrobiano en nuestro modelo de estudio es evidente. La síntesis de toxoflavina en *B. gladioli* UAPS07070 es dependiente de QS y del regulador LysR putativo bajo nuestras condiciones experimentales. Movimiento tipo swarming fue exhibido por la cepa silvestre a 30 °C pero no a 37 °C. El swarming fue abolido en las mutantes BG1232, BG87 y BG79. El movimiento tipo swarming es dependiente del sistema de QS y del regulador LysR putativo en nuestro modelo de estudio. *B. gladioli* UAPS07070 fue capaz de inducir síntomas de enfermedad en bulbos de cebolla y hojas de lechuga. Las mutantes de QS y LysR mostraron ligera atenuación en la enfermedad a plantas en comparación a UAPS07070.

## ABSTRACT

The antibiosis phenotype in Luria Bertani (LB) assay versus the sensitive strain *Acinetobacter* sp. UAPS0169 was evaluated in approximately 6000 mutants of the strain *B. gladioli* UAPS07070. The mutants produced with the random insertion transposon *Himar1*. Thirteen mutants exhibit less antagonism ability in comparison with the wild type strain. The antagonistic phenotype was less evident when the defective clones were grown in minimal medium with specific carbon sources (glucose, glycerol, succinic acid, sodium acetate, sodium gluconate and fructose) than with LB. The interrupted gene was sequenced and identified in six mutants. The knocked genes are related to the Quorum Sensing system (QS) (BG87 and BG1232), to the regulator transcriptional type LysR (BG79), to a glutamate dehydrogenase (BG339), to a NAD(P)H flavin oxidoreductase (BG41) and to a fucose-binding lectin protein (BG12). The toxoflavin production, swarming and plant pathogenicity was evaluated in QS and LysR mutants. The toxoflavin, involved in virulence and antimicrobial properties, biosynthesis was shown in solid medium LB by *B. gladioli* UASP07070. The QS and LysR mutants did not show detectable toxoflavin production. BG87, BG1232 and BG79 did not show *toxA*, toxoflavin biosynthesis, transcription by RT-PCR end point assay. Toxoflavin plays an important role in the antibiosis phenotype of our model. In *B. gladioli* UAPS07070 the toxoflavin production is QS-dependent and putatively also LysR-dependent under our experimental conditions. UAPS07070 exhibits swarming motility at 30 °C but not at 37 °C. The motility swarming was abolished in BG79, BG87 and BG1232 mutants. QS and the putative LysR exert positive regulation over swarming displacement in UAPS07070. The wild type induced disease symptoms in bulb onions and lettuce leaves. The QS and putative LysR defective strain showed slight attenuation in plant damages in comparison with *B. gladioli* UAPS07070.

## 1. INTRODUCCION

Los microorganismos como las bacterias y los hongos siempre han estado en una constante carrera competencia por los recursos y los nichos, el resultado de estas intensas interacciones es la evolución de un poderoso y diverso arsenal de armas biológicas (Hibbing, 2010). Gracias a esta característica evolutiva de los microorganismos, se ha diseñado una nueva estrategia conocida como control biológico o biocontrol, la cual está enfocada en la sustitución de productos químicos en la agricultura. Ello debido a que se ha comprobado que éstos tienen efectos negativos en el ambiente y en la salud humana, por lo que se ha propuesto al biocontrol como una alternativa más amigable con el ambiente. Los agentes de biocontrol o de control biológico son aquellos microorganismos que pueden reducir la incidencia o severidad de enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos en plantas y se ha denominado como antagonistas a los agentes de biocontrol que exhiben actividad inhibitoria hacia los fitopatógenos (Beattie, 2007). La antibiosis se refiere a la producción de diversos compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden matar o inhibir a otros microorganismos y es uno de los mecanismos por los que las rizobacterias y las bacterias endófitas llevan a cabo el control biológico de fitopatógenos. Diversos microorganismos como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* son capaces de producir sustancias antagónicas. Algunas de estas bacterias han mostrado excelentes resultados como agentes de control biológico contra hongos y bacterias fitopatógenas, debido a esta característica también se les considera como Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (PGBP) (Compant, 2008; Di Santo, 1998; Isnansetyo, 2003; Yamaki, 1994).

### 1.1. *Burkholderia*

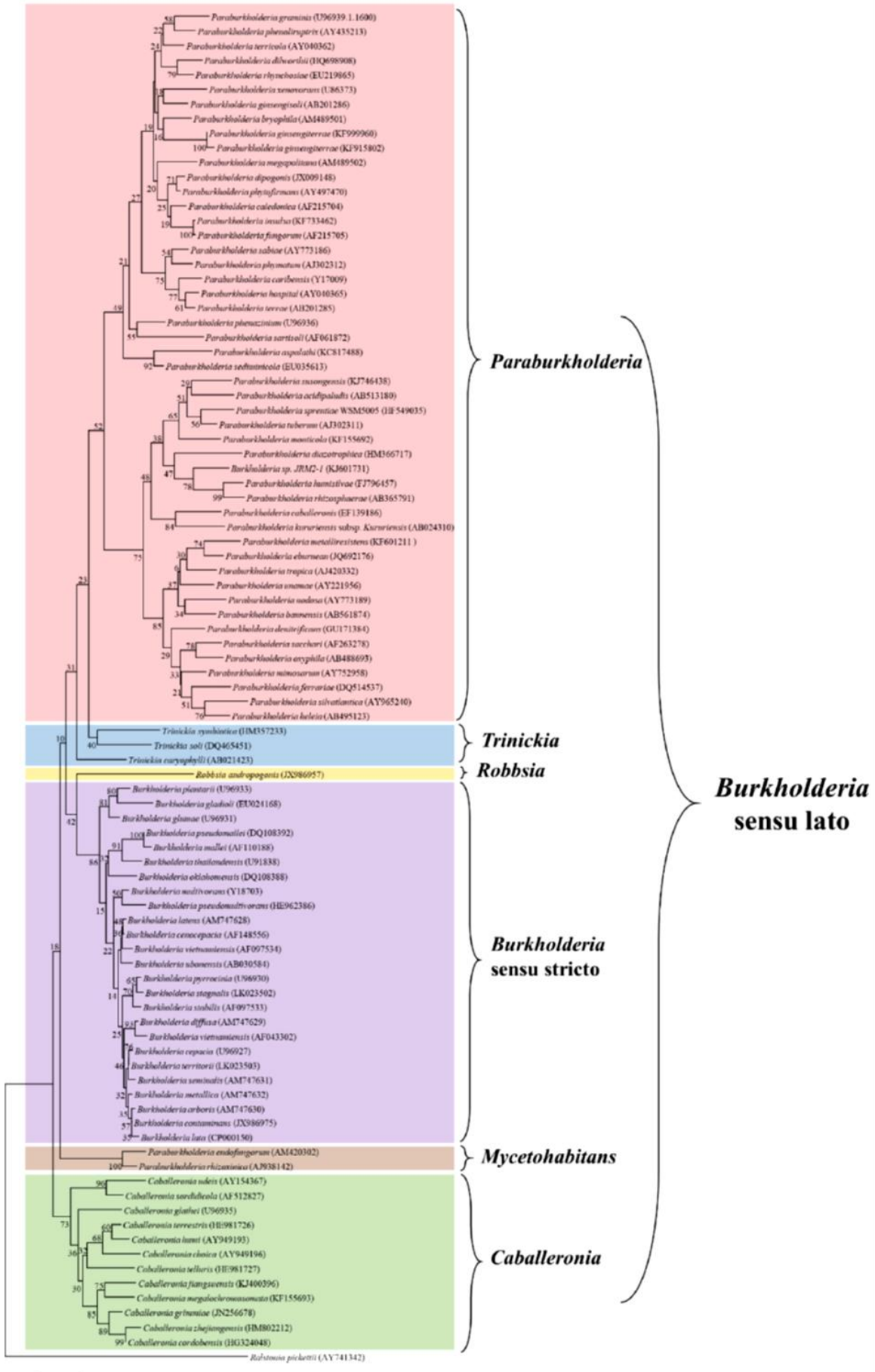
Éste es un género muy diverso de bacterias gramnegativas, que pertenecen a la subdivisión de las *Betaproteobacteria*, el género está formado por más de 70 especies que pueden colonizar una amplia diversidad de hábitats que van desde suelo a agua, así como plantas y animales (Compant, 2008). Existe una gran cantidad de evidencia documentada

enfocada en las especies patogénicas de este género debido a su importancia clínica. Por otro lado, en los últimos años ha crecido la descripción de especies de *Burkholderia* de origen ambiental y asociadas a plantas. Estudios recientes basados en análisis filogenéticos han permitido agrupar al género en dos clusters, el primer grupo incluye patógenos de animales, humanos y plantas (El complejo de *Burkholderia cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. gladioli* y *B. glumae*), mientras que el segundo cluster incluye a más de 30 especies no patogénicas de las cuales muchas se han encontrado en asociación con plantas y han mostrado un alto potencial benéfico hacia ellas (Suárez-Moreno, 2012).

Actualmente y de acuerdo a la revisión de Manna y col. 2019 el género *Burkholderia* ha sido objeto de rearrreglos taxonómicos internos, se entiende como *Burkholderia* sensu lato a todas las especies del género que comprende a los patógenos de plantas, animales y humanos, patógenos oportunistas, así como a las especies ambientales, biodegradadoras de compuestos xenobioticos, promotoras de crecimiento vegetal y simbioses de plantas (Manna, 2019; Estrada-De los Santos, 2018). Dentro del grupo *Burkholderia* sensu lato se han propuesto y ahora se reconocen nuevos géneros para diferentes clados. Éstos incluyen *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *Robbsia*, *Burkholderia* sensu stricto, *Mycetohabitans* y *Caballeronia* (Fig. 1). El grupo *Burkholderia* sensu stricto comprende al Complejo *Burkholderia cepacia* y a patógenos de animales y plantas (Manna, 2019).

Algunas de estas especies tienen la capacidad para nodular leguminosas (Chen, 2003; Verstraete, 2013), degradar compuestos recalcitrantes, fijar nitrógeno atmosférico, promover el crecimiento de plantas y participar agentes de control biológico por antagonismo de hongos y bacterias fitopatógenas (Suárez-Moreno, 2012). Las bacterias de este género muestran una gran versatilidad ecológica probablemente debida a sus grandes genomas, los cuales están frecuentemente conformados por varios replicones (2-4 cromosomas circulares y algunos presentan plásmidos de gran tamaño).

**Fig. 1. Árbol filogenético de *Burkholderia* sensu lato.** Árbol filogenético construido mediante el método de neighbor-join empleando secuencias del gen 16S ARNr de las cepas representativas de *Burkholderia* sensu lato. (Tomado de Manna, 2019).



Este género presenta una gran variabilidad, tan sólo los genomas que han sido secuenciados varían desde 4.7 hasta 9 Mb (Wigley, 2000). Se ha sugerido que las secuencias de inserción presentes en los genomas podrían ser un factor importante para la plasticidad de los mismos (Miché, 2001). La enorme diversidad genética en este grupo de bacterias también se ve reflejada en la notable heterogeneidad de productos extracelulares secretados por ellas, entre estos productos se encuentran enzimas extracelulares, toxinas, sideróforos, antibióticos, sustancias antimicrobianas, y fitohormonas (Vial, 2007). Estas características le confieren a *Burkholderia* un alto potencial para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios.

Existen diversos reportes de diferentes especies de *Burkholderia* capaces de producir compuestos antagónicos, entre los más importantes se encuentra la pirrolnitrina producida por *B. cepacia* B37w. Ese compuesto es un agente antifúngico que ha sido utilizado para combatir infecciones por hongos oportunistas en pacientes humanos (Burkhead, 1994). La xilocadina otro potente antifúngico contra hongos patógenos (como *Candida sp.*) es producida por *B. pyrrocinia* ATCC 39277 y por *B. cepacia* AF2001 (Bisacchi, 1987; Lee, 1994). Estos ejemplos muestran claramente el alto valor de los metabolitos secundarios producidos por este grupo de bacterias.

## **1.2. *Burkholderia gladioli***

### **1.2.1 PATOGENICIDAD DE *B. gladioli* EN HUMANOS**

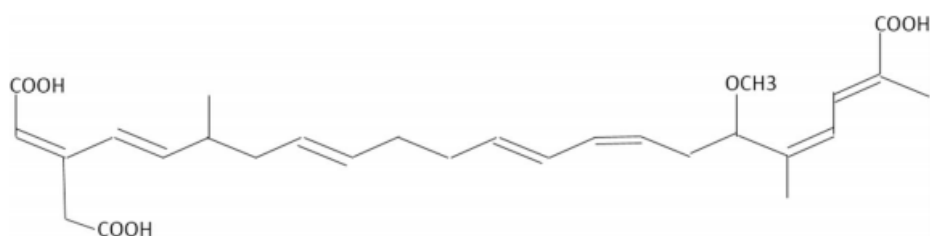
*Burkholderia gladioli* es una bacteria oportunista que causa infecciones en tracto respiratorio en pacientes inmunocomprometidos, pacientes con fibrosis quística (FC) y pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) (Ross, 1995; Kennedy, 2007; Segonds, 2009; Imataki, 2014). También existen reportes de casos clínicos de pacientes con queratitis y ulcera corneal provocada por la infección de este microorganismo (Lestin, 2008). Así mismo, en neonatos prematuros sin antecedentes de EGC o FC se ha reportado bacteriemia y sepsis producida por *B. gladioli* (Zhou, 2015; Dursun, 2012).

### 1.2.2. EL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE *Burkholderia gladioli*.

Existen diversos reportes de cepas no-patogénicas aisladas de plantas y de origen ambiental, algunas de ellas son capaces de inhibir hongos y bacterias. Entre estas cepas se encuentran: *B. gladioli* (*Pseudomonas antimicrobica*) LMG 18920 aislada de un homóptero, la cual es capaz de inhibir a un amplio rango de hongos y bacterias debido a la secreción de compuestos inhibitorios que aún no han sido identificados (Coenye, 2000). *B. gladioli* OR1 aislada de suelo, se ha reportado que produce al menos tres compuestos antibacterianos y dos antifúngicos, los cuales pueden inhibir a microorganismos patógenos multiresistentes a antibióticos (Bharti, 2012). Recientemente se ha reportado que *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* ICMP 11096 (fitopatógeno de hongos comestibles) aislada de *Agaricus bitorquis* exhibe actividad inhibitoria contra diversos hongos fitopatógenos, y se ha propuesto que la producción de un compuesto orgánico volátil (VOC) identificado como 1-metil-4-(1-metileténil)-ciclohexano (el cual es un terpeno cíclico) es el responsable de la inhibición de diversos hongos fitopatógenos. Adicionalmente esta bacteria es capaz de producir enzimas líticas, las cuales son utilizadas por la bacteria para antagonizar a los hongos fitopatógenos (Elshafie, 2012).

Actualmente se conoce que varios genotipos de *B. gladioli* sintetizan diversas moléculas con diferentes mecanismos antagónicos, dentro de estos compuestos se encuentra el ácido Bongkrékico (AB) (Fig. 2) (Moebius, 2012). El AB fue uno de los primeros metabolitos secundarios descrito en esta bacteria, es considerado una toxina letal para humanos y se ha detectado mayoritariamente por la ingestión de alimentos fermentados a base de coco contaminados con *B. gladioli* pv. *cocovenenans* (Moebius, 2012; Ross, 2014; Anwar, 2017). En humanos las intoxicaciones por AB llegan a ser letales y los países más afectados son Indonesia, China y Mozambique (Anwar, 2017; Samo, 2018). El mecanismo de acción del AB es a través del bloqueo de los transportadores mitocondriales de adenina (ANT por sus siglas del inglés interrumpiendo la respiración celular y provocando diversos síntomas en las personas intoxicadas que pueden desencadenar la muerte en casos severos (Henderson, 1970). El AB sintetizado por *B. gladioli* pv. *cocovenenans* HKI 10521 tiene

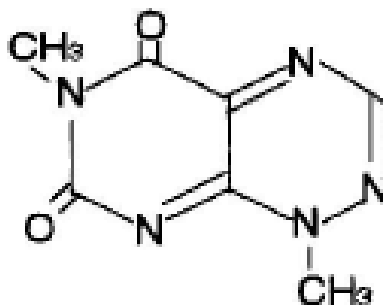
propiedades fungicidas en contra del hongo y se ha observado que en cocultivos hongo-bacteria, *B. gladioli* incrementa al 100% su producción de este metabolito antimicrobiano implicando una elevada síntesis de la toxina durante los procesos fermentativos (Ross, 2014). Otros hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* también son inhibidos por el AB (Subik, 1994). El AB es un ácido tricarbónico ramificado e insaturado resistente al calor, es incoloro, no presenta olor y no afecta las propiedades organolépticas de los productos alimentarios por lo cual es difícil de detectar (Anwar, 2017; Moebius, 2012). Los elementos genéticos involucrados en la biosíntesis de AB ya han sido caracterizados, el AB se sintetiza por policétido sintasas que se encuentran codificadas en una región de aproximadamente 64 Kpb (Moebius, 2012).



**Fig. 2. Estructura química del ácido bongkrékico.** Tomado de Anwar, 2017.

La toxoflavina, es una molécula con propiedades antibacterianas que pertenece al grupo de las azapteridinas y que fue descrita inicialmente en la bacteria bongkrek que actualmente está clasificada y nombrada como *B. gladioli patovar cocovenenas* (Fig. 3) (van Veen, 1934; Latusan, 1961). Esta es una molécula tóxica para plantas, animales, hongos y bacterias ya que su mecanismo de acción involucra su participación como transportadora de electrones entre NADH y oxígeno produciendo peróxido de hidrógeno con subsecuente toxicidad relacionada a la formación de radicales libres (Latusan, 1961; Nagamatsu, 2001). La toxoflavina la cual se caracteriza por tener un color amarillo y es producida por *Pseudomonas protegens* Pf-5, *Burkholderia gladioli* y *Burkholderia glumae* (Kim, 2004; Kim, 2014; Philmus, 2015). En *B. glumae* la toxoflavina desempeña una función importante como factor de virulencia en infecciones a cultivos de arroz, tomate, sésamo, albahaca o perilla,

berenjena y pimiento picante (Jeong, 2003; Kim, 2004; Suzuki, 2004). En *B. gladioli* la toxoflavina también es un importante factor de virulencia para infecciones en cultivos de arroz de Corea y Estados Unidos de America (Fory, 2014; Nandakumar, 2009).



**Fig. 3. Estructura química de la Toxoflavina.** Tomado de Suzuki, 2004.

Las enaciloxinas son antibióticos de amplio espectro con estructura química de tipo poliénico descubiertas por vez primera en *Gluconobacter* sp. W-315, su mecanismo de acción se da por la unión al factor de elongación Tu ribosomal bloqueando la síntesis de proteínas (Watenabe, 1990; Parmeggiani, 2006). Una isla genómica de 87.4 Kpb con un contenido de GC de 71.5% que alberga más de treinta genes para la biosíntesis de enaciloxina IIa e Isoenaciloxina IIa a través de Policétido sintasas (PKS.- Polyketide synthase, de su nombre en inglés) fue identificada en *Burkholderia ambifaria* AMMD. Esta bacteria pertenece al complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) y las enaciloxinas que ella produce inhiben a *B. multivorans*, *B. dolosa* y *A. baumannii*. Estas bacterias son multidrogo resistentes y han sido aisladas de infecciones en las vías respiratorias en pacientes con Fibrosis Quística (Mahenthalingam, 2011). Los genes para la biosíntesis de enaciloxinas fueron identificados en el genoma de *B. gladioli* pv. *cocovenenas* HKI 10521. Esta bacteria es capaz de sintetizar enaciloxina IIIa y su análogo isoenaciloxina IIIa bajo condiciones semejantes a las empleadas en los procesos de fermentación donde el oxígeno es severamente reducido, también es capaz de producir títulos altos del antibiótico (1-2 mg/l) en cocultivo *B. gladioli* pv. *cocovenenas*-*R. microsporus*. Las enaciloxinas producidas por

este microorganismo presentan actividad inhibitoria en contra de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Fig. 4) (Ross, 2014a).

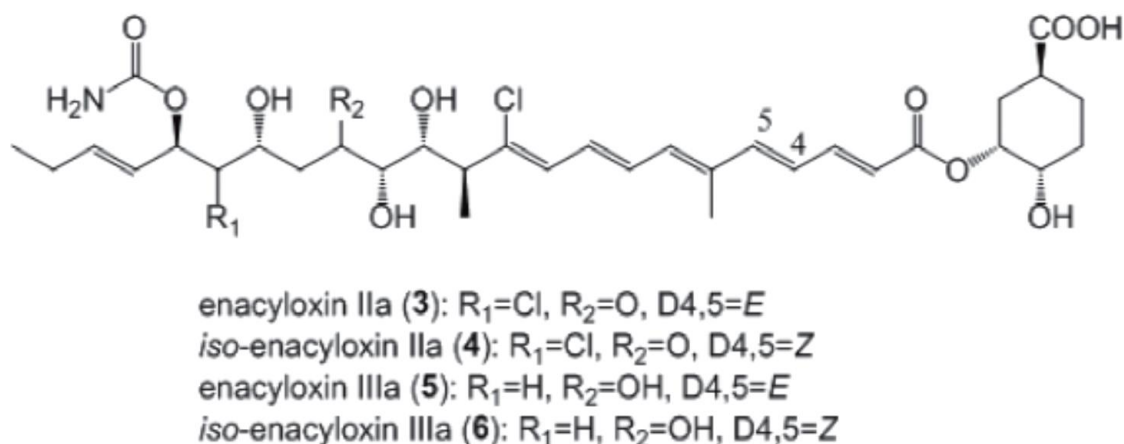


Fig. 4. Estructura química general de Enacyloxina y sus derivados. Tomado de Ross, 2014.

De una muestra de esputo proveniente de un niño de USA con Fibrosis Quística se aisló la cepa BCC0238 de *B. gladioli* la cual tiene la capacidad de producir un metabolito secundario llamado gladiolina con propiedades antibióticas en contra de algunos aislados resistentes a antibióticos del patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 5) (Song, 2017). La gladiolina tiene una estructura química muy parecida al antibiótico de tipo macrólido etnangien sintetizado por la mixobacteria *Sorangium cellulosum* y el mecanismo de acción reportado para ambos metabolitos secundarios es por la inhibición de la RNA polimerasa (Song, 2017; Irschik, 2007; Menche, 2008). Una región 129 kpb en el cromosoma dos de la cepa BCC0238 codifica varios genes relacionados con la síntesis de gladiolina. Entre ellos, los genes *gbd1-D6* que codifican subunidades para la síntesis de gladiolina a través de trans-AT PKS (AT.- acil transferasas; PKS.- policétido sintasas) (Song, 2017).

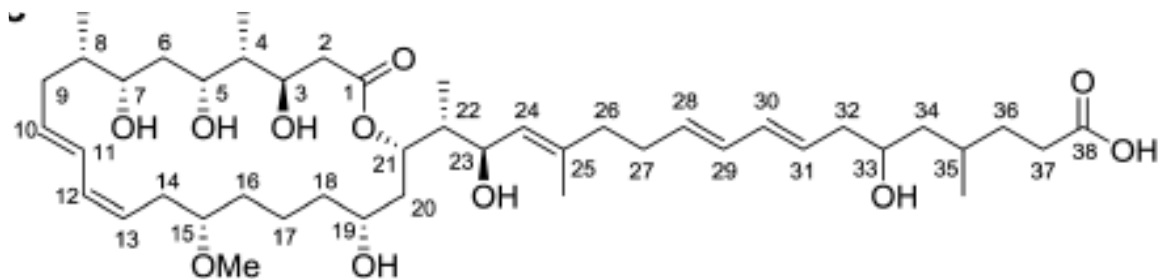


Fig. 5. Estructura química general de Gladiolina. Tomado de Song, 2017.

Otro antibiótico nombrado como Icosalide A1 y producido por sintasas pépticas no ribosomales (NRPS de sus siglas del inglés) con actividad antimicrobiana en contra de *Streptococcus pyogenes* y otras bacterias de interés médico ha sido reportado en *B. gladioli* BCC0238 (Fig. 6) (Jenner, 2019). El gen *icoA* con un tamaño de 15 kb codifica para una sintasa de péptica no ribosomal este gen se encuentra localizado en el cromosoma dos de la cepa BCC0238 y su detección por PCR fue positiva para las cepas *B. gladioli* BCC0252, BCC1677, BCC1698 y BCC1720 en las cuales también se detectó la producción de icosalide A1. La cepa BCC1713 de *B. gladioli* no presentó producción del antibiótico ni amplificación del gen *icoA* (Jenner, 2019).

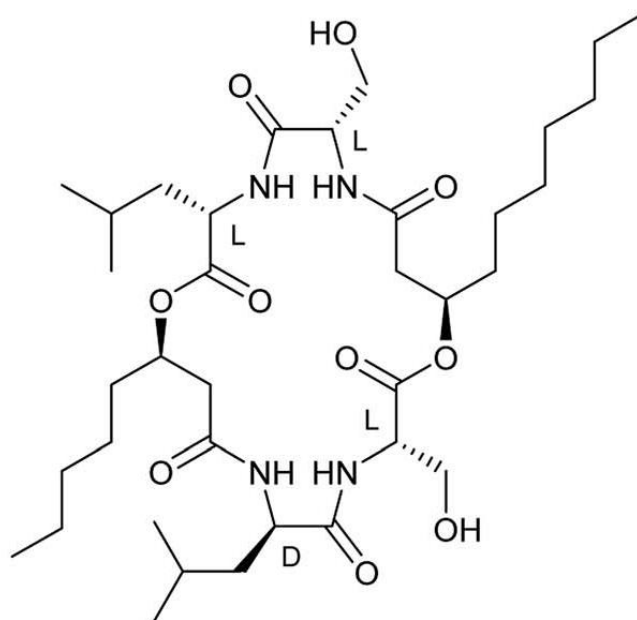


Fig. 6. Estructura química general de Icosalide A1. Tomado de Jenner, 2019.

En años recientes se ha reportado la capacidad de *Burkholderia gladioli* como simbiote de escarabajos de la especie *Lagria villosa* y *Lagria hirta* (Flórez, 2017a; 2017b; 2018). Se ha demostrado que la cepa no cultivable Lv-StB de *B. gladioli* favorece la eliminación de hongos patógenos que infectan a los huevos de *Lagria villosa* cuando se encuentran sobre el suelo a través de la producción del compuesto antimicrobiano lagriamide, un antifúngico de amplio espectro que proporciona una fuerte medida de seguridad para la descendencia de *Lagria villosa* (Fig. 7) (Flórez, 2018).

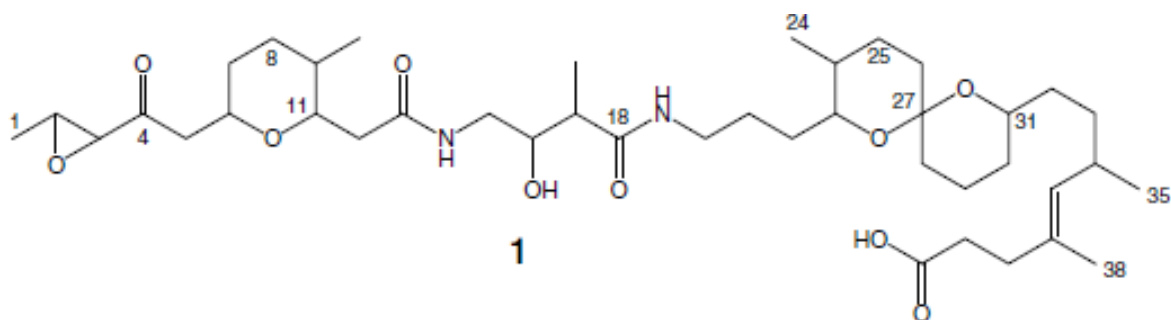
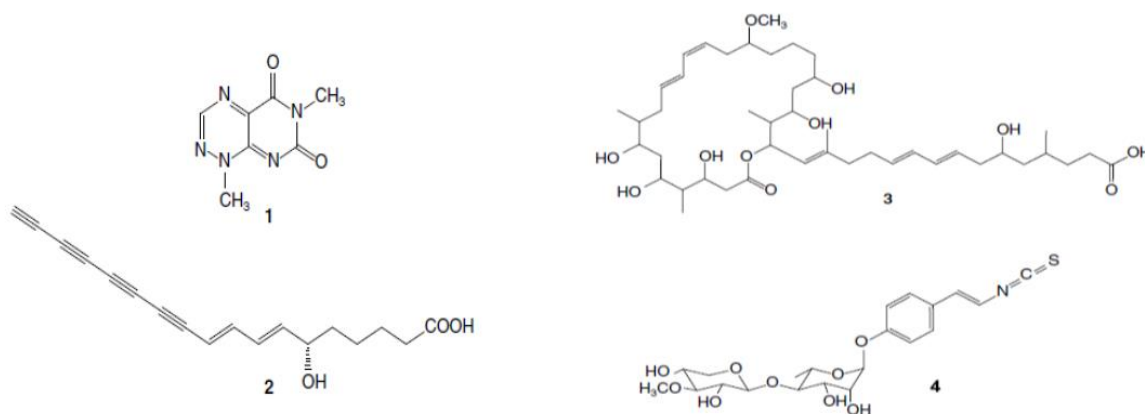


Fig. 7. Estructura química de lagriamide. Tomado de Flórez, 2018.

Flórez y col. 2017 describieron la asociación simbiótica entre *B. gladioli* y escarabajos herbívoros de la subfamilia Lagriinae en específico la cepa Lv-StA de *B. gladioli* la cual fue aislada del escarabajo conocido como vaquita dorada *Lagria villosa* que afecta cultivos de soya en Sudamérica. El simbiote bacteriano se encuentra habitando de forma extracelular las glándulas accesorias conectadas al sistema reproductivo de las hembras del escarabajo de donde la bacteria es transmitida verticalmente a los huevos confiriéndoles protección contra el hongo entomopatógeno *Purpureocillium lilacinum* (anteriormente *Paecilomyces lilacinus*). Por medio de la producción de compuestos antifúngicos, *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* también fueron inhibidos *in vivo* (Flórez, 2017b). Se han detectado cuatro metabolitos secundarios *in vitro* producidos por la cepa Lv-StA dos con actividad antibacteriana y dos con actividad antifúngica. Los antibacterianos son toxoflavina y lagriene que actúan en contra de *Brevibacillus laterosporus* y *Bacillus thuringensis*, respectivamente. Los antifúngicos son caryoynencin y sinapigladioside en contra de *P. lilacinum*. En experimentos *in vivo* sólo se detectaron tres compuestos toxoflavina, lagriene

y sinapegladioside, de acuerdo a los investigadores estos compuestos le proporcionan defensa a los escarabajos en contra de hongos entomopatógenos y bacterias patógenas potenciales (Fig. 8) (Flórez, 2017b). La secuenciación y análisis del genoma de la cepa Lv-StA de *B. gladioli* reveló la presencia de los genes de biosíntesis para toxoflavina y caryoynencin descritos en los modelos de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia caryophylli* respectivamente (Flórez, 2017b; Suzuki, 2004; Ross, 2014). Los genes relacionados a la síntesis de etnangien en *Sorangium cellulosum* fueron propuestos por los autores como los responsables de la biosíntesis lagriene pero no aportaron evidencia experimental que respaldara su hipótesis (Flórez, 2017b; Menche, 2008).



**Fig. 8. Estructura química de los antimicrobianos producidos por *B. gladioli* Lv. StA. 1) Toxoflavina; 2) Caryoynecina; 3) Lagriene; 4) sinapegladioside. Tomado de Flórez, 2017b.**

La cepa NGJ1 es otro genotipo de *B. gladioli* que presenta actividad antimicrobiana contra diversos hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe oryzae*, *Venturia inaequalis* y *Fusarium oxysporum* entre otros (Jha, 2015). Parte de la actividad antifúngica de *B. gladioli* NGJ1 es debida a su comportamiento como micófago de *R. solani* y otros hongos a través de una proteína efectora parecida a la cola de un profago. Esta proteína está codificada en el gen Bg\_9562 y es translocada al interior del micelio del hongo por el sistema de secreción tipo III donde impide la germinación del hongo. Aparentemente *B. gladioli* NGJ1 resulta beneficiada al disponer de los productos de degradación del micelio del hongo (Swain, 2017; Kumar, 2018).

Para concluir este apartado se conoce que *B. gladioli* 3A12 (endófito de semilla de maíz de la variedad Chapalote) tiene la capacidad de desplazarse por movimiento tipo swarming dependiente de flagelo hacia el hongo fitopatógeno *Sclerotinia homoeocarpa* adhiriéndose y formando microcolonias mediante biofilm para posteriormente eliminar al hongo mediante destrucción de su micelio por mecanismos aún no esclarecidos (Shehata, 2017).

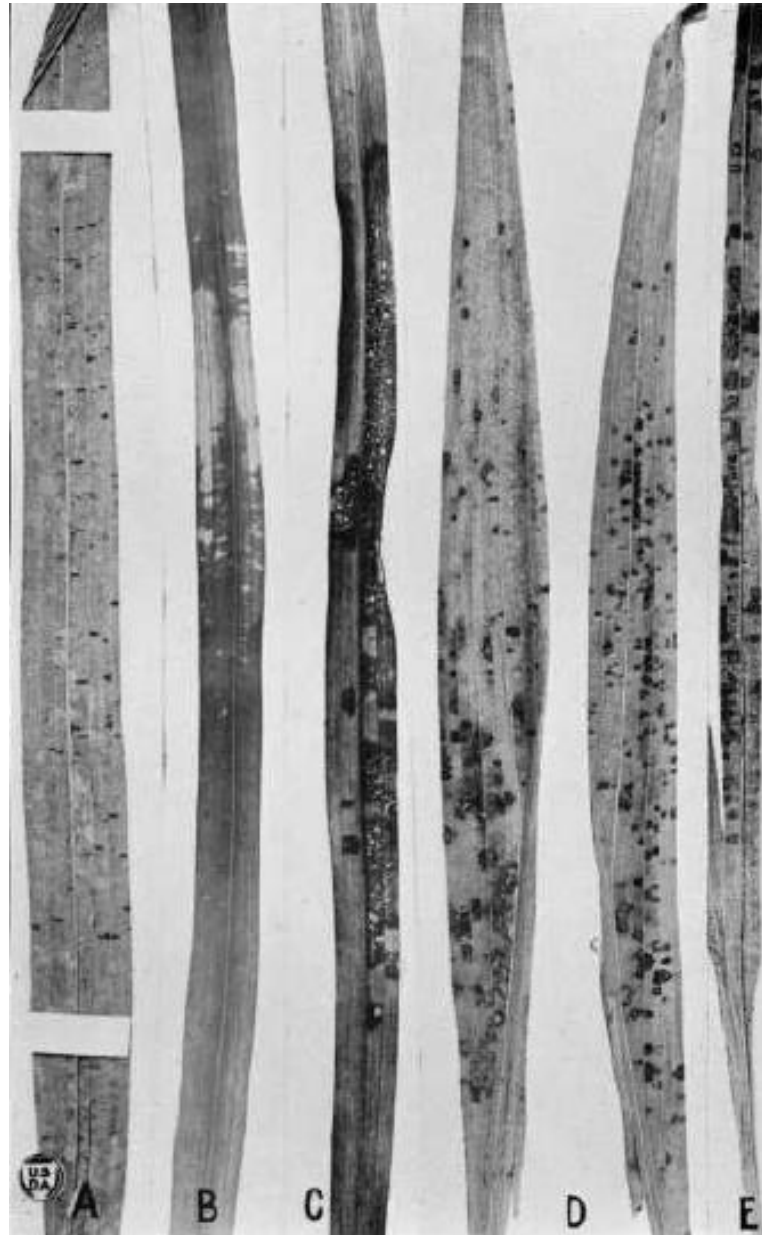
### **1.2.3 *Burkholderia gladioli* Y SU RELACIÓN CON PLANTAS**

*B. gladioli* es un importante patógeno de plantas. McCulloch en 1924 reportó por primera vez la patogenicidad de *B. gladioli* en gladiolas en las cuales la bacteria produjo serias lesiones en las hojas (Leaf blight) afectando el desarrollo de los cormos de gladiola (Fig. 9) (McCulloch, 1924). Los géneros de orquídeas *Dendrobium*, *Oncidium*, y *Miltonia* spp. e híbridos son otros hospederos en los que *B. gladioli* produce patogenicidad provocando manchas en las hojas de tamaño variable con o sin presencia de mancha acuosa en las lesiones (water-soaking) o pudrición blanda (soft-rot) (Keith, 2004). *B. gladioli* también se ha reportado como productora de lesiones en hojas de orquídeas del género *Cymbidium* cultivadas en Corea del Sur (Moon, 2017). El mismo patógeno se ha reportado en la pudrición en los bulbos de una planta silvestre de Bulgaria con propiedades de interés médico del género *Leucojum aestivum* (Stoyanova, 2013). En Japón se ha reportado que diferentes cepas de *B. gladioli* que producen manchas de color marrón en hojas y vainas y pudrición de los granos en plantas de arroz también fueron capaces de infectar bulbos de cebollas y hojas de orquídeas y gladiolas (Ura, 2006). Esta bacteria también produce manchas en hojas y cormos y pudrición de brotes emergentes y hojas en plantas de azafrán (*Crocus sativus*) (Fiori, 2011). Algunas de las cepas de *B. gladioli* patógenas de azafrán son capaces de producir manchas en hojas de gladiolas y azucenas o lirios, pero ninguna fue patógena para cebollas (Fiori, 2011). En la revisión de Compant y col. 2008 se reporta que *B. gladioli* es fitopatógeno de plantas como: cebolla (*Allium cepa* L.), tulipán (*Tulipa* spp.), culantrillo (*Adiantum* sp.), helechos (*Asplenium nidus* L; *Cyrtomium falcatum*; *Davallia*

*fejeensis* Hook; *Pteris ensiformis* L.; *Pellaea rotundifolia* Hook; *Pteris cretica* L.; *Platycterium bifurcatum* Cav.), azáfran (*Crocus* spp.), orquídeas (*Dendrobium* spp.), freesia (*Freesia refracta* Jacq; *Freesia x hybrida* Hort.), gladiolas (*Gladiolus x hortulanus* L.; *Gladiolus x colvillei* Sweet.), iris (*Iris* spp.), ixia maculata (*Ixia maculata* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), e iris tigre (*Tigridia pavonia*) (Compant, 2008). En México *B. gladioli* ha sido asociada a enfermedades en plantíos de maíz comercial Asgrow-7573 cultivados en el estado de Veracruz (Gijon-Hernandez 2011). Los síntomas en la planta de maíz provocados por la bacteria van desde manchas acuosas en las hojas hasta pudrición de la corona del tallo y de las hojas, así como mazorcas con base necrótica y sin desarrollo (Gijon-Hernandez, 2011). Bulbos de cebolla blanca cultivadas en Zacatecas y almacenadas en instalaciones en Sinaloa, México presentaron la enfermedad piel resbaladiza (slippery skin) producida por *B. gladioli* después de dos semanas de su almacenamiento (Félix-Gastélum, 2017). A la fecha se han reconocido cuatro patovares de *B. gladioli*: *B. gladioli* pv. *gladioli* (Bgg) patógeno de gladiolas y otras flores (Yabuuchi, 1992; Young, 1978); *B. gladioli* pv. *alliicola* produce enfermedad en bulbos de cebolla (Young, 1978); *B. gladioli* pv. *agaricicola* (Bga) infecta y produce pudrición blanda en champiñones comerciales (Lincoln, 1991); y *B. gladioli* pv. *cocovenenans* (Jiao, 2003).

**Fig. 9. Lesiones producidas por *B. gladioli* en hojas de gladiola.**

- A.- Fase temprana del blight bacteriano, muestra manchas de agua (wáter-soaked) y lesiones horizontales. Infección natural. Xi.
  - B.- Inoculación artificial fotografía tomada después de 18 días de inoculación. Xi.
  - C.- Inoculación artificial, muestra exudado en las lesiones secas. Xi- A, B y C son hojas de plantas jóvenes (seedling plants).
  - D.- Hojas de plantas florecientes (var. Schwaben) muestran la apariencia general en campo. Infección natural. X1/2.
  - E.- Hojas de plantas jóvenes (var. Schwaben). Infección natural. Xi
- Tomado de McCulloch, 1924.



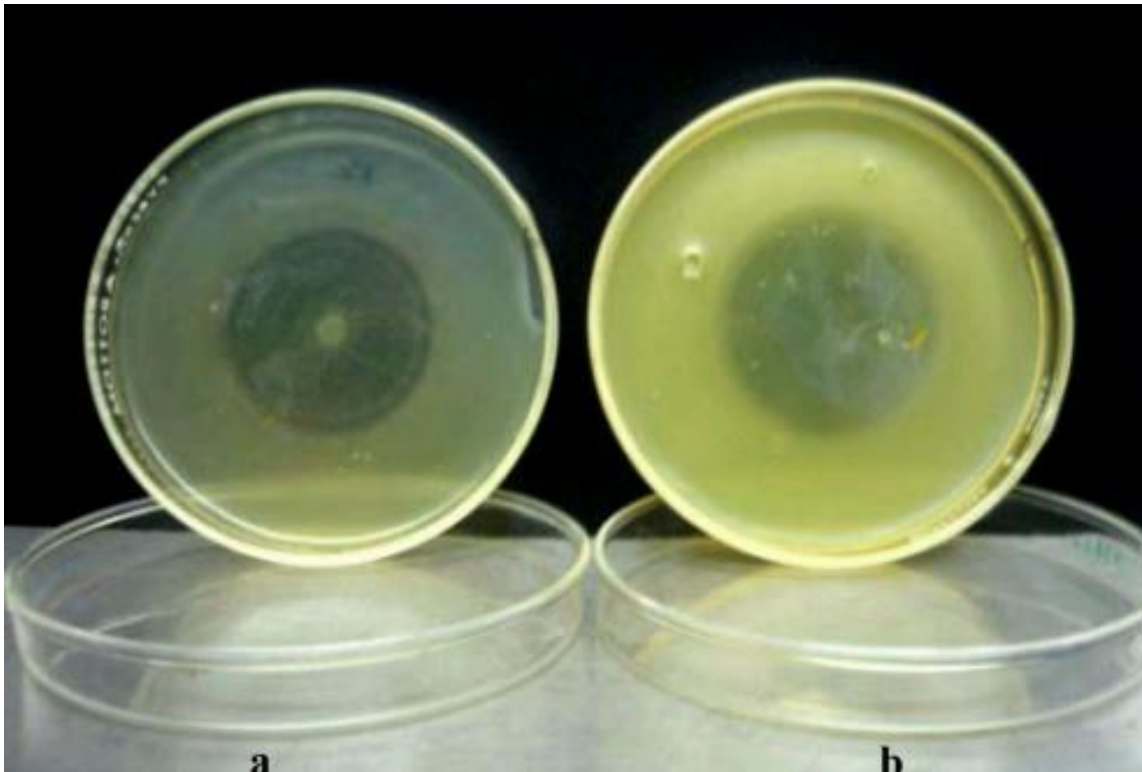
Existen algunos reportes acerca de los factores de virulencia de *B. gladioli*. La pudrición blanda en champiñones comerciales en Japón, Europa y Nueva Zelanda es producida por *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* (Gill, 1997; Chowdhury, 2006). Se sabe que el sistema de secreción tipo II de *Bga* desempeña una función importante en su capacidad para secretar quitinasas y proteasas (factores de virulencia) que podrían estar relacionadas a la degradación del tejido de los champiñones (*Agaricus bitorquis*) y la

consecuente expresión de la enfermedad de la cavidad (cavity disease) en el hospedero (Chowdhury, 2006). Cuatro cepas de *Bga* producen tres enzimas hidrolíticas (proteasa, quitinasa y gluconasa) además producen hemólisis a la membrana de eritrocitos bovinos por mecanismos desconocidos (Elshafie, 2017). *Burkholderia gladioli* ocasiona la enfermedad en plantas de arroz denominada Añublo bacteriano de la panícula (Bacterial panicle blight) la cual se ha reportado en EE.UU., Japón, China, Filipinas y Panamá (Ura, 2006; Nandakumur, 2009; Mulaw, 2018; Cottyn, 2001, 2001; Mirghasempour, 2018). Se ha reportado que *B. gladioli* produce la fitotoxina toxoflavina un importante factor de virulencia en sus procesos de infección en plantas de arroz y bulbos de cebolla (Lee, 2016). Cepas de *Bgg* y *Bga* producen toxoflavina *in vitro* (Iiyama, 1998). Se ha comprobado que la aplicación de toxoflavina pura produce daños en hojas de gladiolas y orquídeas (*Dendrobium* y *cymbidium*), en bulbos de cebolla y plantas de arroz, pero no en tubérculos de papa (Iiyama, 1998). Kaczynski y col. 2006 identificaron un exopolisacárido (EPS) capsular putativo de *Bga*. Al parecer se trata de un polímero lineal con unidades repetidas de tetrasacárido con ramnosa en su composición, el EPS podría participar en la interacción planta-bacteria (Kaczynski, 2006). En *B. gladioli* pv. *cocovenenans* se ha caracterizado la cadena O de su lipopolisacárido (LPS) el cual contiene residuos de azúcar metilados, el polisacárido está conformado por dos unidades de tetrasacáridos  $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Rha-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Aco-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Rha-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Gal2Me-(1}\rightarrow ]_n$  y  $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Rha-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Aco-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Rha-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow ]_n$  (Rha: L-ramnosa; Aco: L-Acofriososa; Gal2Me: 2-O-metil-D-galactosa) el antígeno O podría estar relacionado con la modificación de la respuesta inmune en su hospedero (De Felice, 2016). En la revisión de Knirel y col. 2011 se reportan las estructuras del antígeno O de los LPS para *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli* pv. *agaricicola* y *B. gladioli* pv. *alliicola* (Knirel, 2011). Se desconoce la participación de los EPS y LPS en las interacciones planta-bacteria. A partir de análisis bioinformáticos se sabe que *B. gladioli* posee genes relacionados al sistema de secreción tipo VI, un factor de virulencia importante en la entrega de efectores tóxicos a sus hospederos (Nguyen, 2018). En otros estudios además del sistema de secreción tipo VI se han reportado genes relacionados a la síntesis de

toxoflavina, genes de producción de lipasas y genes para efectores tipo III (type III effectors) (Fory, 2014; Seo, 2015).

Algunas cepas de *Burkholderia gladioli* también muestran aptitudes benevolentes hacia las plantas. Su potencial como agente de biocontrol es uno de los rasgos más distintivos de este microorganismo. Entre otros ejemplos, se conoce que *B. gladioli* UAPS07070 endófito de un fruto de piña muestra potencial como agente de biocontrol para el patógeno de piña *Tatumella ptyseos* (Fig. 10) (Marín-Cevada, 2012; Marín-Cevada, 2016). Otra cepa de esta bacteria que es endófito del grano de maíz denominado Chapalote también es considerado como un potencial agente de biocontrol para varios hongos fitopatógenos (Rioux, 2014; Shehata, 2017). Scuderi y col. 2009 han reportado que algunas cepas de *B. gladioli* recuperadas de la flor ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) tienen potencial antagonico contra hongos patógenos que afectan manzanas y cítricos postcosecha (Scuderi, 2009). Se ha reportado que *Bga* reduce la enfermedad en el cultivo de tomate causada por el hongo *Verticillium dahliae* (Elshafie, 2017). Un aislado de *B. gladioli* recuperado de la rizósfera de una planta de espinaca silvestre es un candidato a agente de biocontrol para suprimir al hongo *Pythium ultimum* que causa pudrición húmeda en el fruto de pepino (Bae, 2007). Un aislado de *B. gladioli* del insecto *Planococcoides njalensis* muestra poder de inhibición hacia bacterias y hongos fitopatógenos (Attafuah, 1989; Walker, 1996). La capacidad quitinolítica de aislados de la rizosfera de maíz criollo identificados como *B. gladioli* fue relacionada con su capacidad para degradar el micelio de diferentes hongos fitopatógenos y con la disminución del porcentaje de infección provocado por hongos fitopatógenos en semillas de maíz (Medina-de la Rosa, 2016). Una cepa de *B. gladioli* recuperada de la raíz de una planta de maíz (*Zea mays*) además de exhibir propiedades de biocontrol ha demostrado su capacidad como rizobacteria promotora de crecimiento de plantas (PGPR; de sus siglas del inglés) ya que tiene la capacidad de producir hormonas vegetales (ácido indol acético y giberelinas), es capaz de solubilizar fosfatos, producir amonio y cianuro de hidrógeno, también incrementa la longitud de la raíz y aumenta la germinación de semillas de maíz (Gunjal, 2015). *B. gladioli* tiene la capacidad de solubilizar fosfatos aumentando la disponibilidad de éstos para la planta de sábila (*Aloe*

*barbadensis*) la cual presenta mayor biomasa e incremento en la producción de Aloína (laxante) (Gupta, 2012). La producción de metabolitos secundarios (edulcorantes: esteviósido y rebaudiósido A) producidos por la planta de estevia (*Stevia rebaudiana*) fue incrementada por la solubilización de fosfatos por *B. gladioli* (Mamta, 2010). Otras cepas de *B. gladioli* con potencial uso como biofertilizantes han sido aisladas de la rizosfera de Magüey espadín (*Agave angustifolia* Haw.) han exhibido capacidad solubilizar fosfatos, producir ácidos orgánicos y fitohormonas (ácido indol-3-acético y giberelinas) (Martínez-Gallegos, 2018). En Brasil recientemente se ha reportado la capacidad de fijación biológica de nitrógeno en varios aislados endófitos de azúcar de caña (Barros, 2018). Para concluir este tema, se sabe que los exopolisacáridos purificados de *B. gladioli* cepa IN26 provocan resistencia sistémica inducida (ISR) en semillas de pepino en contra del hongo *Colletotrichum orbiculare* que le produce antracnosis (Kyungseok, 2008).



**Fig. 10.** Actividad antagonística de *B. gladioli* en medio sólido contra *T. tyseos*. Tomado de Marín-Cevada, 2016.

#### 1.2.4. OTRAS APLICACIONES DE *Burkholderi gladioli*

Independiente a su fuerte potencial antimicrobiano la cepa *B. gladioli* Coa14 ha mostrado crecer en medios de cultivo con petróleo crudo como única fuente de carbono y la secuencia de su genoma ha revelado la presencia de la vía clásica de degradación de n-alcenos convirtiendo a esta cepa en un importante modelo de estudio para la mejor comprensión de microorganismos en su adaptación a ambientes contaminados con hidrocarburos (Lopes, 2018). En China se ha reportado que dos cepas de *B. gladioli* son capaces de degradar compuestos insecticidas organofosforados, conocidos como profenofos, de suelos contaminados (Malghani, 2009). Se ha reportado que *B. gladioli* disminuye el estrés producido por Cadmio (metal pesado) a ciertas variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* y *Solanum lycopersicum*) (Khanna, 2019a, 2019b). Aparentemente los microorganismos favorecen la inmovilización del metal en las raíces por medio de la formación de complejos quelantes que impiden que el metal ingrese a los brotes y se acumule en las plantas esto favorece un mejor desarrollo de las plantas y alivia su estrés al cadmio (Khanna, 2019a, 2019b). Recientemente se descubrió una lipasa alcalina con potencial aplicación en la industria alimentaria, producción de detergentes y biodisel producida por *Burkholderia gladioli* Bps-1 aislada de una cebolla putrefacta de supermercados de China (Zhu, 2019).

## 2. ANTECEDENTES

*Pink disease* es una enfermedad asintomática que afecta a los frutos frescos de Piña, ocasionando grandes pérdidas económicas en la industria de procesado y enlatado a nivel mundial, esta enfermedad se caracteriza por la aparición de un pigmento rojo-café el cual provoca un cambio de coloración en los productos de piña después de procesarlos a altas temperaturas. El pigmento producido por un solo fruto infectado puede difundir hacia los frutos sanos dañando la producción de cientos de piñas saludables (Kado, 2003). En el año 2006 Marín-Cevada identificó a *Tatumella tyseos* como un nuevo agente causal de *Pink disease* en cultivos mexicanos de piña (Marín-Cevada, 2006). De sus investigaciones en las interacciones antagónicas entre bacterias nativas de piña contra *T. tyseos* identificó a una bacteria antagónica con un alto potencial como agente de biocontrol, la cepa fue nombrada como *Burkholderia gladioli* UAPS07070. Esta bacteria fue recuperada de la zona endófitas de varios frutos de piña que no presentaban la enfermedad *Pink disease* y su ubicación taxonómica se realizó a partir de pruebas bioquímicas y secuenciación del gen codificante del 16S rRNA, UAPS07070 tiene la capacidad de inhibir *in vitro* e *in planta* a *T. tyseos*, además cuando es coinoculada en jugo de piña con este fitopatógeno puede disminuir la pigmentación característica de *pink disease* después de 12 h de incubación a través de un mecanismo aún desconocido. En experimentos *in vitro* UAPS07070 ha exhibido antagonismo contra un amplio rango de bacterias y hongos, por lo cual se cree que la posible sustancia antagónica producida por este microorganismo sea una bacteriocina (Marín-Cevada, 2010). En el 2013 se construyó una banca de mutantes al azar de UAPS07070 con el propósito de identificar el cluster biosintético de la sustancia antagónica producida por esta bacteria. En el screening de 2000 mutantes se encontró que tres de ellas pierden parcialmente su potencial antagónico. Algunos de los genes afectados en estas mutantes aún están en proceso de identificación (Seynos, 2013). En ese mismo año Pedraza diseñó una estrategia basada en análisis bioinformático por medio de un programa que compara conjuntos de secuencias con los genomas. En una búsqueda comparativa de 4000 proteínas que están relacionadas en la producción de bacteriocinas pertenecientes a

diversos géneros bacterianos y con el propósito de detectar clusters de bacteriocinas potenciales en 32 genomas de 19 especies del género *Burkholderia*, se encontraron 73 *loci* dentro de estos genomas. En particular, el genoma de *B. gladioli* BSR3 presenta dos *clusters* putativos para bacteriocinas, hasta la fecha no existe evidencia experimental documentada que soporte esta hipótesis. Por otro lado, en ensayos de inhibición *in vitro* utilizando 20 cepas de 14 especies del género *Burkholderia* *sensu lato* se encontró que *B. gladioli* UAPS07070 muestra un alto grado de inhibición contra más de la mitad de las cepas (Comunicación personal Yagul Pedraza, 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de pesticidas químicos utilizados para erradicar microorganismos patógenos de cultivos se ha convertido en un problema emergente por su gran capacidad de contaminación del ambiente y su alta toxicidad para el hombre. Debido a estos efectos secundarios, se ha propuesto al control biológico como una alternativa. En la búsqueda de microorganismos antagonistas contra *T. tyseos* al agente causal de la enfermedad *Pink disease* de piña se detectó a *B. gladioli* UAPS07070 como un agente potencial de biocontrol. Por ensayos *in vitro* y extracción por HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia, por sus siglas del inglés) se dedujo que esta bacteria produce uno o varios metabolitos capaces de inhibir a una amplia variedad de microorganismos, los compuestos aún no han sido purificados y caracterizados.

A la fecha no se conocen las vías involucradas en el efecto antagónico producido por *B. gladioli* hacia otros microorganismos. De ahí el interés de iniciar el conocimiento a nivel molecular de la síntesis y caracterización del compuesto.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Identificar causas posibles del efecto antagónico de *B. gladioli* UAPS07070 en contra de otros microorganismos.

##### **4.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Seleccionar mutantes de *B. gladioli* UAPS07070 afectadas en su capacidad antagónica en contra de diferentes microorganismos.
- Identificar las regiones implicadas en la alteración de la capacidad antagónica de *B. gladioli* UAPS07070.
- Elaborar un modelo que explique las interacciones y participación de los genes detectados por el evento de transposición y relacionados con en el efecto antagónico de *B. gladioli* UAPS07070.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Rastreo y selección de mutantes con actividades antimicrobianas disminuidas.

Alrededor de 3000 mutantes generadas al azar de *B. gladioli* fueron evaluadas en busca de la pérdida completa o parcial de su capacidad antagónica en contra de una cepa sensible (*Acinetobacter* sp. UAPS0169). Los ensayos se llevaron a cabo como se describe a continuación: Las mutantes se cultivaron en caldo LB bajo agitación durante 24 h a 30 °C, posteriormente 20 µl del cultivo de las mutantes de *B. gladioli* fueron colocados en gota sobre la superficie de una placa de agar LB, las placas de agar LB fueron cultivadas por 24 h a 30 °C, después de concluido el tiempo de incubación se colocaron 20 µl de cultivo en fase estacionaria de *Acinetobacter* sp. UAPS0169. Las gotas de la cepa sensible fueron colocadas en la proximidad y sin hacer contacto con la colonia de células de las mutantes de *B. gladioli*. Ambas bacterias se incubaron por 24 h a 30 °C. Se consideró que una mutante había perdido capacidad antagónica si se presentaba crecimiento de la cepa sensible a menos de un centímetro del borde de la colonia mutante. Para confirmar la pérdida del fenotipo de antagonismo se empleó el ensayo de doble capa con algunas modificaciones de la metodología original descrita por Muñoz-Rojas y col. 2005. En el ensayo de doble capa, las cepas mutantes de *B. gladioli* con alteración presuntiva de antagonismo se crecieron en caldo LB hasta fase estacionaria (30 °C por 24 h). A continuación, los cultivos fueron ajustados a 0.05 a una densidad óptica de 620 nm, 6 µl de los cultivos ajustados fueron inoculados en forma de gota sobre la superficie de agar LB en caja Petri de vidrio, la incubación se realizó por 24 h a 30 °C. Posteriormente se desechó la masa celular de las mutantes de *B. gladioli* con una laminilla de vidrio estéril y los restos celulares fueron inactivados por exposición a vapores de cloroformo por una hora. Las placas Petri fueron colocadas en una campana de extracción de vapores hasta la volatilización del cloroformo. Previamente la cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169 fue cultivada y ajustada bajo las mismas condiciones que las mutantes de *B. gladioli*, 200 µl del cultivo ajustado de *Acinetobacter* sp. UAPS0169 fueron distribuidos con una varilla de vidrio estéril por toda la

superficie de la placa de LB donde previamente habían crecido las mutantes, las placas fueron incubadas por 24 h a 30 °C. Se midió diámetro de los halos de inhibición y se compararon con el correspondiente de la cepa silvestre *B. gladioli*. Se realizaron 12 repeticiones del experimento de doble capa para cada mutante y los resultados se evaluaron por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## 5.2. Aislamiento y secuenciación de los locus interrumpidos por el transposón *Himar 1*.

La localización del sitio de inserción del transposón al cromosoma en las mutantes de *B. gladioli* con actividad antagónica reducida se realizó de acuerdo a la metodología de rescate de plásmido descrita por Rholl y col. 2008. Se extrajo y purificó ADN genómico de las clonas empleando un kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega Co.). El material genético se digirió con la endonucleasa *NotI* (Thermo Fisher Scientific) y se purificó con High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche) para su posterior auto ligamiento (producir fragmentos circulares de ADN) con el Rapid DNA ligation kit (Roche). Los productos de la ligación fueron transformados en *E. coli* DH5 $\alpha$  y se realizó selección en agar LB con Kanamicina a 30  $\mu$ g/ml incubando a 37 °C. De las colonias seleccionadas se extrajo y purificó ADN con Pure Yield Plasmid Miniprep System kit (Roche). Todos los kits fueron empleados de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Se obtuvo secuencia nucleotídica de los plásmidos que contenían al transposón *Himar1* empleando oligonucleótidos específicos para el transposón 1670 (5'-TCGGGTATCGCTCTGAAGGG-3') y 1829 (5'-GCATTTAATACTAGCGACGCC-3'). La comparación de las secuencias se realizó con Blastx de NCBI ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). El porcentaje de identidad de los genes traducidos correspondientes a los ORF (marco de lectura abierta por sus siglas del inglés) de los genes interrumpidos fueron verificados con ClustalW (Thompson, 1994). Las secuencias de los genes identificados fueron depositadas en la base de datos del NCBI GenBank con número de acceso KP123645. La plataforma Interproscan

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) se empleó para buscar dominios conservados en TofI, TofR y LysR a partir de sus ORF.

### **5.3. Ensayo para la detección de N-acil homoserina lactonas**

La detección de N-acil homoserina lactonas exógenas producidas por *B. gladioli* UAPS07070 y sus mutantes derivadas por la inserción del transposón *Himar 1* se realizó mediante la cepa reportera de quorum sensing *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan, 1997). En este experimento la cepa reportera restaura su capacidad para producir un compuesto de color violeta llamado violaceína en presencia de N-acil homoserina lactonas exógenas de cadena corta. Las cepas de *B. gladioli* UAPS07070, clonas derivadas y cepa reportera fueron crecidas de forma independiente en caldo LB hasta alcanzar la fase estacionaria (24 h a 30 °C). Se aplicó sobre la superficie de una placa de agar PSUC (4.2 mM ácido succínico, 1% peptona de caseína y 1.6% agar bacteriológico) un tapete de 200 µl de cultivo en fase estacionaria de *C. violaceum* CV026. La suspensión celular se secó en campana de flujo laminar. Diez microlitros de cultivo en fase estacionaria de las mutantes se aplicaron en forma de gota en diferentes puntos de la superficie del agar PSUC, se incubó por 24 h a 30 °C. Una reacción fue tomada como positiva por la presencia de un halo violeta alrededor de la colonia de células de las mutantes probadas.

### **5.4. Ensayo para la identificación de movimiento tipo Swarming**

*Burkholderia gladioli* UAPS07070 y sus mutantes derivadas con antagonismo disminuido (BG79, BG1232, BG87) fueron crecidas en caldo LB por 24 h a 30 °C, al término del tiempo de incubación las células fueron lavadas dos veces con caldo LB estéril y los cultivos bacterianos se ajustaron en un volumen de un mililitro a 0.01 de absorbancia a una densidad óptica de 620 nm. Se colocó 1 µl del cultivo ajustado en forma de gota en el centro de una placa de agar LB con baja concentración de agar (0.02% de agar) y se incubó por 48 h a 30 °C y 37 °C. Los ensayos fueron realizados con cinco réplicas. Se tomó como

movimiento de tipo Swarming positivo a las cepas que exhibieron un patrón de desplazamiento dendrítico como lo describe Hibbing y col. 2010 (Hibbing, 2010).

### **5.5. Ensayo para la cuantificación de toxoflavina**

La producción de toxoflavina se cuantificó en medio sólido. *B. gladioli* UAPS07070 y sus mutantes derivadas fueron crecidas hasta fase estacionaria en caldo LB y ajustadas a 0.05 de absorbancia a densidad óptica de 620 nm. Docientos microlitros de esta suspensión bacteriana fueron dispersados sobre toda la superficie de placas de agar LB e incubadas a 30 °C por 24 h. La masa celular fue retirada mecánicamente con un portaobjetos de vidrio y la superficie del agar fue limpiada con un hisopo estéril impregnado con etanol al 70% hasta remover las células bacterianas. Se tomó un fragmento de agar con un peso de 500 mg y se fundió dentro de un tubo de polipropileno de 1 mL a 60°C en baño maría, la solución se resuspendió en 500 µL de cloroformo, la fracción de cloroformo fue transferida a un nuevo tubo de polipropileno y el solvente fue evaporado completamente a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción de vapores. El sedimento residual fue disuelto en metanol al 80% y cuantificado por absorbancia a una densidad óptica de 393 nm como fue reportado por Chen y col. 2012 (Chen, 2012). Los resultados de seis réplicas de cada muestra fueron analizados con la prueba estadística ANOVA ( $p < 0.05$ ).

### **5.6. Análisis de la expresión del gen *toxA* a través de RT-PCR de punto final**

La transcripción del gen *toxA* (metiltransferasa en la síntesis de toxoflavina) en la cepa silvestre *B. gladioli* UAPS07070, en las mutantes derivadas afectadas en el sistema de Quorum Sensing BG1232 y BG87 y en la mutante BG79 afectada en un gen que codifica para un regulador LysR fue analizada por RT-PCR de punto final. Las cepas bacterianas fueron crecidas de forma independiente a 30 °C en caldo LB hasta fase estacionaria, para luego ajustar los cultivos bacterianos a 0.05 de absorbancia a 620 nm. Se aplicaron 30 µL de esta suspensión de bacterias en forma de gota sobre la superficie de una placa de agar LB e

incubadas por 24 h a 30 °C. La masa celular fue recuperada y disuelta en un mililitro de agua libre de ARNasas y centrifugadas a 4°C por 3 min a 8,000 x g. El método simple de fenol descrito por Atshan y col. 2012 (Atshan, 2012) fue utilizado para la extracción total del ARN como se describe a continuación: 100 µL de agua libre de ARNasa fue adicionada al pellet de células problema las cuales fueron agitadas vigorosamente por 3 min. En seguida se adicionaron 100 µL de una solución fenol ácido-cloroformo (1:1) y la mezcla fue agitada por 1 min, los tubos con la mezcla fueron incubados a 70 °C por 30 min, durante este tiempo de incubación la muestra se agitó cada 5 min. La muestra se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos, 100 µL de la fase acuosa fueron transferidos a un tubo limpio a los cuales se les adicionaron 200 µL de isopropanol. Los tubos fueron agitados vigorosamente por 3 min y centrifugados a 12,000 x g por 10 minutos, por último, el pellet de ARN fue hidratado en 25 µL de agua libre de ARNasas. La integridad del ARN fue evaluada cualitativamente por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La concentración y pureza fueron medidas en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Cuatro microgramos de ARN fueron tratados con DNaseI (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA (ADN complementario) se tomaron 2 µg de ARN libre de ADN empleando Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión del gen *toxA* fue evaluada por amplificación de PCR del fragmento de 181 pb empleando los oligonucleótidos RTP3 (5'-GTT CAG CTT CTA CCG CTG GA-3') (Suzuki, 2004) y TOXA2 (5'-TCA AGG CTT GCA GAC CAG-3') (Jenner, 2019). Un fragmento de 412 pb que corresponde a una parte del gen 16S rRNA fue amplificado como control de la expresión constitutiva con los oligonucleótidos Fwd (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA ATA C-3') y Rev (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') (Yu, 2004). Para la amplificación de ambos genes *toxA* y 16S rRNA se utilizó 1 µL de cDNA bajo las siguientes condiciones de PCR: 96 °C por 2 minutos, 30 ciclos a 96 °C por 1 min, 50 °C por 1 min para *toxA*; y para 16S rRNA, 58°C for 1 min y una extensión final a 72 °C por 30 segundos, por último, los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

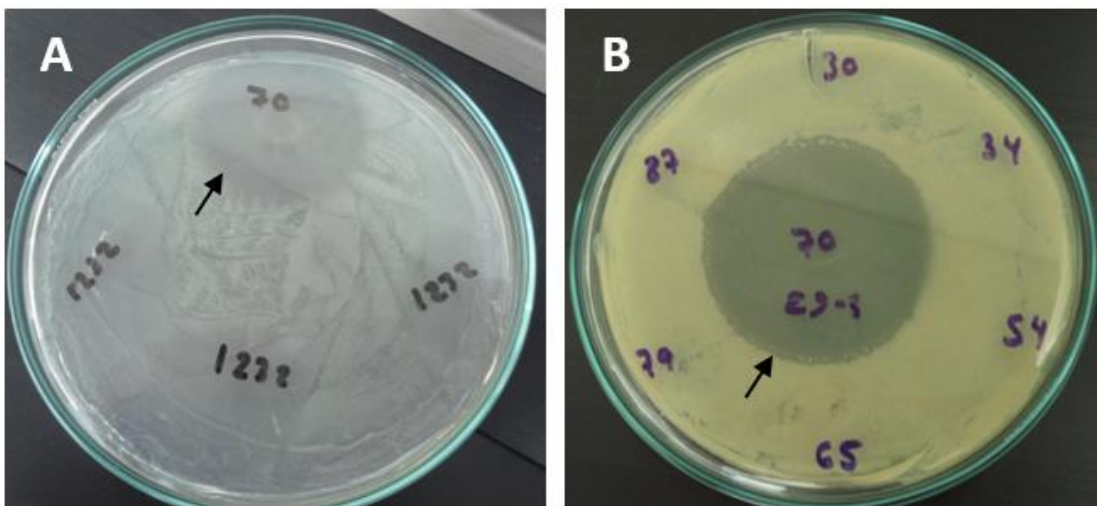
## **5.7. Ensayos de virulencia en plantas.**

Para el ensayo en fragmentos de cebolla las cepas de *B. gladioli* UAPS07070, BG1232, BG87 y BG79 fueron crecidas en caldo LB a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Los cultivos fueron ajustados a 0.05 de absorbancia (aprox.  $10^7$  UFC/ml) a una densidad óptica de 620 nm con dos lavados previos con medio de cultivo LB líquido estéril. Fragmentos de bulbos de cebolla “Yellow globe” (aprox. 10 cm<sup>2</sup>) fueron inoculados en la superficie interna con 5 µl de la suspensión bacteriana previamente ajustada dentro de una herida realizada mecánicamente sobre el tejido de los bulbos de cebolla con la punta de una micropipeta. Los bulbos de cebolla fueron incubados dentro de una cámara de humedad a 30 °C por 48 horas y la virulencia fue detectada por la presencia de tejido macerado. Para el ensayo en hojas de plantas de lechuga,  $10^3$  UFC previamente lavadas y suspendidas en un volumen de 10 mL (10 mM de MgSO<sub>4</sub>) se inocularon en la nervadura central de tres hojas lozanas de planta de lechuga. El control se inoculó con 10 mL de MgSO<sub>4</sub> a 10 mM. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de humedad y las lesiones fueron registradas después de cinco días de la inoculación con la bacteria (Modificado de Ibrahim, 2012).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Selección de mutantes de *B. gladioli* UAPS07070 afectadas en su capacidad antagónica en contra de diferentes microorganismos.

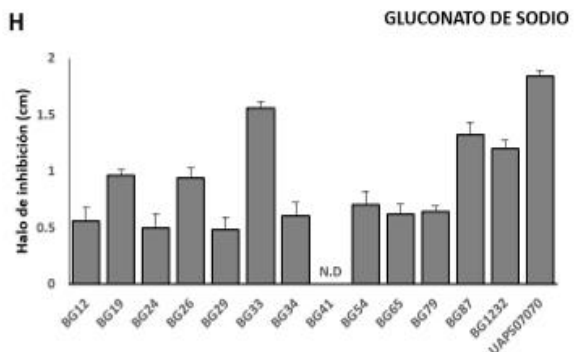
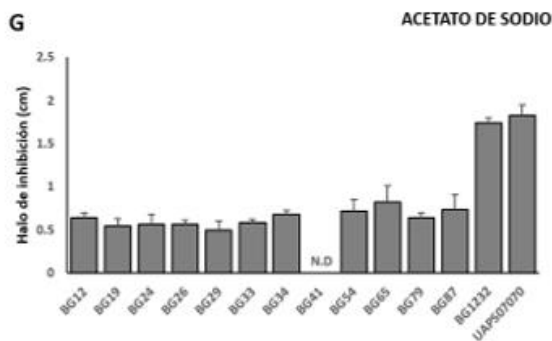
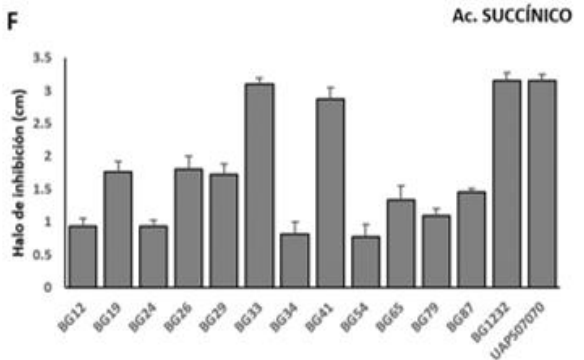
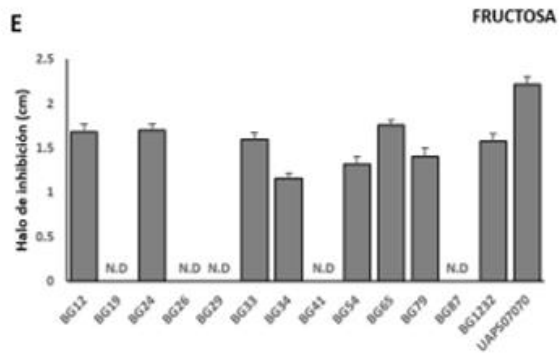
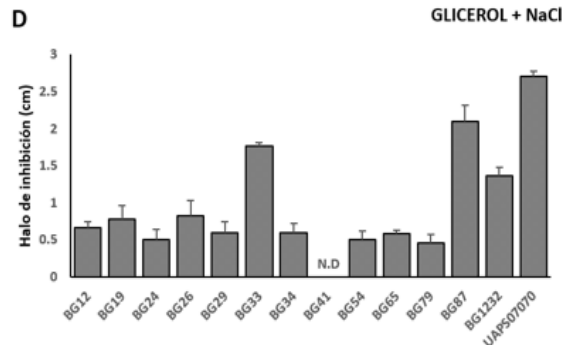
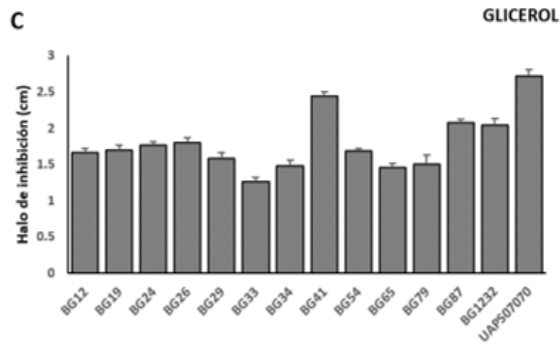
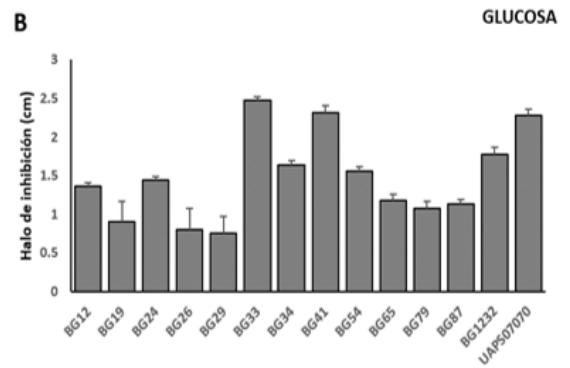
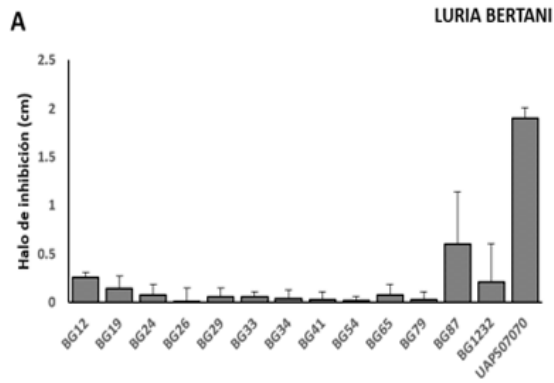
A partir de la banca de 6000 mutantes obtenidas al azar de *B. gladioli* UAPS07070 que fue construida por medio del transposón *Himar1* (Seynos, 2013) se seleccionaron trece mutantes afectadas en su capacidad antagónica contra la bacteria sensible *T. tyseos* UAPS07007 que produce la enfermedad *pink disease* en fruto de piña (Fig. 11A). Todos los derivados presentaron baja a nula actividad antagónica en ensayos de doble capa de 24 y 48 h. Debido a las características morfológicas coloniales de *T. tyseos* UAPS07007 que no permiten observar de forma clara los halos de inhibición decidimos sustituir a esta cepa sensible por la bacteria gramnegativa *Acinetobacter* sp. UAPS0169 (Bustillos-Cristales, 2017) que presentó mejor resolución en los ensayos de inhibición (Fig. 11A y 11B).



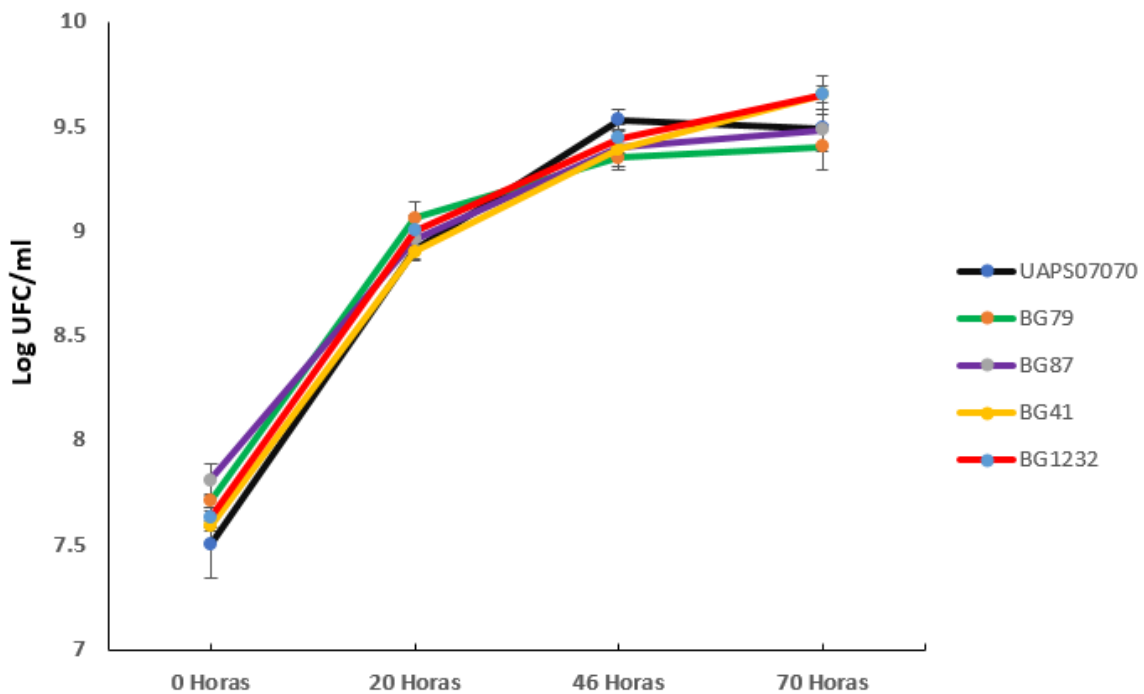
**Fig. 11.- Ensayos de doble capa.** (A) cepa sensible *T. tyseos* UAPS07007; (B) cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169. Las flechas indican los halos de inhibición producidos por *B. gladioli* UAPS07070 los números 1232, 30, 34, 54, 65, 79 y 87 en la placa indican cepas mutantes derivadas de la cepa silvestre.

Las trece mutantes previamente seleccionadas mantuvieron disminuida su capacidad en la producción de metabolitos antimicrobianos contra *Acinetobacter* sp. UAPS0169 en comparación con la cepa silvestre en ensayos de doble capa de 24 horas en medio LB (Fig. 12A). Se exploró la producción de moléculas antagónicas en medios de cultivo mínimos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol, glucosa + NaCl, fructosa, Ac. succínico, acetato de sodio y gluconato de sodio) ya que la capacidad antagónica de *B. gladioli* contra bacterias y hongos está relacionada en algunos casos a las condiciones de crecimiento. Los resultados de *B. gladioli* UAPS07070 contra la cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169 muestran cambios en el tamaño de los halos de inhibición (Fig. 12A–7H) en medio de cultivo enriquecido LB en comparación con los medios de cultivo mínimos con diferentes fuentes de carbono en ensayos de doble capa. Ese patrón de variación en las medidas de los halos de inhibición también fue observado con las 13 mutantes (Fig. 12A–12H). La mayor pérdida del efecto antagónico se observó en el medio de cultivo LB (Fig. 12A). Los ensayos mostraron que las mutantes se vieron menos afectadas en medios que tenían como fuentes de carbono glucosa, fructosa y glicerol (Fig. 12B, 12C y 12E). Las mutantes se observaron con afectación intermedia en los medios que tenían como fuente de carbono a ácido succínico, acetato de sodio y gluconato de sodio (Fig. 12F, 12G y 12H). Al comparar el fenotipo de inhibición en un medio que tenía como única fuente de carbono al glicerol y otro que tenía como única fuente de carbono al glicerol más 1% de cloruro de sodio se observó que la mayoría de las mutantes presentaban menos capacidad antagónica en presencia de NaCl no así para la cepa silvestre en la cual no se registraron cambios en el fenotipo en ambas condiciones (Fig. 12C y 12D). El mayor tamaño en el halo de inhibición de la cepa silvestre fue observado en medio mínimo con ácido succínico (Fig. 12F).

**Fig. 12.- Ensayos de antagonismo de *B. gladioli* UAPS07070 y sus 13 mutantes derivadas en diferentes medios de cultivo en contra de la cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169.** Medios de cultivo: (A) Luria bertani; (B) Glucosa (1.5 g/L); (C) Glicerol (10 g/L); (D) Glicerol + NaCl (10 g/L); (E) Fructosa (1.5 g/L); (F) Ac. Succínico (0.5 g/L); (G) Acetato de Sodio (1.2 g/L); (H) Gluconato de sodio (5 g/L). N.D. no determinado.



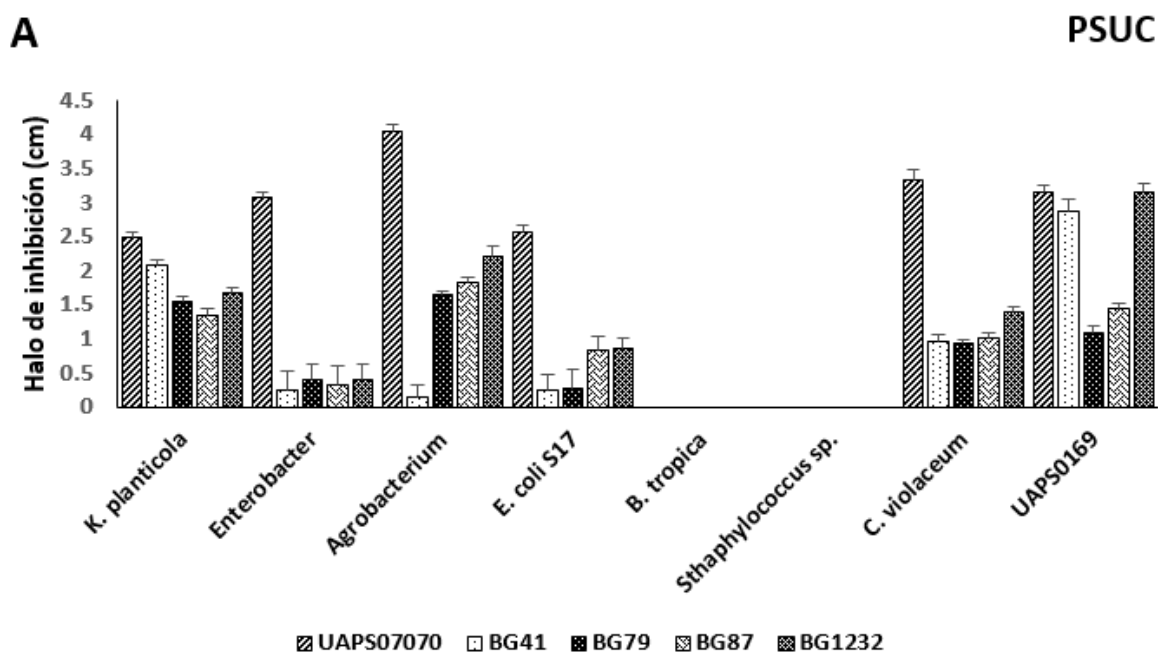
Como paso siguiente se realizó la curva de crecimiento bacteriano en medio rico LB a un grupo de mutantes junto con la cepa silvestre para descartar que la pérdida de su capacidad antagonica fuese resultado de su baja tasa de crecimiento, los resultados no mostraron cambios en el crecimiento de las mutantes con respecto a la cepa silvestre (Fig. 13).

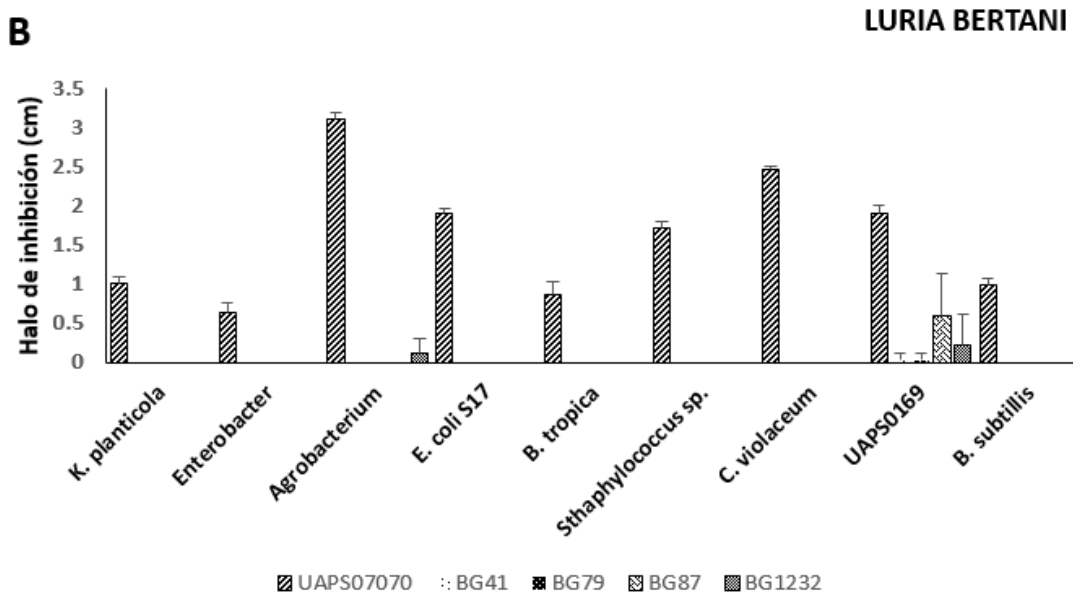


**Fig. 13.- Curva de crecimiento bacteriano en medio Luria Bertani.** Las unidades formadoras de colonia fueron cuantificadas a los tiempos de 0 h, 20 h, 46 h y 70 h, las cepas mutantes evaluadas y cepa silvestre se indican en la gráfica con colores independientes.

Este grupo de mutantes (BG41, BG79, BG87, BG1232) fueron seleccionadas para la identificación de la región cromosómica que fue interrumpida por el evento de transposición, previo a esto el grupo de mutantes junto a la cepa silvestre fue evaluado en su capacidad antagonica contra distintas bacterias algunas de ellas de interés médico y contra el hongo *Candida albicans* en ensayos de doble capa en medio LB y PSUC (medio mínimo que tiene como única fuente de carbono ácido succínico). El medio de cultivo PSUC

fue elegido debido a que en esta condición se observó un mayor tamaño del halo de inhibición contra *Acinetobacter* sp. UAPS0169 por parte de la cepa silvestre *B. gladioli* UAPS07070 (Fig. 12F), los resultados de los ensayos indican mayor capacidad antagónica de las cepas mutantes en el medio PSUC con respecto al medio LB (Fig. 14A y 14B). También se observó que en medio LB la cepa silvestre fue capaz de inhibir a todas las bacterias sensibles evaluadas en el ensayo de doble capa mientras que en medio PSUC la cepa silvestre fue incapaz de inhibir a *Staphylococcus* sp. y *B. tropica* (Fig. 13A y 13B). La actividad inhibitoria contra *B. subtilis* no fue evaluada en medio PSUC.





**Fig. 14.- Ensayos de antagonismo en contra de diferentes cepas sensibles.** Las cepas antagonicas evaluadas fueron la cepa silvestre *B. gladioli* UAPS07070 y cuatro mutantes derivadas (BG41, BG79, BG87 Y BG1232), los medios para los ensayos de doble capa fueron: PSUC (Medio mínimo con ácido succínico como única fuente de carbono) (A); Luria Bertani (B). Las cepas sensibles se indican en el eje X de la gráfica.

## 6.2. Identificación de las regiones implicadas en la alteración de la capacidad antagonica de *B. gladioli* UAPS07070.

Para la amplificación de las regiones flanqueantes al sitio de inserción del transposón *Himar1* en las mutantes, se realizó la técnica descrita por Rhol y col. 2008. Los plásmidos obtenidos que contenían los genes de interés fueron enviados para su secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM y las secuencias fueron identificadas por medio de la herramienta bioinformática BLAST disponible en la página del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De las trece mutantes descritas en el apartado anterior únicamente se pudieron rescatar y secuenciar los plásmidos de seis de las mutantes (BG12, BG33, BG41, BG79, BG87 y BG1232), las longitudes de las secuencias remitidas por la unidad de secuenciación oscilan entre 300 a 500 pb, la edición de las regiones de ADN de interés se realizó después del análisis Blast de las secuencias, únicamente se eligieron las secciones de ADN que formaran parte del gen que fue interrumpido por el transposón

*Himar1*, sólo se obtuvo la secuencia completa de los genes para las mutantes BG79, BG87 y BG1232, para el resto de las mutantes la secuencia de ADN es parcial (Tabla 1).

**Tabla 1.- Porcentaje de identidad de los genes de seis mutantes derivadas de *B. gladioli* UAPS07070.** Los resultados se muestran después de analizar las secuencias con el programa Blast (NCBI) contra los seis genomas completos de *B. gladioli* disponibles en la base de datos del NCBI.

Mutante	Región de ADN	Genomas completos de <i>B. gladioli</i> (% de identidad)					
	secuenciada	ATCC 10248	BSR3	KACC 11889	Co14	FDDARGOS_188	FDDARGOS_389
BG12	148 nt	98.66% BM43_2640	97.32% bgl_1g13080	98.66% CEJ98_06305	94.63% EDD84_11205	98.66% A8H28_34850	95.21% CO712_07365
BG33	199 nt	99.50% BM43_1986	99.50% bgl_1g05960	99.50% CEJ98_03005	99.50% EDD84_07870	99.50% A8H28_38155	98.01% CO712_10725
BG41	55 nt	100% BM43_1453	100% bgl_1g00580	100% CEJ98_00300	98.18% EDD84_05105	100% A8H28_19720	100% CO712_13435
BG79	969 nt	99.07% BM43_4926	99.17% bgl_2g12680	99.07% CEJ98_25375	97.94% EDD84_32215	99.07% A8H28_15910	98.56% CO712_20380
BG87	723 nt	No detectada	99.59% bgl_2g11070	No detectada	99.17% EDD84_33060	No detectada	99.17% CO712_19555
BG1232	614 nt	No detectada	98.37% bgl_2g11050	No detectada	97.22% EDD84_33070	No detectada	98.21% CO712_19545

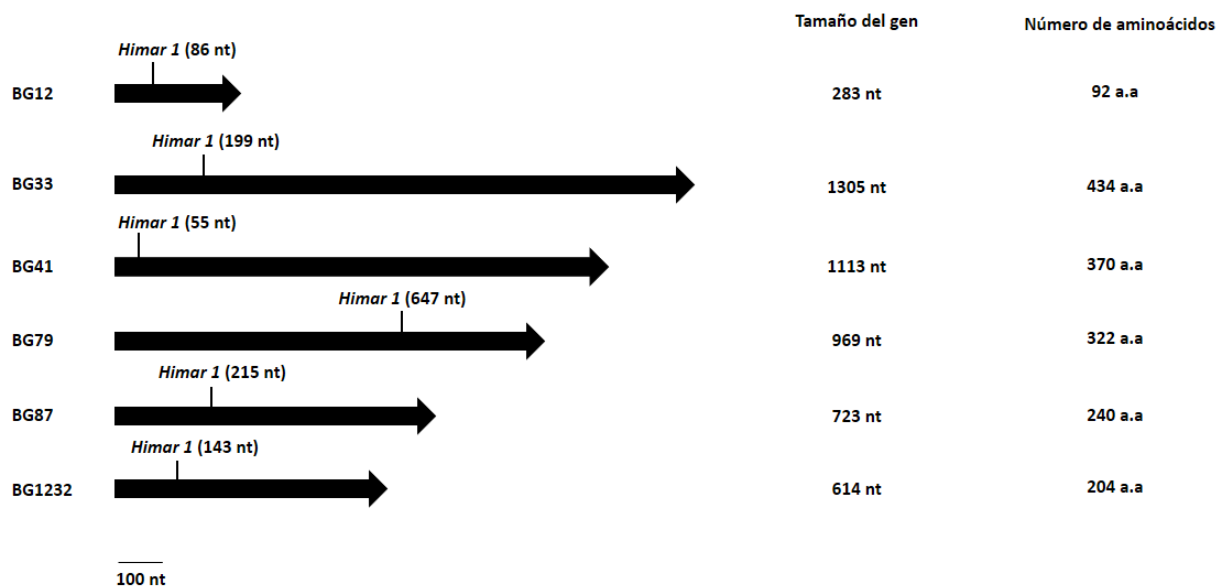
Después de su edición las secuencias fueron analizadas por Blast contra los seis genomas de *B. gladioli* disponibles en la base de datos del NCBI. Los porcentajes de identidad de las secuencias parciales o completas de cada uno de los genes de las mutantes se observan en la Tabla 1. Los resultados indican que los genes detectados en las mutantes BG12, BG33, BG41 y BG79 asociados con la disminución de sus capacidades antagónicas son conservados en los mismos cromosomas dentro de los seis genomas analizados (Tabla 1 y Tabla 2). No se detectaron los genes de las mutantes BG87 y BG1232 en los genomas de las cepas de *B. gladioli* ATCC 10248, KCC 11889 y FDDARGOS\_188 (Tabla 1 y Tabla 2). Los genes putativos interrumpidos en cada una de las seis mutantes analizadas se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.- Nombre del gen putativo identificado en la secuencia de las seis mutantes derivadas de *B. gladioli* UAPS07070.**

Mutante	gen putativo identificado por blast
BG12	Proteína de tipo Lectina de unión a fucosa cromosoma 1 en todos los genomas completos de <i>B. gladioli</i>

<b>BG33</b>	<b>Glutamato deshidrogenasa</b> cromosoma 1 en todos los genomas completos de <i>B. gladioli</i>
<b>BG41</b>	<b>NADH-Flavin oxidoreductasa/ NADH oxidasa</b> cromosoma 1 en todos los genomas completos de <i>B. gladioli</i>
<b>BG79</b>	<b>Regulador transcripcional de la familia LysR</b> cromosoma 2 en todos los genomas completos de <i>B. gladioli</i>
<b>BG87</b>	<b>Regulador de la familia LuxR (QS)</b> cromosoma 2 en algunos de los genomas completos de <i>B. gladioli</i>
<b>BG1232</b>	<b>N-acil homoserina lactona sintasa LuxI (QS)</b> cromosoma 2 en algunos de los genomas completos de <i>B. gladioli</i>

Las posiciones de las inserciones, el tamaño de los genes putativos y el número de aminoácidos teóricos de cada uno de los genes interrumpidos por el evento de transposición en las mutantes se observan en la figura 15. La mayoría de las inserciones del transposón *Himar 1* fueron a menos de 200 nt del triplete que codifica para el primer aminoácido (Fig. 15).



**Fig. 15.- Representación del tamaño de cada uno de los genes interrumpidos en las seis mutantes derivadas de *B. gladioli* UAPS07070.** El tamaño de los genes fue calculado a partir del genoma de *B. gladioli* Co14. Las flechas indican los genes. La línea que sobresale indica la posición donde se insertó el transposón *Himar 1*. En paréntesis se indica la posición de la inserción a partir del codón de inicio de la traducción.

Los datos revelaron que los genes de las mutantes BG87 y BG1232 pertenecen al mismo sistema de Quorum sensing (QS) (Fig. 16). El alineamiento de la secuencia teórica de aminoácidos de ambos genes con sus homólogos en *B. gladioli* BSR3 y *B. glumae* BGR1, dos cepas fitopatógenas del arroz, reafirmó su participación en regulación de tipo Quorum Sensing (Tabla 3). La secuencia teórica de aminoácidos del gen *lysR* de la mutante BG79 también fue comparado con las cepas BSR3 y BGR1 mostrando un porcentaje de identidad superior al 85 % (Tabla 3). El análisis a nivel de secuencia de los péptidos de las mutantes BG12, BG33 y BG41 no se efectuó debido a la pequeña región de ADN recuperada.

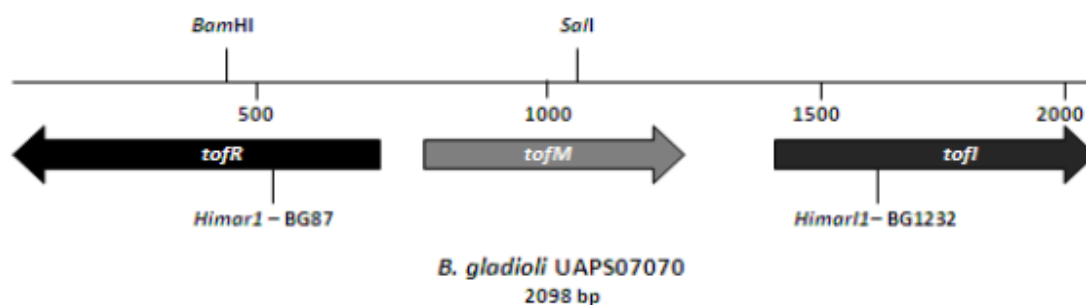


Fig. 16.- Mapa físico del loci de los genes *tofI* y *tofR* de las mutantes BG1232 y BG87, respectivamente. El gen *tofM* es indicado con la flecha color gris, los sitios de restricción para *Bam*HI y *Sa*II son indicados.

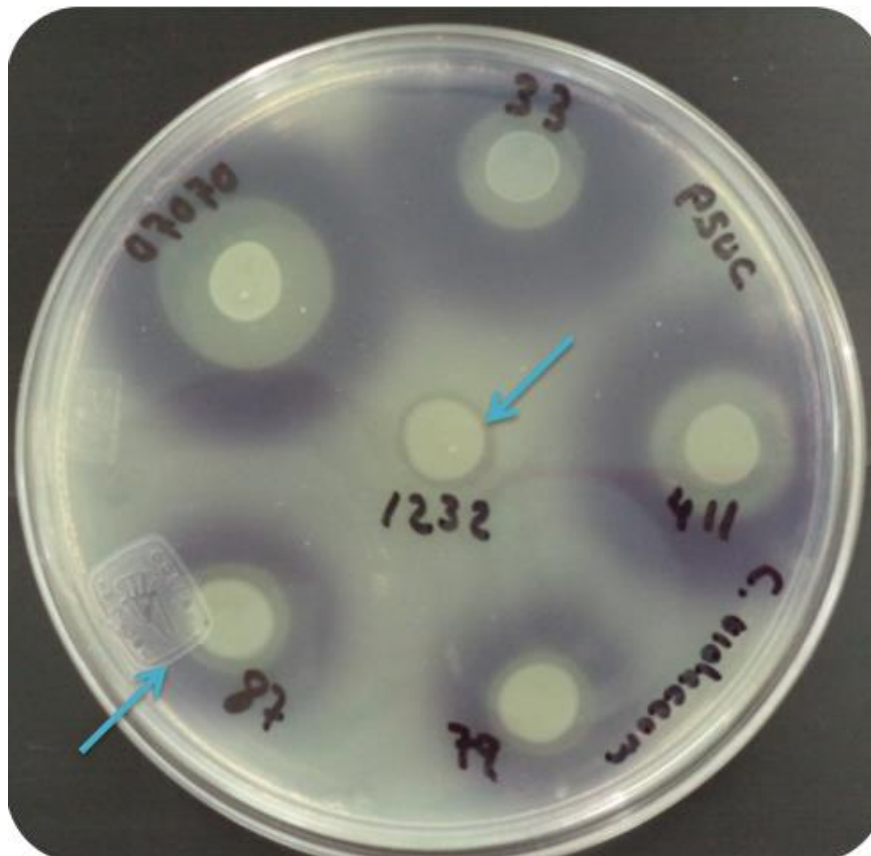
Tabla 3.- Identidad de los péptidos de QS y *LysR* identificados en *B. gladioli* UAPS07070

	<i>TofI</i>	<i>TofM</i>	<i>TofR</i>	<i>LysR</i>
<b><i>B. gladioli</i> BSR3</b>	98.50%	97.30%	100%	99.40%
	AEA63554.1	AEA63555.1	AEA63556.1	AEA63716.1
<b><i>B. glumae</i> BGR1</b>	86.70%	78.70%	92.10%	83.50%
	ACR31808.1	ACR31807.1	ACR31806.1	ACR31745.1
<b><i>B. glumae</i> PGI</b>	86.20%	79.30%	94.60%	87.40%
	AJK49063.1.1	AJK49064.1	AJK49065.1	AJK49176.1

El porcentaje de identidad de los aminoácidos fue calculado con ClustalW.

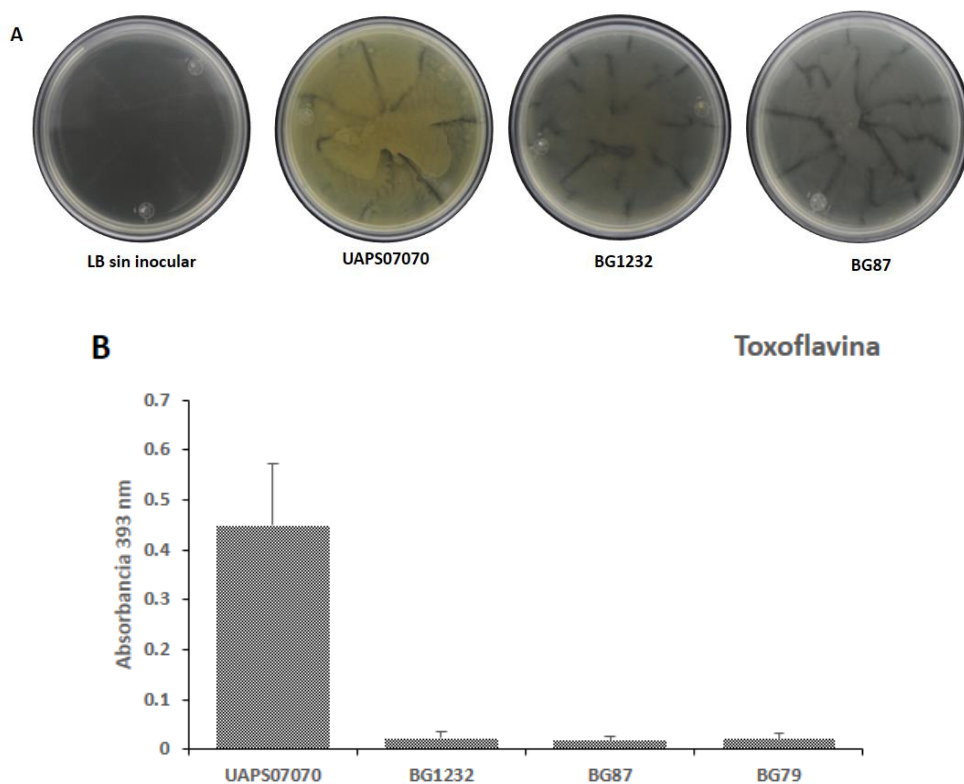
El gen *tofI* de *B. gladioli* UAPS07070 codifica para una N-acil homoserina lactona putativa la cual tiene la capacidad de sintetizar moléculas denominadas autoinductores de QS las cuales probablemente sean N-octanoil homoserina lactone (C8-HSL) y N-hexanoil

homoserina lactona (C6-HSL). Para confirmar la funcionalidad del gen *tofI* en la cepa silvestre y en la mutante BG1232 empleamos a *C. violaceum* CV026, una cepa reportera de QS que tiene desactivado su gen *luxI* (homólogo a *tofI*) y que en presencia de autoinductores externos se activa desencadenando la producción de violaceína un compuesto de color violeta visible al ojo humano. Los resultados de este experimento revelaron la producción de violaceína por parte de *C. violaceum* CV026 cuando está en presencia de autoinductores producidos por la cepa silvestre UAPS07070 y no cuando se encuentra en contacto con la cepa mutante BG1232. Ésto indica que el sistema de QS es activo en la cepa silvestre UAPS07070 (Fig. 17), La capacidad de producir moléculas autoinductoras de otras mutantes entre ellas BG87 no fue afectada (Fig. 17).



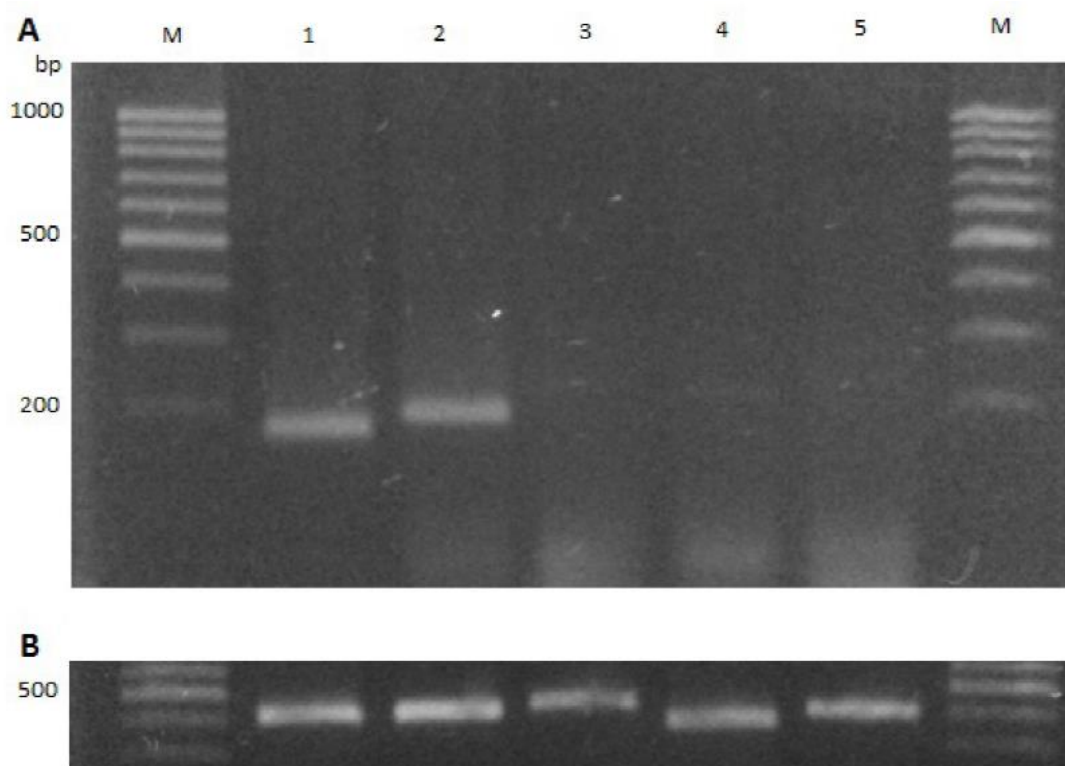
**Fig. 17.- Ensayo para detección de producción de autoinductores de QS producidos por proteínas homólogas a LuxI.** El tapete continuo corresponde a la cepa reportera de QS *C. violaceum* CV026. Las cepas evaluadas fueron UAPS07070, BG33, BG41, BG87 y BG1232. Un halo de color violeta alrededor de la cepa evaluada se tomo como positivo.

El sistema de Quorum Sensing regula la producción de toxoflavina en *B. glumae* (Kim, 2004), la que es un importante factor de virulencia y también tiene propiedades antibacterianas. Ya que *B. glumae* y *B. gladioli* son filogenéticamente cercanos y ambos son fitopatógenos de arroz se decidió explorar la participación de la toxoflavina en el fenotipo de antagonismo en UAPS07070. La siembra masiva sobre la superficie del agar LB de la cepa silvestre reveló la presencia de un pigmento amarillento en la periferia del crecimiento bacteriano lo que concuerda con la descripción de toxoflavina en estas condiciones. No hubo detección de este pigmento bajo las mismas condiciones experimentales en las cepas BG87 y BG1232 (Fig. 18A). Para confirmar la producción de toxoflavina se realizó su extracción y cuantificación por absorbancia, los resultados indicaron lecturas despreciables de absorbancia en las mutantes de QS BG87 y BG1232, así como en la mutante BG79 en comparación con la cepa silvestre (Fig. 18B).



**Fig. 18.- Detección de toxoflavina.** (A) Ensayos en agar LB la cepa silvestre UAPS07070 y las mutantes BG79, BG87 y BG1232 fueron sembrados de forma masiva sobre la superficie del medio LB, se tomó como positiva la prueba cuando el agar adquirió una tonalidad amarilla en comparación con el agar sin inocular; (B) Gráfico que muestra las lecturas de cuantificación de toxoflavina por absorbancia a 393 nm.

Para conocer la participación de la fitotoxina toxoflavina en el fenotipo de antibiosis en el modelo de estudio, se evaluó, por RT-PCR de punto final, la presencia del mRNA de *toxA* (responsable de las metilaciones en la molécula de toxoflavina) en la cepa silvestre UAPS07070 y mutantes BG79, BG87 y BG1232. Los resultados indican ausencia del transcrito del gen *toxA* en las todas las mutantes en comparación con *B. gladioli* UAPS07070 (Fig. 19) indicando fuerte participación de la toxoflavina como metabolito antimicrobiano bajo las condiciones de este estudio.

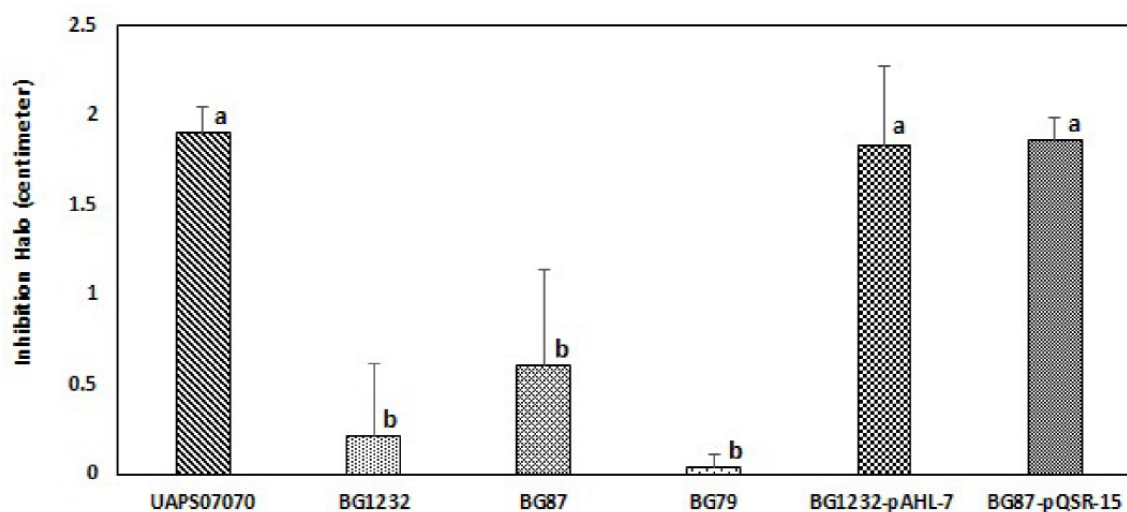


**Fig. 19.- RT-PCR de punto final del gen *toxA*.** (A) Electroforesis en gel de agarosa del amplicón de 181 pb del gen *toxA*: carril 1.- UAPS07070 (gDNA); carril 2.- UAPS07070; carril 3.- BG1232; carril 4.- BG87; carril 5.- BG79; carril M.- Marcador de peso molecular 100 bp (GeneCraft). (B) Electroforesis en gel de agarosa del amplicón de 412 pb del gen 16S rDNA: carril 1.- UAPS07070 (gDNA); carril 2.- UAPS07070; carril 3.- BG1232; carril 4.- BG87; carril 5.- BG79.

### 6.3. Restauración del fenotipo silvestre en las mutantes de *B. gladioli* UAPS07070.

La complementación en *trans* de las mutantes BG87(*tofR::himar1*) y BG1232(*tofl::himar1*) afectadas en el sistema de Quorum Sensing se realizó mediante el

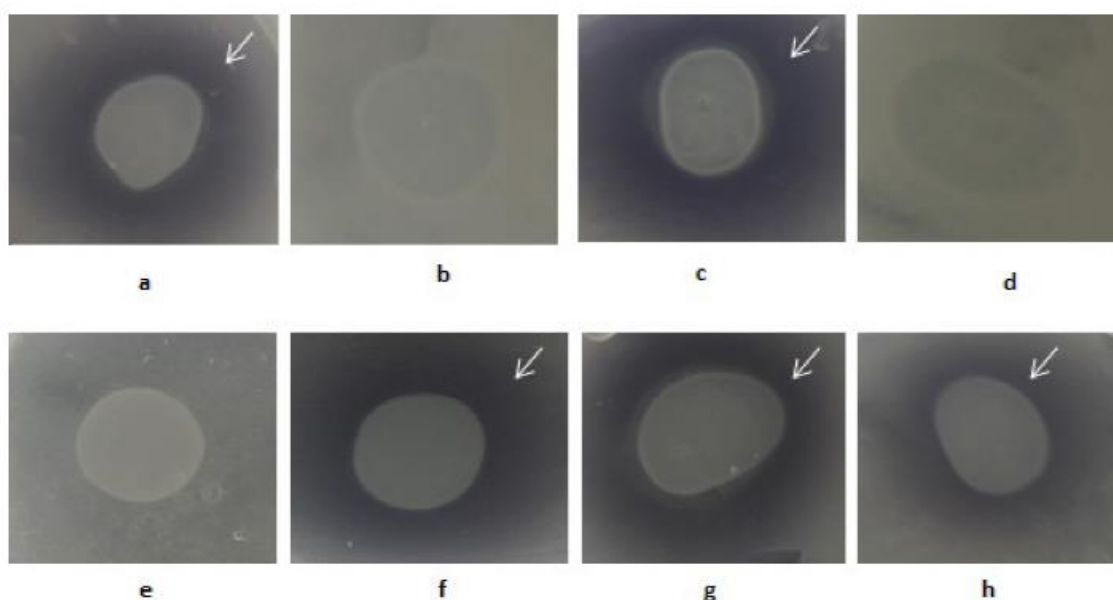
rescate con enzimas de restricción de los genes íntegros *tofR* (regulador de QS) y *tofI* (acil homoserina lactona sintasa) a partir de los plásmidos p1232 (*tofI::himar1*) y p87-2 (*tofR::himar1*) rescatados de las mutantes BG1232 y BG87 respectivamente. Los genes *tofI* y *tofR* más aproximadamente 100 nucleótidos río arriba y río abajo de la región codificante fueron clonados de forma independiente en el vector de amplio rango de hospedero pBBR1MCS-5 generando los plásmidos pAHL-7 (*tofI*) y pQSR-15 (*tofR*) (Fig. supl. S6 y S7). Los plásmidos pAHL-7 y pQSR-15 se introdujeron en las mutantes BG1232 y BG87 respectivamente generando sus derivadas complementadas BG1232-pAHL-7 y BG87-pQSR-15. El fenotipo de antagonismo en las mutantes de QS complementadas en contra de la cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169 fue restituido al nivel de la cepa silvestre (Fig. 20).



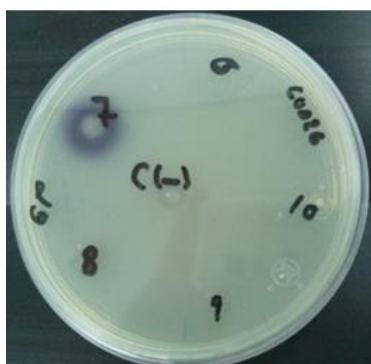
**Fig. 20.- Ensayos de antagonismo en contra de la cepa sensible *Acinetobacter* sp.** Medida de los halos de inhibición registrada en centímetros producidos por las cepas UAPS07070, BG1232, BG87, BG79, BG1232-pAHL-7 y BG87-pQSR-15. Ensayos de doble capa en medio sólido LB, con producción de metabolitos antimicrobianos por 24 h. D.S. Desviación estándar de 5 réplicas.

La producción de acil homoserina lactonas (AHLs) que actúan como autoinductores en los sistemas de QS en bacterias gramnegativas fue restituida en la mutante complementada BG1232-pAHL-7 en comparación con la no producción de AHLs en la mutante BG1232 (*tofI::himar1*) que posee su gen *tofI* interrumpido por el evento de transposición (Fig. 21). El plásmido pAHL-7 que contiene el gen *tofI* funcional le confirió la

capacidad de sintetizar AHLs a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  la cual no presenta sistemas de QS de tipo AHLs indicando una expresión constitutiva del gen *tofl* de *B. gladioli* UAPS07070 (Fig. 22).

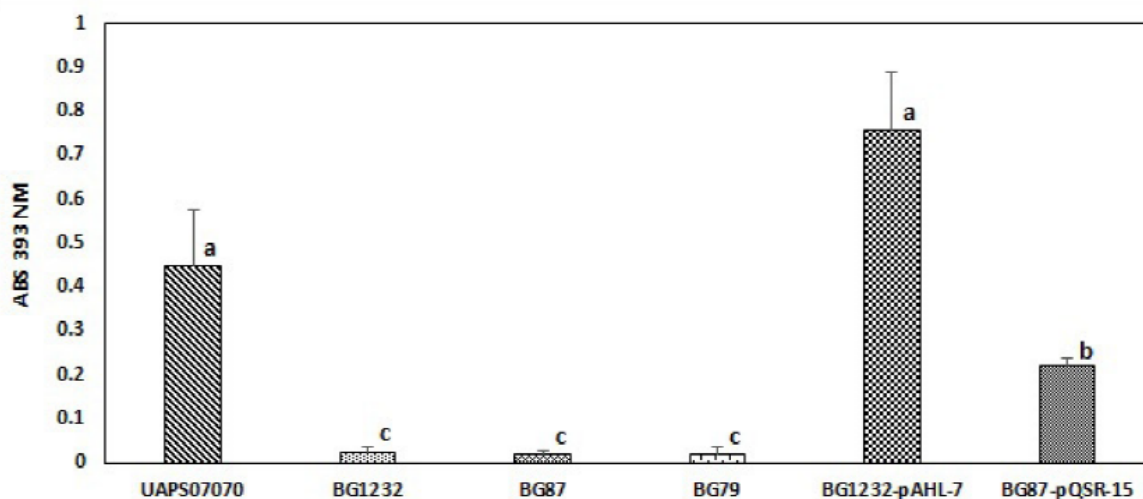


**Fig. 21.- Detección de autoinductores de tipo AHLs de cadena corta empleando la cepa reportera *C. violaceum* CV026.** a) UAPS07070; b) BG1232; c) BG1232-pAHL-7; d) BG1232-pBBR1MCS-5; e) CV026; f) BG87; g) BG87-pQSR-15; h) BG87-pBBR1MCS-5. La reacción positiva fue considerada por la presencia de un halo violeta alrededor colonia productora de autoinductores (indicada con la flecha). Una gota de 10  $\mu$ l fue colocada sobre un tapete seco de *C. violaceum* CV026 distribuido sobre la superficie de una placa de medio PSUC.



**Fig. 22.- Detección de acil homoserina lactonas.** 6) *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5; 7) *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5-*tofl* (pAHL-7); 8) *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5; 9) *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5; 10) *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5; C -) *C. violaceum* CV026. Una gota de 10  $\mu$ l fue colocada sobre un tapete seco de *C. violaceum* CV026 distribuido sobre la superficie de una placa de medio GP (Glicerol y Peptona de Caseína al 10%).

La complementación de la mutante *tofR* cepa BG87-pQSR-15 no mostró cambios en la detección de AHLs con la cepa reportera *C. violaceum* CV026 en comparación con la mutante no complementada BG87 (Fig. 21). La restitución del fenotipo de antibiosis y de la funcionalidad del sistema de QS en las mutantes BG1232 y BG87 complementadas está en concordancia con la producción de toxoflavina en el modelo de *B. glumae* en el cual los genes de biosíntesis de la fitotoxina son regulados por el QS de tipo AHLs. Esta idea fue soportada con la detección *in vitro* de toxoflavina en las cepas BG1232-pAHL-7 y BG87-pQSR-15 a una concentración igual y cercana a la producida por la cepa silvestre UAPS07070 respectivamente (Fig. 23).



**Fig. 23.- Detección de toxoflavina por espectrofotometría.** Lecturas de absorbancia a 393 nm para la cuantificación de toxoflavina sintetizada en agar LB por las cepas UAPS07070, BG1232, BG87, BG79, BG1232-pAHL-7 y BG87-pQSR-15.

La mutante BG79 (*lysR::himar1*) afectada en un regulador transcripcional de la familia LysR no fue complementada en este estudio por fallas técnicas para la obtención del amplicón que contenía el gen *lysR* íntegro. El evento de transposición en la cepa BG79 no interfirió con la producción de AHLs (Fig. 17) sugiriendo algunas hipótesis que no fueron comprobadas en este estudio: 1.- El sistema de QS de tipo AHLs es funcional en la mutante BG79 al mismo nivel que la cepa silvestre UAPS07070; 2.- El regulador transcripcional LysR

controla la activación de la biosíntesis de toxoflavina en *B. gladioli* UAPS07070 en asociación con el sistema de QS de tipo AHLs. Para comprender si existe relación entre el sistema de QS y el regulador transcripcional LysR se efectuó la búsqueda bioinformática de cajas lux caracterizadas en los modelos de *Burkholderia cenocepacia* y *Burkholderia ambifaria* (Kiratisin, 2008; Chapalain, 2012) en las regiones reguladoras de los genes *tofl*, *tofR* y *lysR* de *B. gladioli* UAPS07070, los resultados del análisis indican la presencia de una caja lux entre los nucleótidos 63 a 80 del primer ATG del gen *tofl*, no se identificaron cajas lux en las regiones reguladoras de los genes *tofR* y *lysR* (Tabla 4).

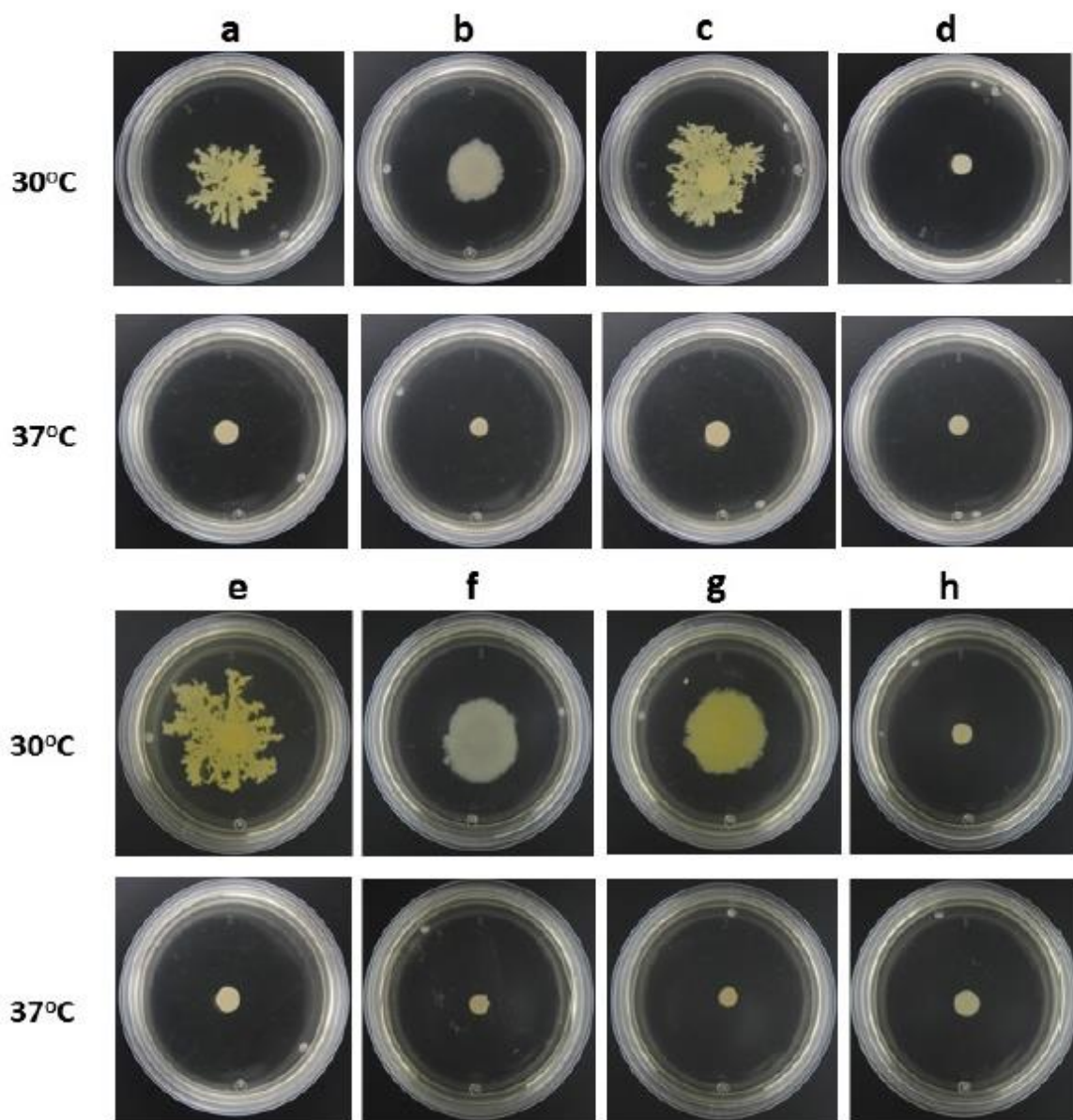
**Table 4. Putativas cajas lux de *B. gladioli* UAPS07070.**

<i>tofl</i> _UAPS07070	-80	CTGTCAGGAATAACAGTT	Este estudio
<i>tofM</i> _UAPS07070	-36	CTGTCATTCTTGCTAGGT	Este estudio
<i>cepI</i> box consensus <sup>a</sup>		CTGTAAAAGTTACCAGTT	Chambers et al. 2006
<i>cepI</i> box consensus <sup>b</sup>		CTGTAAGAGTTGTCAGTT	Chapalain et al. 2012

<sup>a</sup> *B. cenocepacia*; <sup>b</sup> *B. ambifaria*

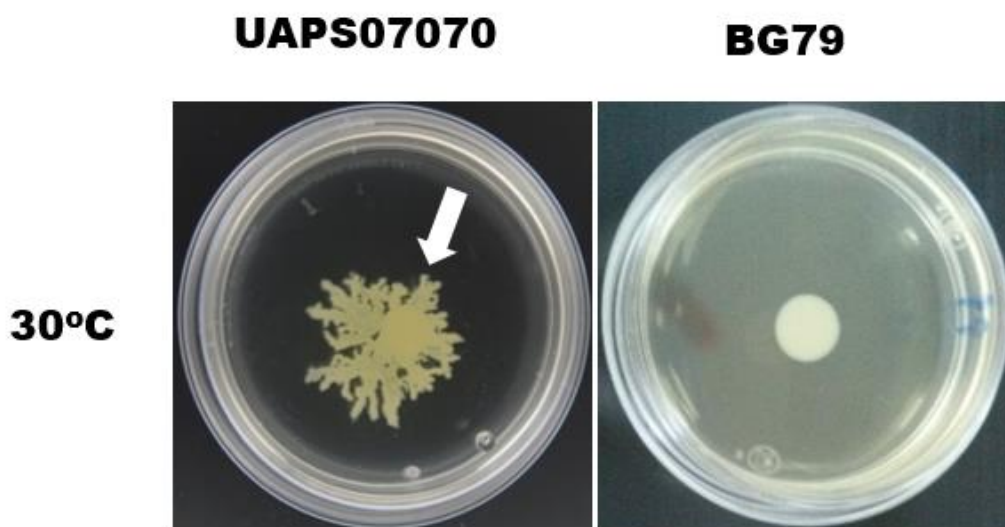
Debido a la versatilidad de *B. gladioli* como bacteria endófito y como patógeno de plantas se exploró el fenotipo de *swarming* el cual está fuertemente relacionado con la capacidad para colonizar nuevos sitios por diferentes microorganismos. Los resultados de los experimentos en agar blando muestran que *B. gladioli* UAPS07070 presenta movilidad tipo *swarming* con un patrón de desplazamiento de tipo dendrítico a 30 °C pero no a 37 °C (Fig. 24). En las bacterias *B. glumae* y *B. gladioli* dos organismos filogenéticamente cercanos el movimiento bacteriano de tipo *swarming* es regulado por el sistema de QS de tipo AHLs (Kim, 2004; Kim, 2014). Las mutantes BG87(*tofl::himar1*) y BG1232(*tofl::himar1*) presentan menor capacidad de movimiento tipo *swarming* con respecto a la cepa silvestre a 30 °C (Fig. 24). La mutante complementada BG1232-pAHL-7 restituye su fenotipo de desplazamiento al mismo nivel que UAPS07070. Por otra parte, no se observaron cambios aparentes en el

desplazamiento tipo swarming entre la mutante BG87 y su complementada BG87-pQSR-15 (Fig. 24).



**Fig. 24.- Papel del QS en el desplazamiento tipo swarming de *B. gladioli*.** Ensayos de movilidad para el desplazamiento tipo swarming en las cepas: a y e) UAPS07070; b) BG1232; c) BG1232-pAHL-7; d) BG1232-pBBR1MCS-5; f) BG87; g) BG87-pQSR-15; h) BG87-pBBR1MCS-5. La movilidad fue determinada en agar blando LB (0.4 % de agar bacteriológico) a temperaturas de 30 y 37 °C con incubación por 48 h.

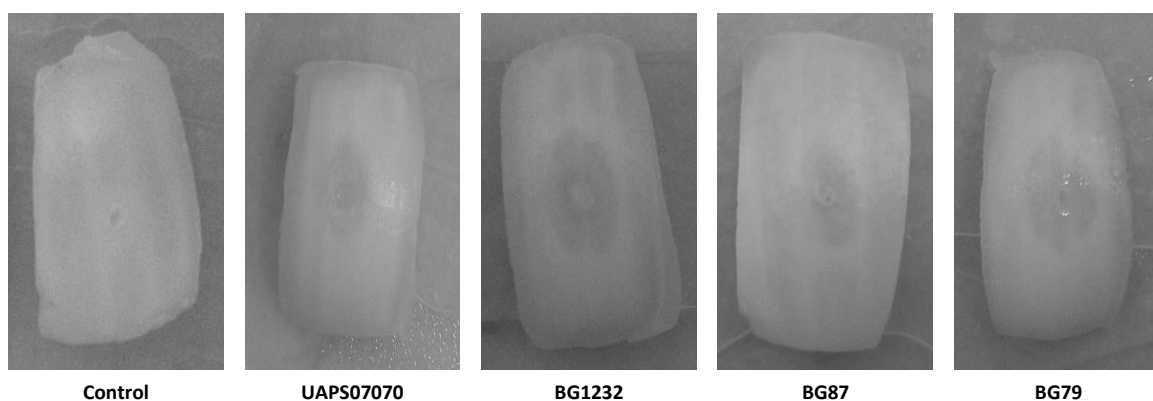
También se observaron afectaciones en el movimiento *swarming* en la mutante BG79 (*lysR::himar1*) lo que implica la participación del regulador LysR en este fenotipo bacteriano en *B. gladioli* (Fig. 25).



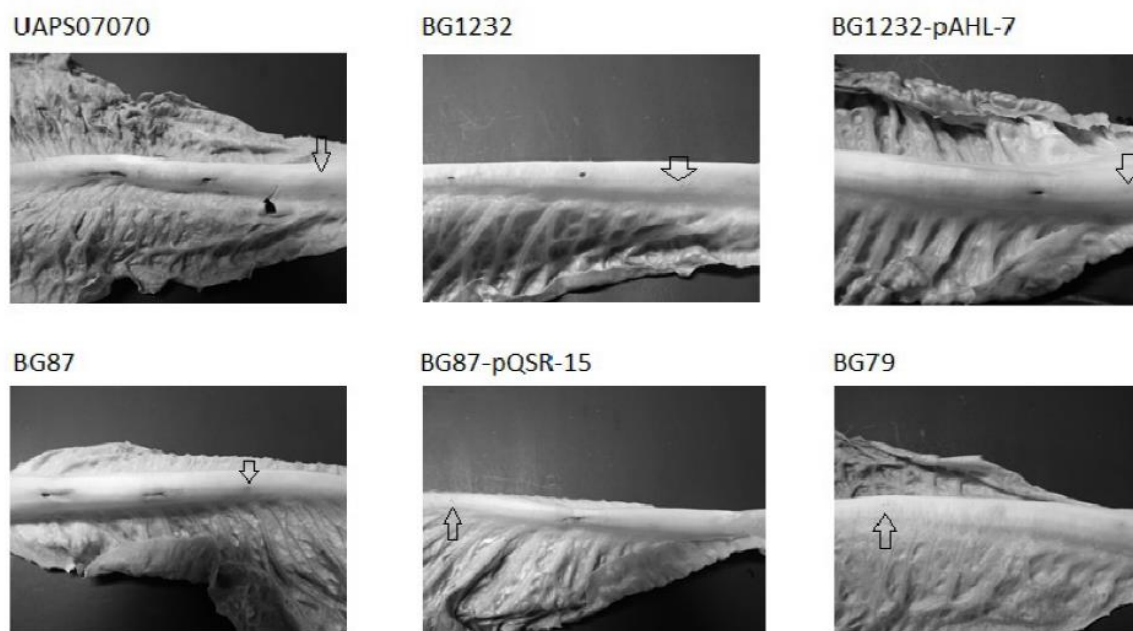
**Fig. 25.- Papel del regulador LysR en el desplazamiento tipo swarming de *B. gladioli*.** Desplazamiento tipo swarming en ensayos de movilidad por las cepas UAPS07070 y BG79. La flecha en color blanco indica el patrón dendrítico de desplazamiento en la cepa silvestre. La movilidad fue determinada en agar blando LB (0.4 % de agar bacteriológico) a la temperatura de 30 °C con incubación por 48 h.

La toxoflavina tiene propiedades antimicrobianas (Latusan, 1961) y también se le ha descrito como una molécula que actúa como un importante factor de virulencia en las infecciones en cultivos de arroz producidas por el fitopatógeno *B. glumae* (Jeong, 2003). Previamente se indicó el origen endófito de *B. gladioli* UAPS07070, así como su nula capacidad para producir enfermedades en cultivos de piña (Marin-Cevada, 2010). La capacidad de fitopatogenicidad por parte de la cepa UAPS07070 en cultivos de hortalizas como cebolla y lechuga fue evaluada experimentalmente. Los resultados de los ensayos de patogenicidad en cebolla muestran maceración del tejido de las capas del bulbo de cebolla producido por la cepa silvestre y las mutantes de QS y LysR sin alteraciones significativas entre ellas (Fig. 26). En el modelo de lechuga la pudrición blanda producida por la mutante

BG87 fue similar a la inducida por *B. gladioli* UAPS07070, menos severidad de la enfermedad en comparación con la cepa silvestre fue observada por las mutantes BG87 y BG79 (Fig. 27). No se realizaron experimentos para cuantificar la presencia de toxoflavina *in planta* y su participación en las enfermedades de las hortalizas estudiadas.



**Fig. 26.- Ensayos de virulencia en cebolla.** Las cepas inoculadas se indican en la figura. El tejido macerado fue determinado después de la incubación por 48 h a 30 °C. El control fue una solución a 10 mM de MgSO<sub>4</sub>.

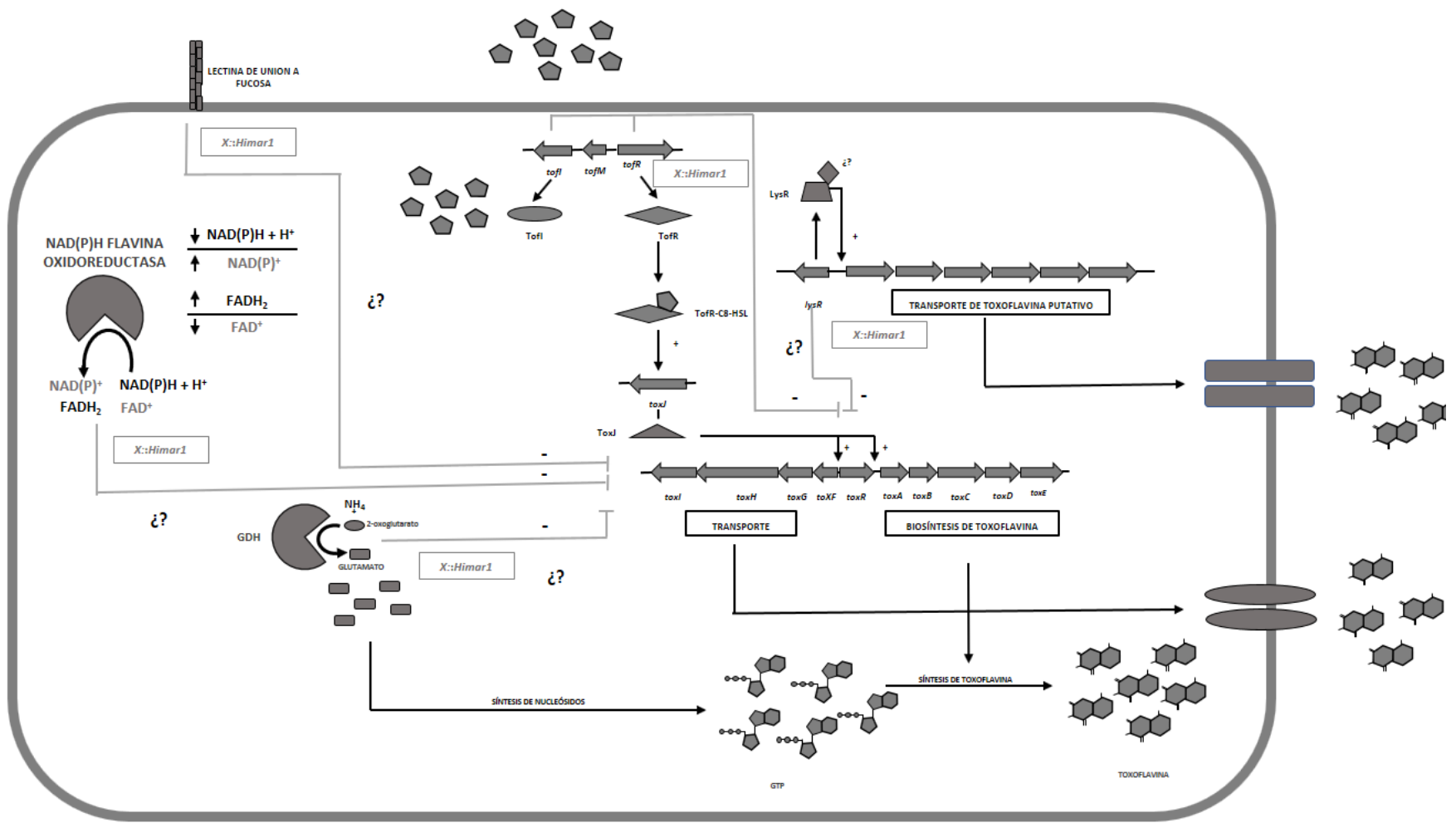


**Fig. 27.- Ensayos de virulencia en lechuga.** Las cepas inoculadas se indican en la figura. La pudrición blanda fue observada después de incubar las plantas por 5 días a 30 °C. La flecha indica la inoculación del control (Solución a 10 mM de MgSO<sub>4</sub>).

#### **6.4. Modelo de las interacciones y participación de los genes en el efecto antagónico de *B. gladioli* UAPS07070.**

En el modelo propuesto para la regulación de la biosíntesis de toxoflavina (compuesto antimicrobiano) en medio sólido LB por la bacteria *B. gladioli* UAPS07070 (Fig. 28) se asume que los operones *toxABCDE* (biosíntesis de toxoflavina) y *toxFGHI* (transporte de toxoflavina) son dependientes del sistema de Quorum sensing de tipo acil homoserina lactona (QS AHL) para su activación. Probablemente en UAPS07070 el QS de tipo AHL activa los operones *tox* mediante el regulador *toxJ* como se ha reportado para *B. glumae* (Kim, 2004). La participación de *toxJ* en la cascada de activación de toxoflavina en nuestro modelo de estudio no fue evaluada.

Con respecto a la producción constitutiva de autoinductores por parte de la mutante BG87 (*tofR::Himar1*) se asume que el regulador TofR no controla la expresión del gen *tofl* en UAPS07070. No caracterizamos los tipos de autoinductores sintetizados por *tofl* en nuestro modelo de estudio, pero existe una alta probabilidad de que el autoinductor C8-HSL (octanoil homoserina lactona) sea el que se una al regulador TofR para controlar la biosíntesis de toxoflavina en *B. gladioli* semejante a lo que se conoce en *B. glumae* (Kim, 2004). Tenemos la hipótesis de que el gen *lysR* de UAPS07070 que codifica para un regulador de tipo LysR regula positivamente la expresión de un operón contiguo y transcrito divergentemente al gen del regulador (de acuerdo con el contexto genético encontrado en los seis genomas de *B. gladioli* de la base de datos del NCBI). El posible operón regulado por la proteína LysR codifica genes para la síntesis de transportadores putativos que podrían estar relacionados a la excreción de toxoflavina en *B. gladioli*. La pérdida de este mecanismo de transporte regulado por LysR reprime la síntesis de la fitotoxina (con propiedades antimicrobianas) por mecanismos desconocidos en nuestro modelo de estudio.



**Fig. 28.- Modelo teórico de la regulación de la biosíntesis de toxoflavina en UAPS07070.** Los signos + y - significan activación y represión respectivamente. Los signos de interrogación indican mecanismos desconocidos.

Cuando UAPS07070 pierde su capacidad para sintetizar una proteína de tipo lectina de unión a fucosa putativa (mutante BG12) también se afecta su capacidad para sintetizar otro de sus mayores factores de virulencia como lo es la toxoflavina. Posiblemente la proteína de unión a lectina le confiere a UAPS07070 la habilidad para reconocer y adherirse a los hospederos naturales para causarles enfermedad (cebollas, maíz, flores, humanos, entre otros) (No fue evaluado en este estudio). La pérdida de su mecanismo de adhesión a hospederos reprime la expresión de otros factores de virulencia por mecanismos aún no explorados en *B. gladioli* UAPS07070.

Otra mutante con fenotipo antagónico disminuido fue afectada en una enzima glutamato deshidrogenasa putativa (mutante BG33). Se ha propuesto que la toxoflavina es sintetizada a partir de GTP (Guanosín trifosfato) (Suzuki, 2004; Philmus, 2015). El glutamato es un aminoácido empleado para la síntesis de GTP. Alteraciones en la síntesis de glutamato en UAPS07070 por inactivación de un gen que codifica para una enzima glutamato deshidrogenasa putativa (mutante BG33) reprime la síntesis de toxoflavina por rutas desconocidas en nuestro modelo de estudio.

Por último, se conoce que la toxoflavina produce especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al transferir los electrones del NADH reducido al oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Latuasan, 1961). Sugerimos que la NAD(P)H flavin oxidorreductasa putativa (identificada en la mutante BG41) impide que el NAD(P)H originado del metabolismo de la bacteria sea desviado a la producción de  $H_2O_2$  por acción de la toxoflavina, este posible mecanismo de resistencia aliviaría el estrés oxidativo en *B. gladioli* previniendo su propia intoxicación. La inactivación del gen NAD(P)H flavin oxidorreductasa en nuestro modelo de estudio reprime la biosíntesis de toxoflavina por vías de regulación desconocidas.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los metabolitos secundarios producidos por microorganismos no desempeñan una función relevante en el crecimiento celular a diferencia de los metabolitos primarios, la principal función de los metabolitos secundarios está asociada a la supervivencia de los microorganismos bajo condiciones adversas (Gokulan, 2014). Los estudios tempranos de antibiosis en nuestro modelo de estudio se realizaron en el medio de cultivo enriquecido TESMA que tiene como fuentes de carbono extracto de levadura, glucosa y manitol (Marín-Cevada, 2012). Bajo estas condiciones iniciales *B. gladioli* fue capaz de producir al menos un metabolito secundario con propiedades antimicrobianas capaz de inhibir bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y hongos levaduriformes siendo algunos de estos patógenos de interés médico o agrícola (Marín-Cevada, 2012). Probablemente los compuestos antimicrobianos detectados en fase estacionaria de crecimiento en UAPS07070 en medio TESMA se sintetizan después del agotamiento de las dos principales fuentes de carbono (glucosa y manitol) durante el crecimiento de la bacteria volviendo al medio de cultivo un ambiente bajo en nutrientes y provocando estrés en la bacteria. La síntesis del compuesto antimicrobiano también puede estar sujeta a mecanismos de represión catabólica por carbono (CCR.- Carbon catabolite repression) como se ha descrito en *Streptomyces* y otros microorganismos (Deutscher, 2008; Görke, 2008; Ruiz, 2010). Nuestros resultados muestran alteraciones en el fenotipo de antibiosis de *B. gladioli* UAPS07070 en relación con los medios de cultivo mínimos con fuentes de carbono específicas (glucogénicas, ciclo de Krebs) y el medio enriquecido (LB) en contra de la cepa sensible *Acinetobacter sp.* UAPS0169. El mayor halo de inhibición a la cepa sensible por parte de UAPS07070 se observó en medio mínimo con ácido succínico como única fuente de carbono. Probablemente el ácido succínico es utilizado por la bacteria para producir energía y como precursor para el metabolismo secundario al integrarse directamente al ciclo de Krebs, pero su incorporación a la vía metabólica central podría ser lenta desencadenando estrés en el microorganismo. En medio LB y medio mínimo con acetato de sodio los valores de inhibición fueron cercanos. El acetato de sodio es un compuesto

gluconeogénico y que alimenta directamente al ciclo de Krebs, el acetato puede ser utilizado para la síntesis de ácidos grasos como el malonil-CoA el cual es un intermediario importante en la síntesis de metabolitos secundarios por policétido sintasas (PKS) en los organismos vivos (Chan, 2009). El acetato de sodio al ser más versátil que el ácido succínico le da mayor fluidez al metabolismo de la bacteria lo que se refleja en un menor estrés para el microorganismo. Las fuentes de carbono glucogénicas glicerol (gluconeogénico), glucosa y fructosa presentaron valores cercanos en la producción de halos de inhibición en la cepa UAPS07070. Se ha documentado en uno de los principales géneros productores de metabolitos secundarios como lo es *Streptomyces* que fuentes de carbono como glucosa, glicerol, manosa inhiben o reprimen la producción de metabolitos secundarios al regular por varios mecanismos enzimas esenciales para su síntesis (Ruiz, 2010). El halo de inhibición registrado en medio mínimo con gluconato de sodio estuvo ligeramente disminuido en comparación al medio LB, el gluconato forma parte del ciclo de las pentosas fosfato y del ciclo Entner Doudoroff un ciclo alternativo del catabolismo de glucosa en bacterias. La disminución en el fenotipo de antibiosis cuando la fuente de carbono es el gluconato refleja una mayor estabilidad en el metabolismo central sin desviaciones hacia la producción de metabolitos antimicrobianos en el microorganismo. En *Streptomyces lincolnensis* se ha reportado que la adición de gluconato en la fase tardía de la fermentación en biorreactores induce una mayor producción del antibiótico lincomicina A por aumento del ATP, poder reductor y precursores para la síntesis del antibiótico (Zhuang, 2019). Probablemente la combinación de gluconato con otras fuentes de carbono aumente la síntesis de los metabolitos antimicrobianos producidos por *B. gladioli* UAPS07070. Una concentración equivalente de cloruro de sodio que contiene el medio LB fue aplicada a un medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono, los resultados no mostraron cambios en la longitud de los halos de inhibición entre el medio mínimo con glicerol y el medio mínimo glicerol-cloruro de sodio, lo que indica que el cloruro de sodio al 1% no infringe estrés en el microorganismo ni altera su crecimiento. Otro estudio que aborda la producción de metabolitos antimicrobianos en *Burkholderia gladioli* cepa ICMP11096 reportó mayor

producción de compuestos antimicrobianos en medio mínimo nutriente con lactosa en comparación al que tiene sacarosa y fructosa (Elshafie, 2013).

La búsqueda de mutantes con afectaciones en su fenotipo de antibiosis por eventos únicos de transposición (*Himar1*) en su genoma derivadas de la cepa UASPS07070 permitió la detección de 13 mutantes de una librería con aproximadamente 6000 mutantes independientes. Estas 13 mutantes fueron fuertemente afectadas en su capacidad de antibiosis contra la bacteria gramnegativa *Acinetobacter sp.* UAPS0169. La detección de genes relacionados a fenotipos de interés en una bacteria específica empleando transposones (Mini-Tn5, *Himar1*) ha sido una estrategia de investigación ampliamente usada hasta antes de que la secuenciación de genomas se convirtiera en una herramienta de fácil acceso para la predicción de genes relacionados a la producción de metabolitos secundarios empleando herramientas bioinformáticas (De Lorenzo, 1990; Rhol, 2008; Adamek, 2017; Chen 2019). Pocos estudios en *B. gladioli* empleando estrategia de transposición al azar se han reportado, en la cepa BG164 de *B. gladioli* pv. *agaricola* se identificaron seis mutantes por transposición al azar del mini-Tn5 en una librería de 10000 clonas independientes, las mutantes fueron afectadas en su capacidad para producir la enfermedad de la cavidad en las setas de botón blanco (*Agaricus bitorquis*) (Chowdhury, 2006). En la cepa 3A12 de *B. gladioli* endófito de una variedad de maíz cultivada en México desde hace más de 1000 años A.C. conocida como maíz landrace Chapalote (*Zea mays* ssp. *mays*) se identificaron 13 mutantes por transposición al azar del mini-Tn5 en una librería de aproximadamente 3000 clonas independientes. Estas mutantes estaban afectadas en su capacidad antifúngica en contra del hongo fitopatógeno *Sclerotinia homoeocarpa* que produce la enfermedad Creeping bentgrass en pastos (Shehata, 2017). La detección de los genes responsables en la síntesis de compuestos antimicrobianos como Ácido bongkrékico (DSMZ 11318), enaciloxina IIIa (HKI 10521), isoenaxiloxina IIIa (HKI 10521), gladiolina (BCC0238), IcosalideA1 (BCC0238), Lagriinae (Lv-StA), caryoynencin (Lv-StA) y toxoflavina (Lv-StA) en diferentes cepas de *B. gladioli* se realizó mediante genómica (Moebius, 2012; Ross, 2014a; Song, 2017; Jenner, 2019). En ese estudio se obtuvo la secuenciación del genoma completo de la cepa y posteriormente se comparó con genes de síntesis ya

conocidos y reportados en otras especies bacterianas. Así mismo, se realizó análisis con programas bioinformáticos como antiSMASH que permite predecir los cluster de genes biosintéticos de metabolitos secundarios y el servidor SMART que predice la arquitectura de los módulos de policétidos (Moebius, 2012; Ross, 2014a; Song, 2017; Jenner, 2019; Florez, 2017; Medema, 2011; Schultz, 1998). En algunos estudios se realizó la caracterización química de la molécula del metabolito antimicrobiano, el empleo de técnicas de minería bioinformática (bioinformatic data mining) con las cuales se detectó el clúster de genes de biosíntesis y con esta información se realizaron en genes esenciales para la biosíntesis de los metabolitos antimicrobianos (Moebius, 2012; Ross, 2014a; Song, 2017; Jenner, 2019).

La detección de las 13 mutantes de *B. gladioli* con fenotipo de antibiosis disminuido fue por ensayos en medio LB. Al evaluar el fenotipo antagónico de las mutantes en los medios mínimos con fuentes de carbono específicas se observó menor afectación en comparación con el medio LB. Una posible explicación implica que las mutaciones no afectan los genes de biosíntesis de la molécula antimicrobiana, además el estrés para las mutantes en los medios mínimos es elevado ya que todas sus biomoléculas deben ser producidas a partir de la única fuente de carbono disponible en el medio de cultivo. Está condición de estrés modificaría la regulación y la expresión de genes de biosíntesis del metabolito antimicrobiano en las mutantes de forma diferente a la que presenta la cepa silvestre en estas condiciones. Ésto les brindaría a las mutantes mayores aptitudes competitivas sin que éstas estén en competencia directa con otro microorganismo diferente de acuerdo con el diseño de los ensayos de antagonismo. Otra posible explicación está relacionada con los múltiples compuestos antimicrobianos que pueden producir las diferentes cepas de *B. gladioli* (Moebius, 2012; Ross, 2014a; Song, 2017; Jenner, 2019; Florez, 2017). Existe una alta probabilidad de que nuestro genotipo de estudio la cepa UAPS07070 pueda producir más de un metabolito secundario con propiedades antimicrobianas. La bacteria UAPS07070 modificaría la producción de cada uno de ellos en respuesta a las condiciones de crecimiento a las cuales se encuentra expuesta, tal como se ha observado para la producción de enaciloxinas (antibacteriano) en *B. gladioli* pv.

*cocovenenas* HKI 10521. Éstas sólo son producidas por la bacteria cuando crece en condiciones de microaerofilia semejantes a las de los procesos de fermentación (Ross, 2014a). El crecimiento junto a otros organismos es otro factor que induce la producción de metabolitos secundarios, se conoce que la producción de enaciloxinas y ácido bongkrékico (antifúngico) en *B. gladioli pv. cocovenenas* HKI 10521 se incrementan cuando la bacteria crece en cocultivo bacteria-hongo (Ross, 2014a). En nuestro modelo de estudio probablemente las mutantes mostraron una pérdida menor de su capacidad antagónica en los medios mínimos con fuentes de carbono específicas debido al incremento de la producción de un primer metabolito antimicrobiano originado por la pérdida de la capacidad de síntesis de un segundo metabolito antimicrobiano por el evento de transposición. En *Pseudomonas protegens* Pf-5, una bacteria que produce siete metabolitos secundarios de tipo antifúngico, se ha reportado que la inactivación por mutación de un gen importante para la síntesis de pioluterina incrementa la producción de 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) y monoacetylphloroglucinol (MAPG) con respecto a la cepa silvestre (Quecine, 2016). En esta misma bacteria la mutación nula en un gen de síntesis para cianuro de hidrogeno aumenta la producción de DAPG, MAPG, Rizhoxina y orfamida A en comparación con la cepa silvestre (Quecine, 2016). Disminución en la producción de DAPG, MAPG y Rhizoxina en comparación a lo producido por *P. protegens* Pf-5 se observa cuando se inactiva por mutación un gen para la síntesis de orfamida A (Quecine, 2016).

La ausencia de actividad inhibitoria de UAPS07070 contra *Burkholderia tropica* y *Staphylococcus* sp. en medio mínimo con ácido succínico (PSUC) en comparación con el medio LB indica la capacidad de este microorganismo para producir moléculas antimicrobianas bajo diferentes condiciones de crecimiento. En esta nueva era de secuenciación de genomas se ha estimado que *Streptomyces*, el mayor género bacteriano estudiado por su capacidad de producir metabolitos secundarios tiene el potencial para producir al menos 150 000 de estos compuestos bioactivos de los cuales hasta el 2005 sólo se habían identificado 7 600 por métodos de cultivo tradicional (Baral, 2018). Empleando minería del genoma se han identificado en diferentes microorganismos vías metabólicas cripticas (cryptic metabolic pathways) que no han sido caracterizadas, las cuales se

encuentran silenciadas o pobremente expresadas. Estas vías están fuertemente relacionadas a la producción de metabolitos secundarios y se pueden activar mediante estrategias que aún están en desarrollo como cocultivos, mutaciones en los ribosomas para incrementar los niveles de transcripción, sobreexpresión de proteínas acarreadoras de peptidilos y acilos, manipulación de sistemas de regulación global, entre otros (Baral, 2018). En la actualidad no existe un reporte completo que evidencie el número de compuestos antimicrobianos que pueda producir *B. gladioli* bajo medios de cultivo específicos. Por medio de análisis bioinformático con antiSMASH se conoce que *B. gladioli* BCC0238 dedica 18.2 % y 25.6 % de su primer y segundo cromosoma, respectivamente, al metabolismo especializado. Entre el que se incluyen líneas de ensamble PKS (Policétido sintasas), NPRS (Síntesis de péptidos no ribosomales) y líneas híbridas PKSNPRS (Song, 2017). Estos datos sugieren elevado potencial para la biosíntesis de metabolitos secundarios especializados por parte de *B. gladioli*.

En *B. gladioli* Lv-StA el medio MGY que contiene glicerol y extracto de levadura fue empleado para la producción de toxoflavina y lagriene y agar PDB para la producción de caryoynencina y sinapigliadiósido (Florez, 2017). Los antimicrobianos Icosalide A1 y gladiolina fueron identificados de la cepa BCC0238 después de crecer en medio mínimo BSM-G con glicerol como única fuente de carbono (Jenner, 2019; Song, 2017). Medios de cultivo MGY y medio caldo nutriente con glicerol, rayaduras de coco y caldo papa dextrosa fueron empleados para la producción de ácido bongkrékico y enaciloxinas en *B. gladioli* pv. *cocovenenas* HKI 10521 (Moebius, 2012). Se desconoce si los antimicrobianos mencionados anteriormente puedan ser biosintetizados en medio LB o PSUC por otras cepas de la bacteria *B. gladioli*. Existe una alta probabilidad de que los metabolitos antimicrobianos producidos en medio PSUC y LB por nuestro modelo de estudio estén relacionados a compuestos distintos a los ya reportados en otros estudios.

Para verificar el potencial de biosíntesis de AB en *B. gladioli* UAPS07070 se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región de aproximadamente 433 pb entre los genes *bonA* y *bonB* (codifican dos policétido sintasas importantes en la biosíntesis de AB). Bajo diferentes condiciones de amplificaciones por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

En nuestro modelo de estudio no se logró obtener el amplicón de los genes *bonAB* (datos no mostrados) sugiriendo fuertemente que la cepa UAPS07070 no tiene la capacidad de producir AB. Nuestra evidencia fue reforzada con el análisis bioinformático en el cual se realizó la búsqueda de los genes *bonA* y *bonB* empleando la herramienta blast del NCBI (National Center for Biotechnology Information por sus siglas en inglés) en seis genomas completos de cepas *B. gladioli* los resultados muestran la presencia de los genes *bon* en solo dos cepas Co14 y BSR3, las cepas FDAARGOS\_188, KACC11889, FDAARGOS\_389 y ATCC10248 no mostraron secuencias genéticas relacionadas a la síntesis de AB (Tabla suplementaria). Sottorff y col. 2019 han descrito que dos cepas de *Streptomyces* aisladas de fuentes y lugares diferentes y que tienen clasificación filogenética idéntica a partir de secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA presentan dos juegos de genes de metabolitos secundarios. Uno que es idéntico en las dos cepas de *Streptomyces* y otro grupo de genes de metabolitos secundarios que parece ser específico de cada cepa. En este mismo estudio se argumentó que las cepas de *Streptomyces* tienen un origen común con especializaciones posteriores de acuerdo con el hábitat que ocupan y destacan la importancia de no descartar dos cepas clasificadas como iguales ya que aún representan una fuente diversa y putativa de nuevos metabolitos secundarios (Sottorff, 2019).

La distribución cosmopolita de *B. gladioli* y su gran habilidad para adaptarse a diferentes ecosistemas le ha permitido diversificar su genoma. El promedio del tamaño de los genomas completos de las seis cepas de *B. gladioli* de la base de datos del NCBI es de más de 8 Mpb, la cepa FDAARGOS\_389 (relacionada a pruebas médicas) presenta solo 8.2 Mpb mientras que la cepa BSR3 (fitopatógeno de arroz) tiene 9 Mpb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/3602?>). Estos datos aportan información clara sobre las diferentes cargas genéticas en las cepas de *B. gladioli* y su relación con la producción de metabolitos secundarios. En un estudio de análisis comparativo de los genomas de diferentes cepas de *B. gladioli* se reportó que el número de genes específicos para la cepa BSR3, 3848s\_5, NBRC 13770 y UCD-UG\_CHAPALOTE de este microorganismo es de 514, 647, 683 y 524 genes respectivamente (Seo, 2015). En otros estudios de análisis comparativo de genomas de diferentes cepas de la misma especie

bacteriana (*Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia glumae*, varias especies de *Bacillus* y *Streptomyces rimus*) también han reportado diferencias en el tamaño de los genomas y genes específicos para cada cepa de la misma bacteria (Hernández-Salmerón, 2017; Seo, 2015; Kim, 2017; Park, 2019). Aparentemente la plasticidad genómica en una misma especie bacteriana no es exclusiva de un sólo microorganismo y ésto es un reflejo de la constante evolución a las cuales se someten los organismos vivos para adaptarse y aumentar sus probabilidades de éxito en los ambientes que ellos habitan.

Con el objetivo de detectar genes asociados a la producción de enaciloxinas en nuestro modelo de estudio se diseñaron oligonucleótidos que amplifican 550 pb del gen *Bamb\_5919* que codifica para una policétido sintasa involucrada en la síntesis de un intermediario de cadena carbonada de tipo polienol en la biosíntesis de enaciloxinas en *B. ambifaria* AMMD. EL amplicón del gen *Bamb\_5919* en el fondo genético de *B. gladioli* UAPS07070 no fue detectado mediante PCR (Datos no mostrados). La búsqueda bioinformática del gen *Bamb\_5919* en los seis genomas completos de *B. gladioli* de la base de datos del NCBI reveló la presencia de este gen únicamente en la cepa Co14, una cepa relacionada a intoxicaciones severas por el consumo de alimentos contaminados con esta bacteria y de interés para el gobierno de China (Bioproyecto en el NCBI: [PRJNA500835](#)). La cepa de *B. gladioli* pv. *cocovenenas* HKI 10521 (DSM 11318; ATCC 33664) productora de enciloxinas también es una bacteria de interés sanitario en la producción de alimentos en el sureste asiático (Ross, 2014). Nuevamente la ausencia del material genético para la síntesis del metabolito secundario enciloxina en cinco de seis de los genomas completos de *B. gladioli* correlaciona con la plasticidad genética y los genes específicos de cepa a nivel intra-especie discutidos anteriormente.

Song y col. 2017 reportaron a partir de la secuenciación del genoma de la cepa BCC0238 y su comparación con los genomas de las bacterias patógenas de arroz de *B. gladioli* cepas BSR3 (genoma completo) y 3848S-5 (secuencias draft) y la cepa NBRC 13700 (secuencias draft) de interés médico, que los genes para la biosíntesis de gladiolina solamente se encuentran en la cepa BCC0238 y en la cepa NBRC 13700 (Song, 2017). Sus análisis también revelaron mayor variabilidad genética en el cromosoma dos con respecto

al cromosoma uno (Song, 2017). Se conoce que el gen *icoA* (síntesis de Icosalide A1), con un tamaño de 15 kb codifica para una sintasa de péptidos no ribosomales, se encuentra localizado en el cromosoma dos de la cepa BCC0238 y su detección por PCR fue positiva para las cepas de *B. gladioli* BCC0252, BCC1677, BCC1698 y BCC1720 en las cuales también se detectó la producción de icosalide A1. La cepa BCC1713 de *B. gladioli* no presentó producción del antibiótico ni amplificación del gen *icoA* (Jenner, 2019). La búsqueda del gen *icoA* en los seis genomas completos de *B. gladioli* de la base de datos del ncbi reveló la presencia del gen en cinco cepas ATCC 10248 (interés médico), FDAARGOS\_188 (diagnóstico médico), FDAARGOS\_389 (diagnóstico médico), en KACC 11889 (fitopatógeno) y en Co14 (intoxicación en alimentos). En el genoma de *B. gladioli* BSR3 (fitopatógeno de arroz) no se localizó *icoA*. No se realizó la detección de gladiolina e icosalide A1 a nivel genético o por la producción del metabolito *in vitro* en la bacteria de este estudio, cepa UAPS07070.

Mediante análisis bioinformáticos se encontraron genes ortólogos para biosíntesis de caryoynencin y toxoflavina en el genoma de *B. gladioli* Lv-StA descritos previamente en los modelos de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia caryophylli* (Florez, 2017; Suzuki, 2004; Ross, 2014). No se han reportado genes para la síntesis de sinapigladioside producido por *B. gladioli* Lv-StA (Flórez, 2017). Los genes relacionados a la síntesis de etnangien en *Sorangium cellulosum* fueron propuestos por los Florez y col. 2017 como los responsables de la biosíntesis lagriene pero no aportaron evidencia experimental que respalde su hipótesis (Florez, 2017; Menche, 2008). Es importante señalar que los genes de biosíntesis de gladiolina en *B. gladioli* BCC0238 también están fuertemente relacionados a los genes de biosíntesis de etnangien en *Sorangium cellulosum* (Song, 2017). Mutaciones naturales en genes homólogos a nivel inter e intra-especie aportan diversidad en los metabolitos producidos, como ejemplo la producción de enaciloxinas IIa y IIIa por *B. ambifaria* AMMD y *B. gladioli* pv. *cocovenenas* HKI 10521 (Mahenthiralingam, 2011; Ross, 2014a) y producción de etnangien y gladiolina por *Sorangium cellulosum* y *B. gladioli* BCC0238 (Menche, 2008; Song, 2017). De acuerdo a la revisión bibliográfica los metabolitos antimicrobianos lagriene y gladiolina que poseen ciertas similitudes en sus cadenas carbonadas son sintetizados por

genes homólogos en diferentes cepas de la misma especie bacteriana, esta evidencia aportaría información relevante sobre la diversidad de los metabolitos secundarios sintetizados por genes homólogos con mutaciones naturales a nivel intra-especie. Lo cual además de ser un indicio de evolución del material genético que dará origen a nuevas especies bacterianas también apuntaría a la búsqueda estricta de nuevos metabolitos secundarios en bacterias de la misma especie. En nuestro modelo de estudio no se buscaron los genes para etnangien y caryoynencin. Los genes relacionados al clúster putativo para la biosíntesis de lagriamide (antifúngico) producido por la cepa no cultivable Lv-StB de *B. gladioli* (Floréz, 2018) no fueron buscados en nuestro modelo de estudio.

En seis de las trece mutantes no se detectaron genes relacionados a la síntesis de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas después de la comparación de los genes interrumpidos por el evento de transposición con la base de datos del NCBI. La mutante BG12 fue afectada en la producción de una proteína de tipo lectina con motivos de unión a fucosa. Las lectinas son proteínas de reconocimiento de carbohidratos (glicanos) producidas por todos los organismos vivos y son importantes para la interacción específica entre bacterias patógenas y sus hospederos en los procesos de infección (Polee, 2018). La bacteria ambiental *Burkholderia ambifaria* que pertenece al complejo de *Burkholderia cepacia* (Bcc) y que puede ser un patógeno oportunista, produce BambL una lectina de unión específica a oligosacáridos fucosilados. La fucosa se encuentra formando parte de la pared celular de plantas y de los glicoconjugados fucosilados del tejido pulmonar de pacientes con FQ. BambL desempeña una función importante en la adhesión de *B. ambifaria* a plantas y mamíferos (Audfray, 2012). Se conoce que *B. gladioli* es un patógeno oportunista en infecciones del tracto respiratorio al igual que los miembros del Bcc (Zlosnik, 2015; Kennedy, 2007). La proteína de tipo lectina con motivos de unión a fucosa identificada en la mutante BG12 de *B. gladioli* UAPS07070 podría participar en los procesos de adhesión e infección de tipo bacteria-planta y bacteria-humano y su expresión podría estar fuertemente relacionada a la regulación de otros factores de virulencia como es la toxoflavina. La toxoflavina presenta propiedades antimicrobianas y se le ha descrito como

una fitotoxina en el modelo de *B. glumae* y también es producida por *B. gladioli* (Jeong, 2003; Li, 2019).

Un gen relacionado a la expresión de la enzima glutamato deshidrogenasa fue interrumpido por el evento de transposición en la mutante BG33. El glutamato es un aminoácido que además de formar parte de las proteínas participa en la asimilación de nitrógeno, en la biosíntesis de aminoácidos, nucleósidos y de algunos metabolitos secundarios (Walker, 2016). La enzima glutamato deshidrogenasa participa en la producción de glutamato en una reacción de aminación reductora en la cual une al 2-oxoglutarato que es un intermediario del ciclo de Krebs con amonio empleando como donador de electrones al NADPH (Walker, 2016). Parte de la evidencia experimental de este trabajo muestra a la toxoflavina como metabolito secundario con propiedades antibacteriales contra gramnegativas y con varios átomos de nitrógeno en la estructura química de la molécula. La molécula guanosina trifosfato (GTP) es empleada como molécula inicial en los modelos propuestos para la síntesis de toxoflavina en *B. glumae* y *Pseudomonas protegens* Pf-5 (Suzuki, 2004; Philmus, 2015). Probablemente la síntesis de GTP y la asimilación de amonio en la mutante BG33 está disminuida favoreciendo que el GTP disponible sea empleado por el microorganismo para la síntesis de ADN durante su crecimiento en el medio de cultivo afectando considerablemente la producción de toxoflavina a través de vías de regulación desconocidas.

En la mutante BG41 se interrumpió un gen putativo que codifica una enzima NADH flavina oxidoreductasa / NADH oxidasa. La transferencia de electrones entre compuestos del nucleótido de nicotinamida (NADH y NADPH) a cofactores de flavinas libres (Riboflavina, FMN y FAD) es realizado por la enzima NADH flavina oxidoreductasa o Flavina reductasa (Fontecave, 1994). Las flavinas libres participan en reacciones enzimáticas de oxidoreducción, siendo la biosíntesis de antibióticos uno de los procesos biológicos a los que se les ha relacionado (Kendrew, 1995; Parry, 1997). En la ruta de biosíntesis del antibiótico valanimicina producido por *Streptomyces viridifaciens* se ha reportado un sistema enzimático de dos componentes, uno de los componentes es una flavina reductasa que aporta FAD reducido que es utilizado por el segundo componente la enzima

isobutilamina hidroxilasa que realiza la oxidación de isobutilamina a isobutilhidroxilamina. Éste último es un intermediario importante en la síntesis del antibiótico (Parry, 1997). El gen afectado en la mutante BG41 se encuentra en el cromosoma 1, que a su vez está presente en los seis genomas completos de *B. gladioli* de la base de datos del NCBI (cepas: BSR3, FDAARGOS\_389, FDAARGOS\_188, KACC 11889, ATCC 10248 y Co14) (datos no mostrados). Probablemente la participación de la Flavina reductasa de *Burkholderia gladioli* esté relacionada a procesos de biosíntesis de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Otra función putativa para el gen mutado en BG41 es como una enzima de tipo NADH oxidasa. Las NADH oxidasas tienen la capacidad de reducir oxígeno en presencia de NADH, existen dos tipos de NADH oxidasa, las que generan agua y las que generan peróxido de hidrógeno (Nishiyama, 2001). La toxoflavina fue el compuesto detectado en nuestro estudio como responsable de la actividad antagónica en contra de la bacteria *Acinetobacter* sp. UAPS0169. Se conoce que la toxoflavina actúa como un transportador de electrones en condiciones aerobias, este metabolito transfiere los electrones del NADH al oxígeno generando peróxido de hidrogeno e interrumpiendo la cadena transportadora de electrones en *E. coli* y *S. cerevisiae* (Latuasan, 1961). Se conoce que una enzima de tipo selenoproteína TrxR1 de mamíferos emplea como sustrato a la toxoflavina para generar peróxido de hidrogeno. Éste último incrementa el estrés oxidativo en las células de mamíferos aumentando su citotoxicidad (Gencheva, 2018). TrxR1 utiliza equivalentes de NADPH reducidos y con intervención de la toxoflavina como sustrato reducen el oxígeno a peróxido de hidrogeno (Gencheva, 2018). Probablemente la NADH oxidasa putativa de *B. gladioli* UAPS07070 utiliza el exceso de NADH o NADPH de su metabolismo para generar agua. De esta manera impediría que la toxoflavina producida por ella genere peróxido de hidrogeno evitando así su propio envenenamiento. Las NADH oxidasas también están implicadas en el reciclaje de NADH reducido a NAD oxidado manteniendo el balance de las coenzimas en la bacteria *Lactobacillus brevis* (Fang, 2015). Si la NADH oxidasa de *B. gladioli* ayuda a reciclar el NADH reducido, la inactivación del gen en la mutante BG41 por el evento de transposición favorecería la acumulación de NADH en

esta mutante la cual reprimiría la producción de toxoflavina impactando en su potencial antagónico y posiblemente en su potencial fitopatógeno.

El análisis bioinformático reveló que el transposón *Himar1* se insertó a 647 nucleótidos del primer ATG en un ORF (del inglés Open reading frame) que codifica para una proteína reguladora transcripcional putativa de la familia LysR (322 a.a.) en la mutante BG79. Se localizaron homólogos del gen *lysR* de la mutante BG79 en el cromosoma 2 en todos los genomas completos de *B. gladioli* (cepas: BSR3, FDAARGOS\_389, FDAARGOS\_188, KACC 11889, ATCC 10248 y Co14) de la base de datos del NCBI. La familia de reguladores transcripcionales de tipo LysR (LTTR por sus siglas del inglés) actúan como represores o activadores sobre genes a nivel local o global (Maddocks, 2008). Aparentemente el gen *lysR* de *B. gladioli* UAPS07070 funciona como un activador transcripcional en la síntesis de metabolitos antimicrobianos en medio rico LB por vías desconocidas. No se detectaron ni producción exógena de toxoflavina ni transcripción del gen *toxA* (metiltransferasa) en la mutante BG79, a diferencia de la cepa silvestre UAPS07070. Nuestros datos indican que la inactivación del gen *lysR* está relacionada a la biosíntesis de toxoflavina en la cepa UAPS07070. En el modelo de *Burkholderia glumae* la bacteria filogenéticamente más cercana a *B. gladioli* se ha reportado que los operones *toxABCDE* (síntesis de toxoflavina) y *toxFGHI* (transporte de toxoflavina) son activados por un regulador de tipo LysR nombrado ToxR en presencia de toxoflavina como coinductor (Kim, 2004). ToxR también actúa como regulador positivo en la producción de toxoflavina en *Pseudomonas protegens* Pf-5 (Philmus, 2015). Se conoce que las proteínas reguladoras LysR tienen un dominio de unión a ADN (HTH: del inglés helix-turn-helix) en su extremo amino terminal y un dominio de unión a coinductor en su extremo carboxilo terminal (Maddocks, 2008). Al comparar la proteína ToxR (ID: BAB88912.1) de *B. glumae* con la proteína putativa LysR (ID: AXB88396.1) de *B. gladioli* UAPS07070 se obtuvo un porcentaje de identidad bajo (menor al 30%). En relación a estas observaciones surge la hipótesis de que ToxR y la LysR putativa emplean diferentes moléculas coinductoras en la regulación de la biosíntesis de toxoflavina en *B. gladioli* UAPS07070. Como ya se mencionó el gen de la LysR putativa se encuentra en el cromosoma 2 mientras que el gen de ToxR se encuentra en el cromosoma 1 en los genomas

de *B. gladioli*. Se ha reportado que algunos LTR pueden ser activadores transcripcionales a nivel local de genes transcritos divergentemente al gen que codifica al LTR (Maddocks, 2008). El análisis bioinformático en los genomas de *B. gladioli* muestran que el gen *lysR* no forma parte de ningún operón. El gen *lysR* se encuentra flanqueado por un operón con transcripción opuesta a él, este operón codifica para proteínas putativas de transporte como proteínas la familia OmpC, porinas, transportadores de la superfamilia MFS, entre otras. Esta evidencia fuertemente sugiere que parte del posible regulón del regulador putativo LysR de UAPS07070 está relacionado con un mecanismo de transporte en específico con la excreción de toxoflavina.. Observaciones previas en los genes de transporte de toxoflavina *toxFGH* (*toxF*: transportadores tipo RND; *toxG*: proteína MF; *toxH*: proteína transportadora de tipo RND) de *B. glumae* muestran que mutaciones en estos genes disminuyen el crecimiento de la bacteria probablemente por acumulación del compuesto debido a su baja tasa de bombeo al exterior (Kim, 2004). También se observó que la adición exógena de toxoflavina detiene el crecimiento de las mutantes *toxFGH* de *B. glumae* (Kim, 2004). En la mutante de *P. protegens* Pf-5 con deleciones en los genes de transporte *toxG* y *toxH* se reportó disminución del 23% en la producción de toxoflavina y no se observaron alteraciones en la expulsión del metabolito al medio de cultivo (Philmus, 2015). No se detectaron cambios en la acumulación de toxoflavina en la mutante *toxGH* en comparación con la cepa silvestre Pf-5 de *P. protegens* (Philmus, 2015). La mutante BG79 no muestra alteraciones en su crecimiento en medio LB en comparación con la cepa silvestre UAPS07070. Esta evidencia sugiere que la proteína putativa LysR podría estar participando en la regulación de los sistemas de transporte y síntesis de toxoflavina por mecanismos aún no esclarecidos en nuestro modelo de estudio.

Dos de las inserciones del transposón *Himar1* se ubicaron en la región de Quorum sensing (QS), una en un regulador TofR y la otra en una N-acil homoserina lactona sintasa TofI, en las mutantes BG87 y BG1232, respectivamente. Los productos proteicos de los genes homólogos *tofi* y *tofR* en *B. glumae* BGR1 son responsables de regular la producción de toxoflavina, uno de los mayores factores de virulencia de este patógeno bacteriano en el cultivo de arroz (Kim, 2004). De acuerdo al modelo propuesto por Kim y col. 2004, la N-

octanoil homoserina lactona (C8-HSL) sintetizada por TofI a nivel basal se acumula en el ambiente hasta concentraciones críticas al aumentar la población bacteriana. A esa concentración el C8-HSL se une al regulador TofR formando el complejo TofR-C8-HSL, el complejo actúa como regulador positivo para los genes *tofl* y *toxJ* (Regulador transcripcional tipo LuxR), ToxJ junto con el complejo ToxR-toxoflavina activan la transcripción de los operones *toxABCDE* (síntesis) y *toxFGHI* (transporte) de toxoflavina (Kim, 2004). A diferencia de la cepa silvestre las mutantes BG87 y BG1232 fueron incapaces de producir (transcripción del gen *toxA* negativa) y liberar (no se detecta en agar LB) toxoflavina. La incapacidad de síntesis de toxoflavina por las mutantes *tofl* y *tofR* de *B. gladioli* UAPS07070 se vio reflejada en la disminución de su fenotipo de antibiosis en contra de diferentes bacterias sensibles en ensayos de antagonismo en medio LB. A través de análisis transcriptómico (RNA-seq data) de un mutante *tofl* (COK94) de *B. gladioli* BSR3 (patógeno de arroz) se ha reportado que la producción y transporte de toxoflavina es dependiente de QS de tipo N-acil homoserina lactona (Kim, 2014). En placas de agar LB la mutante COK94 no produjo el pigmento amarillento (toxoflavina) a diferencia de BSR3 y COK94 complementada (Kim, 2014). Se ha observado que la delección natural de los genes *tofIMR* del sistema de QS en la cepa KACC 11889 de *B. gladioli* (aislada de gladiola) impide la producción de toxoflavina, la cual es restituida cuando se le introducen los genes *tofIMR* de *B. gladioli* BSR3 o *B. glumae* BGR1 (Lee, 2016). Nuestro análisis en los genomas completos de *B. gladioli* de los genes *tofl* y *tofR* reveló la presencia de estos genes en las cepas BSR3, Co14 y FDAARGOS\_389 pero no en las cepas FDAARGOS\_188, KACC 11889, ATCC 10248. Kim y col. 2014 también observaron que un operón (*bgla\_2g02250* and *bgla\_2g02270-300*) para la síntesis de un metabolito secundario de tipo policétido putativo relacionado al antibiótico bacillaeno es dependiente del sistema de QS en *B. gladioli* BSR3 (Kim, 2014). La búsqueda por BLAST de los genes *bgla\_2g02270-300* de *B. gladioli* BSR3 mostró que solamente dos (cepas: BSR3 y FDAARGOS\_389) de los seis genomas completos de *B. gladioli* poseen estos elementos genéticos. Suponemos que la actividad antagónica residual de las mutantes BG87 y BG1232 en contra de la cepa sensible *Acinetobacter* sp. UAPS0169 se debe a la producción de otro de los múltiples metabolitos antimicrobianos ya caracterizados en

otras cepas de *B. gladioli* o posiblemente a la producción residual del compuesto bacillaeno putativo.

El ensamble de las secuencias de los genes *tofR* y *tofl* de UAPS07070 mostró la localización del gen *tofM* entre ambos genes de QS. La organización topológica de los genes *tofRMI* corresponde al arreglo topológico M1 (*tofR* se transcribe divergentemente a *tofM* y *tofl*) de acuerdo con la clasificación topológica de genes de QS de tipo AHL (acil homoserina lactona) descritos en proteobacterias y *Burkholderia* (Gelencsér, 2012; Choudhary, 2013). El gen *tofM* es homólogo al gen *rsaM* el cual codifica para un regulador negativo del sistema de QS de tipo AHL en *Pseudomonas fuscovaginae* (Mattiuzzo, 2011). La inactivación de este gen en este patógeno de arroz se ha relacionado con disminución en su virulencia (Mattiuzzo, 2011). Se conoce que el ortólogo de *tofM* de UAPS07070 en *B. glumae* 336 gr-1 participa como regulador positivo en la producción de toxoflavina (Chen, 2012). Se ha reportado que en mutantes con deleciones de los genes *tofR* y *tofl* de la cepa 336 gr-1 se sintetiza toxoflavina únicamente cuando las mutantes son crecidas con inóculos elevados de aproximadamente  $10^{11}$  UFC/ml sobre agar LB o KB (Chen, 2012). Existe la probabilidad de que la actividad residual de antagonismo de las mutantes BG87 y BG1232 se deba a la participación de TofM como regulador positivo en la producción de toxoflavina.

En nuestro modelo de estudio detectamos expresión constitutiva del gen *tofl*. El arreglo topológico M1 de QS se ha encontrado en genomas de beta y gamaproteobacterias (Gelencsér, 2012). La topología M1 está presente en miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, en el grupo *B. pseudomallei* y en otras especies patógenas de *Burkholderia* pero no se le encontró en el grupo de *Burkholderia* ambientales y benéficas de plantas (Choudhary, 2013). El principal autoinductor de la topología M1 reportado para especies de *Burkholderia* es C8-HSL (Choudhary, 2013). La adición exógena de C8-HSL en mutantes defectivas del gen *tofl* en *B. glumae* BGR1 y 336G gr-1 restituye la producción de toxoflavina (Kim, 2004; Chen, 2012). Deleciones del gen *tofR* en *B. glumae* 336G gr-1 impiden la expresión del gen *tofl* y la consecuente producción de C8-HSL (Chen, 2012). Se ha reportado la producción de C8-HSL en las cepas ICMP11096 e ICMP12220 de *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* (Prashanth, 2011). La producción constitutiva de autoinductores en nuestro modelo de

estudio desempeña una función en la comunicación interespecie con otros microorganismos pertenecientes al filo proteobacteria debido a que la gran distribución de sistemas de QS con topología M1. En los genes *tofRMI* únicamente se encontraron cajas de pegado tipo Lux por análisis bioinformático a -80 y -36nt río arriba del inicio de la transcripción en los genes *tofl* y *tofM* de UAPS07070 respectivamente. En *B. glumae* BGR1 la expresión de *tofl* es activada por el complejo TofR-C8-HSL (Kim, 2004). Hasta la fecha no existen reportes de la autorregulación del sistema de QS en *B. gladioli*. Se conoce que dos de tres genes (*bpsI2* y *bpsI3*) que codifican para Acil homoserina lactona sintasas en *B. pseudomallei* son expresadas constitutivamente (Kiratisin, 2008). Aparentemente la expresión de *tofl* en UAPS07070 es independiente de TofR o del complejo TofR-C8-HSL. La síntesis constante de moléculas autoinducidas en UAPS07070 activaría la producción de toxoflavina previo a la fase estacionaria de crecimiento. Ésto estaría relacionado con la producción de compuestos antimicrobianos por *B. gladioli* en la fase exponencial de crecimiento (Marín-Cevada, 2012). Otra posible explicación es que *tofl* esté regulado por otros sistemas de regulación diferentes a TofR. Nuestros resultados no permiten deducir la participación de la proteína TofR en la regulación del gen *tofl* en UAPS07070.

El movimiento tipo swarming es un tipo de desplazamiento bacteriano sobre superficies sólidas o semisólidas efectuado de forma colectiva y que requiere de la producción de compuestos surfactantes y de la expresión de flagelos (Kearns, 2011). En *B. glumae* y *B. gladioli* se ha reportado que el swarming es dependiente del sistema de QS de tipo AHL (Lee, 2016, Kim, 2014; Nickzard, 2015). UAPS07070 puede desplazarse por movimiento tipo swarming (mostrando un patrón dendrítico de desplazamiento) a 30 °C pero no a 37 °C. Se conoce que *B. gladioli* BSR3 también exhibe movimiento tipo swarming dependiente del sistema de QS a 28 °C con un patrón distinto al dendrítico (Kim, 2014). La producción de biosurfactantes (rhamnolipidos) esenciales para el movimiento tipo swarming es dependiente del sistema de QS en el modelo de *B. glumae* (Nickzard, 2015). La expresión de genes relacionados a la síntesis de surfactantes de tipo rhamnolipidos no fue evaluada en nuestro modelo de estudio. En las mutantes BG1232, BG87 y BG79 el swarming fue abolido, tenemos la hipótesis que estos sistemas de regulación (QS y LysR) participan

en la activación y expresión de genes relacionados a la biosíntesis de surfactantes en UAPS07070.

Se conoce que la toxoflavina producida por *B. glumae* y *B. gladioli* es un factor de virulencia importante en enfermedades producidas a varios hospederos de plantas cultivadas en diferentes regiones del mundo (Jeong, 2003; Kim, 2004; Suzuki, 2004; Fory, 2014; Nandakumar, 2009; Lee, 2016). Nuestros resultados de ensayos *in vitro* evidenciaron la capacidad de UAPS07070 para inducir síntomas de enfermedad en bulbos de cebolla (síntomas de maceración del tejido) y hojas de platas de lechuga (pudrición blanda). En nuestro estudio sólo se evaluó el potencial patogénico de las mutantes de QS y del regulador LysR putativo. Las mutantes BG1232, BG87 y BG79 no mostraron alteraciones en la intensidad de la enfermedad con respecto a la cepa silvestre, sugiriendo que en bulbos cebolla la toxoflavina no desempeña una función de virulencia (no es sintetizada) o su biosíntesis es activada por mecanismos alternos al sistema de QS y al regulador LysR. Se conoce en otros genotipos de *B. gladioli* su capacidad para producir otros factores de virulencia. Entre estos se encuentran: las enzimas líticas como quinazas, lipasas, proteasas, gluconasas (Chowdhury, 2006; Elshafie, 2017; Zhu, 2019); sistema de secreción tipo dos (Chowdhury, 2006); EPL y la cadena O de los lipolisacáridos caracterizados de algunos patovares de *B. gladioli*, aunque su participación en los procesos de infección en plantas aun es desconocido (Kaczynski, 2005; De Felice, 2016; Knirel, 2011) y sistemas de secreción de tipo VI y efectores de tipo III detectados a partir de análisis bioinformáticos en los genomas de algunos genotipos de *B. gladioli* (Fory, 2014; Seo, 2015; Nguyen, 2018). Probablemente los síntomas de maceración en las escalas de cebolla sean el resultado de la combinación de múltiples factores de virulencia y su compleja red de regulación que involucraría la participación de sistemas de QS y al regulador de tipo LysR putativo. Las mutantes BG1232 y BG79 mostraron disminución en la inducción de pudrición blanda e hojas de cebolla con respecto a la cepa silvestre. En un experimento donde se inoculó toxoflavina pura (sin la presencia del microorganismo que la produce) a diferentes plantas se observó que induce síntomas de enfermedad en hojas de gladiola y orquídeas, bulbos de cebolla y plantas de arroz, pero no induce síntomas a tubérculos de papa (Iiyama, 1998).

Creemos que la disminución en la severidad de los síntomas en hojas de lechuga producida por las mutantes por inserción del transposón en los genes *tofl* y *lysR* está fuertemente relacionada a la disminución en la producción de toxoflavina en nuestro modelo de estudio. En la mutante BG87 la expresión constitutiva del gen *tofl* y la síntesis de moléculas autoinductoras correspondientes podrían estar regulando mecanismos de virulencia independientes a toxoflavina. Se conoce que la cepa KACC11889 de *Burkholderia gladioli* ha perdido por una deleción natural los genes *tofRMI* de su sistema de QS y no es capaz de producir de toxoflavina *in vitro* (Lee, 2016). Sorprendentemente la cepa KACC11889 aún es capaz de producir enfermedad en escalas de bulbo de cebolla, pero no induce enfermedad en arroz. Cuando los genes *tofRMI* son introducidos en la cepa KACC11889 ésta aumenta su virulencia a bulbos de cebolla y se convierte en patógena para las plantas de arroz (Lee, 2016). También se ha reportado que por la inactivación del sistema de QS en dos cepas patógenas de plantas de arroz *B. gladioli* BSR3 y *B. glumae* BGR1 pierden su virulencia a bulbos de cebolla, y su capacidad de sintetizar toxoflavina (Kim, 2004; Kim, 2014; Lee, 2016). También se conoce que la cepa 237-5 de *B. glumae* no produce toxoflavina pero mantiene su virulencia en bulbos de cebolla (Karki, 2012). Algunos de estos datos indican que la maceración en el tejido de cebolla no es exclusiva de la toxoflavina.

La cepa de este estudio fue aislada como endófito de un fruto de piña cultivado en el estado de Veracruz, México y el microorganismo no induce síntomas de enfermedad en este cultivo (Marín-Cevada, 2010). No obstante, en esa misma región se ha reportado por primera vez que un genotipo de *B. gladioli* produjo enfermedad en la variedad de maíz comercial Asgrow-7573 (Gijon-Hernandez, 2011). Otro genotipo de *B. gladioli* fue reportado como el agente responsable de producir la enfermedad piel resbaladiza en cebollas almacenadas en el estado de Sinaloa (Félix-Gastélum, 2017). Mientras que un genotipo más de *B. gladioli* se encuentra como endófito en granos de maíz de la variedad Chapalote cultivado desde tiempos ancestrales en el norte del nuestro país, esta bacteria le confiere protección a la semilla del maíz contra hongos fitopatógenos (Rioux, 2014; Shehata, 2016). Es claro que *B. gladioli* se encuentra ampliamente distribuida en el territorio mexicano y su

potencial como patógeno de plantas es muy alto como ya se demostró para la cepa UAPS07070.

## 8. CONCLUSIONES

La biosíntesis de toxoflavina en agar LB es dependiente del sistema de Quorum Sensing de tipo acil homoserina lactona en *Burkholderia gladioli* UAPS07070.

La biosíntesis de toxoflavina por *Burkholderia gladioli* UAPS07070 en agar LB es dependiente de un regulador LysR putativo.

La expresión del gen *tofl* es independiente del regulador TofR en *B. gladioli* UAPS07070.

El fenotipo de antibiosis de *B. gladioli* UAPS07070 es reprimido cuando se inactiva alguno de los siguientes genes: gen para una enzima lactato deshidrogenasa putativa, gen para una enzima NAD(P)H flavina oxidoreductasa putativa y gen para una proteína putativa de tipo lectina de unión a fucosa.

La toxoflavina producida por *B. gladioli* UAPS07070 presenta actividad antibacteriana en contra de *Acinetobacter* sp. UAPS0169

En *B. gladioli* UAPS07070 el movimiento tipo swarming es dependiente del sistema QS de tipo AHL y del regulador LysR putativo.

*Burkholderia gladioli* UAPS07070 induce síntomas de enfermedad en bulbos de cebolla y plantas de lechuga.

## 9. PERSPECTIVAS

Secuenciar el genoma completo de *B. gladioli* UAPS07070.

Realizar análisis bioinformático en búsqueda de genes potenciales para la síntesis de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano en el genoma de *B. gladioli* UAPS07070.

Buscar en la banca de mutantes de UASP07070 clonas que estén afectadas en el fenotipo de antibiosis en medios de cultivo mínimos.

Realizar análisis comparativo del genoma de UASP07070 con otros genomas completos de *B. gladioli* en búsqueda de genes relacionados a patogenicidad y genes específicos de la cepa UAPS07070.

Realizar experimentos en plantas de interés agrícola y malezas para detectar las capacidades patógenas, benevolentes y reservorios naturales de la cepa UAPS07070.

Realizar experimentos de funcionalidad de las proteínas LysR, NAD(P)H Flavina oxidoreductasa, Glutamato deshidrogenasa y Lectina de unión a fucosa en *B. gladioli* UAPS07070.

Monitorear la producción de toxoflavina en planta dependiente de QS e independiente de QS por la cepa UAPS07070.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adamek, M., Spohn, M., Stegmann, E., & Ziemert N. (2017). Mining Bacterial Genomes for Secondary Metabolite Gene Clusters. *Methods Mol Biol*, 1520, 23–47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_2).
- Anwar, M., Kasper, A., Steck, A. R., & Schier, J. G. (2017). Bongkrekic Acid—a Review of a Lesser-Known Mitochondrial Toxin. *Journal of Medical Toxicology*, 13(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s13181-016-0577-1>
- Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., Lung, L. T. T., Ling, K. H., Sekawi, Z., Pei, C. P., & Ghaznavi-Rad, E. (2012). Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm. *Gene*, 494(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.12.010>
- Attafuah, A. & Bradbury, J. F. (1989). *Pseudomonas antimicrobica*, a new species strongly antagonistic to plant pathogens. *J Appl Bacteriol*, 67, 567–573.
- Audfray, A., Claudinon, J., Abounit, S., Ruvoën-Clouet, N., Larson, G., Smith, D. F., ... Imberty, A. (2012). Fucose-binding lectin from opportunistic pathogen *Burkholderia ambifaria* binds to both plant and human oligosaccharidic epitopes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4335–4347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314831>
- Bae, Y. S., Park, K., & Choi, O. H. (2007). Laboratory culture media-dependent biocontrol ability of *Burkholderia gladioli* strain B543. *Plant Pathology Journal*, Vol. 23, pp. 161–165. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2007.23.3.161>
- Baral, B., Akhgari, A., & Metsä-Ketelä, M. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>
- Beattie G.A. (2007) Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: Gnanamanickam S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. Pp 1–56. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_1)
- Bharti, P., Anand, V., Chander, J., Singh, I. P., Singh, T. V., & Tewari, R. (2012). Heat stable antimicrobial activity of *burkholderia gladioli* or1 against clinical drug resistant isolates. *Indian Journal of Medical Research*, 135(5), 666–671.
- Bisacchi, G. S., Hockstein, D. R., Koster, W. H., Parker, W. L., Rathnum, M. L., & Unger, S. E. (1987). Xylocandin: A new complex of antifungal peptides II. Structural studies and chemical modifications. *The Journal of Antibiotics*, 40(11), 1520–1529. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1520>
- Burkhead, K. D., Schisler, D. A., & Slininger, P. J. (1994). Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2031–2039.

- Bustillos-Cristales, M. D. R., Corona-Gutierrez, I., Castañeda-Lucio, M., Águila-Zempoaltécatl, C., Seynos-García, E., Hernández-Lucas, I., ... Fuentes-Ramírez, L. E. (2017). Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia macrocephala* possess the locus *xoxF* and consume methanol in the presence of  $Ce^{3+}$  and  $Ca^{2+}$ . *Microbes and Environments*, 32(3), 244–251. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17070>
- Chambers, C. E., Lutter, E. I., Visser, M. B., Law, P. P. Y., & Sokol, P. A. (2006). Identification of potential CcpR regulated genes using a ccp box motif-based search of the *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiology*, 6, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-104>
- Chan, Y. A., Podevels, A. M., Kevany, B. M., & Thomas, M. G. (2009). Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, 26(1), 90–114. <https://doi.org/10.1039/b801658p>
- Chapalain, A., Vial, L., Laprade, N., Dekimpe, V., Perreault, J., & Déziel, E. (2013). Identification of quorum sensing-controlled genes in *Burkholderia ambifaria*. *MicrobiologyOpen*, 2(2), 226–242. <https://doi.org/10.1002/mbo3.67>
- Chen, R., Wong, H., & Burns, B. (2019). New Approaches to Detect Biosynthetic Gene Clusters in the Environment. *Medicines*, 6(1), 32. <https://doi.org/10.3390/medicines6010032>
- Chen, R., Barphagha, I. K., Karki, H. S., & Ham, J. H. (2012). Dissection of Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia glumae* Reveals Non-Canonical Regulation and the New Regulatory Gene *tofM* for Toxoflavin Production. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052150>
- Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G., & Boivin-Masson, C. (2003). Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by  $\beta$ -Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7266–7272. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7266-7272.2003>
- Chowdhury, P. R., Chowdhury, P. R., Heinemann, J. a, & Heinemann, J. a. (2006). The General Secretary Pathway of. *Microbiology*, 72(5), 3558–3565. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3558>
- Choudhary, K. S., Hudaiberdiev, S., Gelencsér, Z., Gonçalves Coutinho, B., Venturi, V., & Pongor, S. (2013). The organization of the quorum sensing luxI/R family genes in *Burkholderia*. *Int J Mol Sci.*, 14(7), 13727–47. <https://doi.org/10.3390/ijms140713727>.
- Chuenchitt, S., Dhirabhava, W., Karnjanarat, S., Buangsuwon, D. et al. (1983). New bacterial disease on orchids *Dendrobium* sp. caused by *Pseudomonas gladioli*. *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, 17(1), 26–36.
- Coenye, T., Gillis, M., & Vandamme, P. (2000). *Pseudomonas antimicrobica* Attafuah and Bradbury 1990 is a junior synonym of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2135–2139. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2135>
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5(9), 719–729. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x>
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., & Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 607–626. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00113.x>

- Costa, J. F. de O., Assunção, I. P., Lima, G. S. de A., Muniz, M. de F. S., & Luz, E. D. M. N. (2016). Primeiro relato de *Phytophthora nicotianae* causando podridão em raízes de gravioleira no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(3). <https://doi.org/10.1590/0100-29452016>
- Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T., & Swings, J. (2001). Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*, 91, 282–292. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.3.282>
- De Felice, A., Silipo, A., Scherlach, K., Ross, C., Hertweck, C., & Molinaro, A. (2016). Structural and Conformational Study of the O-Antigenic Portion of the Lipopolysaccharide Isolated from *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016(4), 748–755. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501308>
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6568–6572. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6568-6572.1990>
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.007>
- Di Santo, R., Costi, R., Artico, M., Massa, S., Lampis, G., Deidda, D., & Pompei, R. (1998). Pyrrolnitrin and related pyrroles endowed with antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8(20), 2931–2936. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00526-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00526-5)
- Dursun, A., Zenciroglu, A., Karagol, B. S., Hakan, N., Okumus, N., Gol, N., & Tanir, G. (2012). *Burkholderia gladioli* sepsis in newborns. *European Journal of Pediatrics*, 171(10), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s00431-012-1756-y>
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Bufo, S. A. (2013). MEDIUM OPTIMIZATION OF *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* ENHANCED THE PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES. *International Journal of Microbiology Research*, 5(3), 399–403. <https://doi.org/10.9735/0975-5276.5.3.399-403>
- Elshafie, H. S., Camele, I., Racioppi, R., Scrano, L., Iacobellis, N. S., & Bufo, S. A. (2012). In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some Phytopathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16291–16302. <https://doi.org/10.3390/ijms131216291>
- Elshafie, H. S., Sakr, S., Bufo, S. A., & Camele, I. (2017). An attempt of biocontrol the tomato-wilt disease caused by *Verticillium dahliae* using *Burkholderia gladioli* pv. *Agaricicola* and its bioactive secondary metabolites. *International Journal of Plant Biology*, 8(1), 57–60. <https://doi.org/10.4081/pb.2017.7263>
- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E., Briscoe, L., et al. (2018). Whole genome analyses suggests that *Burkholderia sensu lato* contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the *Burkholderiaceae*. *Genes* 9, 389. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
- Fang, B., Jiang, W., Zhou, Q., & Wang, S. (2015). Codon-optimized NADH oxidase gene expression and gene fusion with glycerol dehydrogenase for bienzyme system with cofactor regeneration. *PLoS ONE*, 10(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128412>

- Félix-Gastélum, F., Maldonado-Mendoza, I. E., Olivas-Peraza, N. G., Brito-Vega, H., Peñuelas-Rubio, O., & Longoria-Espinoza R. M. (2017). First Report of Slippery Skin Caused by *Burkholderia gladioli* in Stored Onion Bulbs in Mexico. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1370-PDN>
- Feng, J., Li, B., Jiang, X., Yang, Y., Wells, G. F., Zhang, T., & Li, X. (2013). Antibiotic resistome in a large-scale healthy human gut microbiota deciphered. *Environmental Microbiology*, *18*(11), 3896–3909. <https://doi.org/10.1111/1462-2920>
- Fiori, M., Ligios, V., & Schiaffino A. (2011). Identification and characterization of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathol. Mediterr*, *50*, 450–461. [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-8730](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8730)
- Flórez, L. V., Scherlach, K., Gaube, P., Ross, C., Sitte, E., Hermes, C., ... Kaltenpoth, M. (2017a). Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15172>
- Flórez, L.V., Kaltenpoth, M. (2017b). Symbiont dynamics and strain diversity in the defensive mutualism between *Lagria* beetles and *Burkholderia*. *Environ Microbiol.* *19*(9), 3674–3688. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13868>
- Flórez, L. V., Scherlach, K., Miller, I. J., Rodrigues, A., Kwan, J. C., Hertweck, C., & Kaltenpoth, M. (2018). An antifungal polyketide associated with horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in *Lagria villosa* beetles. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04955-6>
- Fontecave, M., Covès, J., & Pierre, J. L. (1994). Ferric reductases or flavin reductases?. *Biometals*, *7*(1), 3–8. PMID: 8118169
- Fory, P. A., Triplett, L., Ballen, C., Abello, J. F., Duitama, J., Aricapa, M. G., Prado, G. A., Correa, F., Hamilton, J., Leach, J. E., Tohme, J., & Mosquera, G. M. (2014). Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. *Phytopathology*, *104*(5): 436–444. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0186-R>.
- Gelencsér, Z., Choudhary, K. S., Coutinho, B. G., Hudaiberdiev, S., Galbáts, B., Venturi, V., & Pongor, S. (2012). Classifying the topology of AHL-driven quorum sensing circuits in proteobacterial genomes. *Sensors*, *12*, 5432–5444. <https://doi.org/10.3390/s120505432>
- Gencheva, R., Cheng, Q., & Arnér, E. S. J. (2018). Efficient selenocysteine-dependent reduction of toxoflavin by mammalian thioredoxin reductase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1862*(11), 2511–2517. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.05.014>
- Gijon-Hernandez, A., Teliz-Ortiz, D., Mejia-Sanchez, D., De La Torre-Almaraz, R., Cardenas-Soriano, E., De Leon, C., & Mora-Aguilera, A. (2011). Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. *Journal of Phytopathology*, *159*(5), 377–381. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01776.x>
- Gill, W. M., & Tsuneda, A. (1997). The interaction of the soft rot bacterium *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricola* with Japanese cultivated mushrooms. *Canadian Journal of Microbiology*, *43*(7), 639–648. <https://doi.org/10.1139/m97-091>
- Gnanamanickam, S. S. (2006). Preface. *Plant-Associated Bacteria*, (January 2006), vii. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7>

- Gokulan, k., Khare, S., & Cerniglia C. (2014). Production of Secondary Metabolites of Bacteria. Elsevier Ltd, 2, 1328–1334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00203-2>
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Gunjal, A., & Kapadnis, B. P. (2015). *Burkholderia gladioli*, an endophyte with plant growth promoting potential. (January 2013).
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., & Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis Miller. *Microbiological Research*, 167(6), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.004>
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hernández-Salmerón, J. E., Moreno-Hagelsieb, G., & Santoyo, G. (2017). Genome Comparison of Pseudomonas fluorescens UM270 with Related Fluorescent Strains Unveils Genes Involved in Rhizosphere Competence and Colonization. *Journal of Genomics*, 5(7), 91–98. <https://doi.org/10.7150/jgen.21588>
- Henderson P.J., & Lardy H.A. (1970). Bongkreic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. *J Biol Chem*, 25;245(6):1319–26. PMID: 4245638
- Hibbing, E., Fuqua, C., Parsek, M. & Peterson, S. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:15-21. <https://doi:10.1038/nrmicro2259>.
- Ibrahim, M., Tang, Q., Shi, Y., Almoneafy, A., Fang, Y., Xu, L., ... Xie, G. L. (2012). Diversity of potential pathogenicity and biofilm formation among Burkholderia cepacia complex water, clinical, and agricultural isolates in China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2113–2123. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1016-3>
- Iiyama, K., Furuya, N., Ura, H., & Matsuyama, N. (1998). Role of Phytotoxins in the Pathogenesis of Burkholderia Species. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 42(3–4), 289–293.
- Imataki, O., Kita, N., Nakayama-Imahiji, H., Kida, J. I., Kuwahara, T., & Uemura, M. (2014). Bronchiolitis and bacteraemia caused by Burkholderia gladioli in a non-lung transplantation patient. *New Microbes and New Infections*, 2(6), 175–176. <https://doi.org/10.1002/nmi2.64>
- Irschik, H., Schummer, D., Höfle, G., Reichenbach, H., Steinmetz, H., & Jansen, R. (2007). Etnangien, a macrolide-polyene antibiotic from Sorangium cellulosum that inhibits nucleic acid polymerases. *Journal of Natural Products*, 70(6), 1060–1063. <https://doi.org/10.1021/np070115h>
- Isnansetyo, A., Cui, L., Hiramatsu, K., & Kamei, Y. (2003). Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by Pseudomonas sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5), 545–547. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00155-9)

- Jenner, M., Jian, X., Dashti, Y., Masschelein, J., Hobson, C., Roberts, D. M., ... Challis, G. L. (2019). An unusual: Burkholderia gladioli double chain-initiating nonribosomal peptide synthetase assembles “fungal” icosalide antibiotics. *Chemical Science*, 10(21), 5489–5494. <https://doi.org/10.1039/c8sc04897e>
- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T., & Hwang, I. (2003). Toxoflavin produced by Burkholderia glumae causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Disease*, 87(8), 890–895. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.890>
- Jha, G., Tyagi, I., Kumar, R., & Ghosh, S. (2015). Draft genome sequence of broad-spectrum antifungal bacterium Burkholderia gladioli strain NGJ1, isolated from healthy rice seeds. *Genome Announcements*, 3(4), 5–6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00803-15>
- Jiao, Z., Kawamura, Y., Mishima, N., Yang, R., Li, N., Liu, X., & Ezaki, T. (2003). Need to Differentiate Lethal Toxin-Producing Strains of Burkholderia gladioli, Which Cause Severe Food Poisoning: Description of B. gladioli Pathovar cocovenenans and an Emended Description of B. gladioli. *Microbiology and Immunology*, 47(12), 915–925. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03465.x>
- Kaczynski, Z., Karapetyan, G., Evidente, A., Iacobellis, N. S., & Holst, O. (2006). The structure of a putative exopolysaccharide of Burkholderia gladioli pv. agaricicola. *Carbohydrate Research*, 341(2), 285–288. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.10.020>
- Kado, C. I. (2003). Pink Disease of Pineapple. *APSnet Feature Articles*, (March). <https://doi.org/10.1094/apsnetfeature-2003-0303>
- Karki, H. S., Shrestha, B. K., Han, J. W., Groth, D. E., Barphagha, I. K., Rush, M. C., ... Ham, J. H. (2012). Diversities in Virulence, Antifungal Activity, Pigmentation and DNA Fingerprint among Strains of Burkholderia glumae. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045376>
- Kearns D.B. (2011). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Keith, L. M., States, U., Agricultural, A., Basin, P., Sewake, K. T., Cooperative, H., ... Zee, F. T. (2004). *e - X tra \* Isolation and Characterization of Burkholderia gladioli from Orchids in Hawaii*.
- Kendrew, S. G., Harding, S. E., Hopwood, D. A., & Marsh, E. N. G. (1995). Identification of a flavin:NADH oxidoreductase involved in the biosynthesis of actinorhodin: Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, pp. 17339–17343. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17339>
- Kennedy, M. P., Coakley, R. D., Donaldson, S. H., Aris, R. M., Hohneker, K., Wedd, J. P., ... Yankaskas, J. R. (2007). Burkholderia gladioli: Five year experience in a cystic fibrosis and lung transplantation center. *Journal of Cystic Fibrosis*, 6(4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2006.10.007>
- Khanna, K., Jamwal, V. L., Gandhi, S. G., Ohri, P., & Bhardwaj, R. (2019a). Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in Lycopersicon esculentum under metal toxicity. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41899-3>
- Khanna, K., Jamwal, V. L., Sharma, A., Gandhi, S. G., Ohri, P., Bhardwaj, R., ... Ahmad, P. (2019b). Supplementation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) alleviates cadmium toxicity in

- Solanum lycopersicum* by modulating the expression of secondary metabolites. *Chemosphere*, 230, 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.072>
- Kim, J., Kim, J. G., Kang, Y., Jang, J. Y., Jog, G. J., Lim, J. Y., ... Hwang, I. (2004). Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology*, 54(4), 921–934. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04338.x>
- Kim, S., Park, J., Choi, O., Kim, J., & Seo, Y. S. (2014). Investigation of quorum sensing-dependent gene expression in *Burkholderia gladioli* BSR3 through rna-seq analyses. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 1609–1621. <https://doi.org/10.4014/jmb.1408.08064>
- Kim, Y., Koh, I., Young Lim, M., Chung, W. H., & Rho, M. (2017). Pan-genome analysis of *Bacillus* for microbiome profiling. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11385-9>
- Knirel Y.A. (2011). Structure of O-Antigens. In: Knirel Y., Valvano M. (eds) *Bacterial Lipopolysaccharides*. Springer, Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1_3)
- Kiratisin, P., & Sanmee, S. (2008). Roles and interactions of *Burkholderia pseudomallei* BpsIR quorum-sensing system determinants. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7291–7297. <https://doi.org/10.1128/JB.00739-08>
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M.II, & Peterson K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Kumar, R., Yadav, S. K., Swain, D. M., & Jha, G. (2018). *Burkholderia gladioli* strain NGJ1 deploys a prophage tail-like protein for mycophagy. *Microbial Cell*, 5(2), 116–118. <https://doi.org/10.15698/mic2018.02.617>
- Kyungseok, P., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2008). Rhizobial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 1095–1100.
- Latuasan, H. E., & Berends, W. (1961). On the origin of the toxicity of toxoflavin. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 52(3), 502–508. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90408-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90408-5)
- Lee, C. hoon, Kim, S., Hyun, B., Suh, J. woo, Yon, C., Kim, C., ... Kim, C. (1994). Cepacidine A, A novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 47(12), 1402–1405. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.47.1402>
- Lee, J., Park, J., Kim, S., Park, I., & Seo, Y. S. (2016). Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*. *Molecular Plant Pathology*, 17(1), 65–76. <https://doi.org/10.1111/mpp.12262>
- Leite, M., Pereira, A., Souza, A., Andrade, P., Barbosa, M., Andreote, F., ... Sobral, J. (2018). Potentially Diazotrophic Endophytic Bacteria Associated to Sugarcane are Effective in Plant Growth-promotion. *Journal of Experimental Agriculture International*, 21(3), 1–15. <https://doi.org/10.9734/jeai/2018/39963>
- Lestin, F., Kraak, R., & Podbielski, A. (2008). Two cases of keratitis and corneal ulcers caused by *Burkholderia gladioli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), 2445–2449. <https://doi.org/10.1128/JCM.02442-07>

- Li, X., Li, Y., Wang, R., Wang, Q., & Lu, L. (2019). Toxoflavin produced by *Burkholderia gladioli* from *Lycoris aurea* is a new broad-spectrum fungicide. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.00106-19>
- Lincoln, S. P., Fermor, T. R., Stead, D. E., & Sellwood, J. E. (1991). Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*. *Plant Pathology*, *40*(1), 136–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02302.x>
- Lopes, E. F., Da Costa, J. G., Wolf, I. R., Lima, J. P. de A., & Astolfi-Filho, S. (2018). Draft genome sequence of *Burkholderia gladioli* Coa14, a bacterium with petroleum bioremediation potential isolated from Coari Lake, Amazonas, Brazil. *Genome Announcements*, *6*(16), 14–15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00301-18>
- Maddocks, S. E., & Oyston, P. C. F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, *154*(12), 3609–3623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>
- Mahenthalingam, E., Song, L., Sass, A., White, J., Wilmot, C., Marchbank, A., ... Challis, G. L. (2011). Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *burkholderia ambifaria* genomic island. *Chemistry and Biology*, *18*(5), 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.01.020>
- Malghani, S., Chatterjee, N., Yu, H. X., & Luo, Z. (2009). Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(4), 893–900. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400021>
- Mamta, Rahi, P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R. K., & Tewari, R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, *46*(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.008>
- Mannaa, M., Park, I., & Seo, Y. S. (2019). Genomic features and insights into the taxonomy, virulence, and benevolence of plant-associated *burkholderia* species. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010121>
- Marín-Cevada, V., & Fuentes-Ramírez, L. E. (2016). PINK DISEASE, A REVIEW OF AN ASYMPTOMATIC BACTERIAL DISEASE IN PINEAPPLE. *Rev. Bras. Frutic*, *38*(3). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452016949>
- Marín-Cevada, V., Vargas, H.V., Juárez, M., López, V.G., Zagada, G., Hernández, S., Cruz, A., Caballero-Mellado, J., López-Reyes, L., Jiménez-Salgado, T., Carcaño-Montiel, M., & Fuentes-Ramírez, L.E. (2006). First report of the presence of *Pantoea citrea*, causal agent of Pink disease in pineapple fields grown in Mexico. *Plant. Pathol*, *55*: 294.
- Marín-Cevada, V., Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J., Mascarúa-Esparza, M. A., Castañeda-Lucio, M., Carreño-López, R., ... Fuentes-Ramírez, L. E. (2012). Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple. *Applied Soil Ecology*, *61*, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.014>
- Marín-Cevada, V. 2010. Ecología y control biológico en Pink disease en la piña. Tesis de Doctorado. CICM-ICUAP.

- Martínez-Gallegos, V., Bautista-Cruz, A., Martínez-Martínez, L., & Sánchez-Medina, P. S. (2018). First report of phosphate-solubilizing bacteria associated with *Agave angustifolia*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(6), 1298–1302. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0630>
- Mattiuzzo, M., Bertani, I., Ferluga, S., Cabrio, L., Bigirimana, J., Guarnaccia, C., Pongor, S., Maraite, H., & Venturi, V. (2011). The plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* contains two conserved quorum sensing systems involved in virulence and negatively regulated by RsaL and the novel regulator RsaM. *Environ Microbiol*, 13(1), 145–162. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02316.x>
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., ... Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- McCulloch, L. (1924). A bacterial blight of gladioli. *Journal of Agricultural Research*, 27(4), 225–229.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., ... Breitling, R. (2011). AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 339–346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Menche, D., Arikan, F., Perlova, O., Horstmann, N., Ahlbrecht, W., Wenzel, S. C., ... Müller, R. (2008). Stereochemical determination and complex biosynthetic assembly of etnangien, a highly potent RNA polymerase inhibitor from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Journal of the American Chemical Society*, 130(43), 14234–14243. <https://doi.org/10.1021/ja804194c>
- Miché, L., Faure, D., Blot, M., Cabanne-Giuli, E., & Balandreau, J. (2001). Detection and activity of insertion sequences in environmental strains of *Burkholderia*. *Environmental Microbiology*, 3(12), 766–773. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00251.x>
- Mirghasempour, S. A., Huang, S., & Xie, G. L. (2018). First Report of *Burkholderia gladioli* Causing Rice Panicle Blight and Grain Discoloration in China. *Plant Disease*, 102(12), 2635. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0758-PDN>
- Moebius, N., Ross, C., Scherlach, K., Rohm, B., Roth, M., & Hertweck, C. (2012). Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*. *Chemistry and Biology*, 19(9), 1164–1174. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.022>
- Medina-de la Rosa, G., López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M. G., López-Olguín, J. F., Hernández-Espinosa, M. Á., & Rivera-Tapia, J. A. (2016). Rhizosphere bacteria of maize with chitinolytic activity and its potential in the control of phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(11-12), 310–321. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1201345>
- Moon, H., Park, H. J., Jeong, A. R., Han, S. W., & Park, C. J. (2017). Isolation and identification of *Burkholderia gladioli* on *Cymbidium* orchids in Korea. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(2), 280–288. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1268069>
- Mulaw T. Field Response of Advanced Rice Entries to Bacterial Panicle Blight using *Burkholderia glumae*. ResearchGate. Longbeach, CA USA; 2018.

- Muñoz-Rojas, J., Fuentes-Ramírez, L. E., & Caballero-Mellado, J. (2005). Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiology Ecology*, *54*(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.011>
- Nagamatsu, T. (2001) Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin and their analogs. *Recent Res Devel Org Bioorg Chem*, *4*: 97–121. <https://doi.org/10.1002/chin.200245261>
- Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., ... Rush, M. C. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. *Plant Disease*, *93*(9), 896–905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
- Nguyen, T. T., Lee, H. H., Park, I., & Seo, Y. S. (2018). Genome-wide analysis of type VI system clusters and effectors in *Burkholderia* species. *Plant Pathology Journal*, *34*(1), 11–22. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.11.2017.0231>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2014). Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites - Fungi. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, (December), 570–578. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00202-0>
- Nickzad, A., Lépine, F., & Déziel, E. (2015). Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. *PLoS One*, *10*(6), e0128509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128509>
- Nishiyama, Y., Massey, V., Takeda, K., Kawasaki, S., Sato, J., Watanabe, T., & Niimura, Y. (2001). Hydrogen peroxide-forming NADH oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: Existence and physiological role in bacteria. *Journal of Bacteriology*, *183*(8), 2431–2438. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2431-2438.2001>
- Park, C. J., & Andam, C. P. (2019). Within-species genomic variation and variable patterns of recombination in the tetracycline producer *Streptomyces rimosus*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00552>
- Park, J., Lee, H.-H., Jung, H., & Seo, Y.-S. (2019). Transcriptome analysis to understand the effects of the toxoflavin and tropolone produced by phytopathogenic *Burkholderia* on *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*, *57*(9), 781–794. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9330-1>
- Parmeggiani, A., Krab, I. M., Watanabe, T., Nielsen, R. C., Dahlberg, C., Nyborg, J., & Nissen, P. (2006). Enacyloxin IIa pinpoints a binding pocket of elongation factor Tu for development of novel antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(5), 2893–2900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505951200>
- Parry, R. J., & Li, W. (1997). An NADPH:FAD oxidoreductase from the valanimycin producer, *Streptomyces viridifaciens*: Cloning, analysis, and overexpression. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(37), 23303–23311. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23303>
- Philmus, B., Shaffer, B. T., Kidarsa, T. A., Yan, Q., Raaijmakers, J. M., Begley, T. P., & Loper, J. E. (2015). Investigations into the Biosynthesis, Regulation, and Self-Resistance of Toxoflavin in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *ChemBioChem*, *16*(12), 1782–1790. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500247>

- Poole, J., Day, C. J., Von Itzstein, M., Paton, J. C., & Jennings, M. P. (2018). Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 440–452. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0007-2>
- Prashanth, S. N., Bianco, G., Cataldi, T. R. I., & Iacobellis, N. S. (2011). Acylhomoserine lactone production by bacteria associated with cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(21), 11461–11472. <https://doi.org/10.1021/jf202313j>
- Quecine, M. C., Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Shaffer, B. T., Henkels, M. D., Zabriskie, T. M., & Loper, J. E. (2016). An interspecies signaling system mediated by fusaric acid has parallel effects on antifungal metabolite production by *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 and antibiosis of *Fusarium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(5), 1372–1382. <https://doi.org/10.1128/AEM.02574-15>
- Raman, T., & Muthukathan, G. (2015). Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia Mediterranea*, *54*(2), 241–252. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Rholl, D. A., Trunck, L. A., & Schweizer, H. P. (2008). In vivo Himar1 transposon mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(24), 7529–7535. <https://doi.org/10.1128/AEM.01973-08>
- Rioux, R.A., Shultz, J., Garcia, M., Willis, D.K., Casler, M., Bonos, S., Smith, D. & Kerns, J. (2014). *Sclerotinia homoeocarpa* overwinters in turfgrass and is present in commercial seed. *PLoS One*, *9*(10), e110897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110897>
- Ross, C., Opel, V., Scherlach, K., & Hertweck, C. (2014a). Biosynthesis of antifungal and antibacterial polyketides by *Burkholderia gladioli* in coculture with *Rhizopus microsporus*. *Mycoses*, *57*(s3), 48–55. <https://doi.org/10.1111/myc.12246>
- Ross, C., Scherlach, K., Kloss, F., & Hertweck, C. (2014). The molecular basis of conjugated polyene biosynthesis in phytopathogenic bacteria. *Angewandte Chemie - International Edition*, *53*(30), 7794–7798. <https://doi.org/10.1002/anie.201403344>
- Ross, J. P., Holland, S. M., Gill, V. J., De Carlo, E. S., & Gallin, J. I. (1995). Severe burkholderia (*pseudomonas*) *gladioli* infection in chronic granulomatous disease: Report of two successfully treated cases. *Clinical Infectious Diseases*, *21*(5), 1291–1293. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.5.1291>
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Snchez, M., ... Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, *36*(2), 146–167. <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>
- Samo, G.E., et al. (2018) The First Documented Bongkreic Acid Poisoning in Africa, *Clinical Infectious Diseases*, *66*(9), 1400–1406. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1005>
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 5857–5864. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5857>

- Scuderi, G., Bonaccorsi, A., Panebianco, S., Vitale, A., Polizzi, G., & Cirvilleri, G. (2009). Some strains of burkholderia gladioli are potential candidates for postharvest biocontrol of fungal rots in citrus and apple fruits. *Journal of Plant Pathology*, *91*(1), 207–213. <https://doi.org/10.4454/jpp.v91i1.645>
- Segonds, C., Clavel-Batut, P., Thouverez, M., Grenet, D., Le Coustumier, A., Plésiat, P., & Chabanon, G. (2009). Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of Burkholderia gladioli. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(5), 1510–1516. <https://doi.org/10.1128/JCM.02489-08>
- Seo, Y. S., Lim, J. Y., Park, J., Kim, S., Lee, H. H., Cheong, H., ... Hwang, I. (2015). Comparative genome analysis of rice-pathogenic Burkholderia provides insight into capacity to adapt to different environments and hosts. *BMC Genomics*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1558-5>
- Seynos, G. E. 2013. IDENTIFICACIÓN DEL locus LIGADO A ANTAGONISMO POR Burkholderia gladioli UAPS07070. Tesis de Maestría. CICM-ICUAP.
- Shehata, H. R., & Raizada, M. N. (2017). A Burkholderia endophyte of the ancient maize landrace Chapalote utilizes c-di-GMP-dependent and independent signaling to suppress diverse plant fungal pathogen targets. *FEMS Microbiology Letters*, *364*(14), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx138>
- Silipo, A., & Molinaro, A. (2011). Lipid A Structure. Bacterial Lipopolysaccharides. In *Springer Verlag*. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1>
- Song, L., Jenner, M., Masschelein, J., Jones, C., Bull, M. J., Harris, S. R., ... Challis, G. L. (2017). Discovery and Biosynthesis of Gladiolin: A Burkholderia gladioli Antibiotic with Promising Activity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society*, *139*(23), 7974–7981. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b03382>
- Sottorff, I., Wiese, J., Lipfert, M., Preußke, N., Sönnichsen, F. D., & Imhoff, J. F. (2019). Different Secondary Metabolite Profiles of Phylogenetically almost Identical Streptomyces griseus Strains Originating from Geographically Remote Locations. *Microorganisms*, *7*(6), 166. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060166>
- Stoyanova, M., Georgieva, L., Moncheva, P., & Bogatzevska, N. (2013). Burkholderia gladioli and Pseudomonas marginalis pathogens of Leucojum aestivum. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *27*(5), 4069–4073. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0139>
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Microbial Ecology*, *63*(2), 249–266. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9929-1>
- Šubík, J., & Behúň, M. (1974). Effect of bongkrekic acid on growth and metabolism of filamentous fungi. *Archives of Microbiology*, *97*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1007/BF00403048>
- Suzuki, F., Sawada, H., Azegami, K., & Tsuchiya, K. (2004). Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of Burkholderia glumae. *Journal of General Plant Pathology*, *70*(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0096-1>
- Swain, D. M., Yadav, S. K., Tyagi, I., Kumar, R., Kumar, R., Ghosh, S., ... Jha, G. (2017). A prophage tail-like protein is deployed by Burkholderia bacteria to feed on fungi. *Nature Communications*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00529-0>

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K., & Matsuyama, N. (2006). Burkholderia gladioli associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *Journal of General Plant Pathology*, 72(2), 98–103. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0256-6>
- van Veen, A. G., and W. K. Mertens. (1934). Die Gifstoffe der sogenannten Bongkrek-vergiftungen auf Java. *Rec. Trav. Chim.* 53:257–268.
- Verstraete, B., Janssens, S., Smets, E., & Dessein, S. (2013). Symbiotic  $\beta$ -Proteobacteria beyond Legumes: Burkholderia in Rubiaceae. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055260>
- Vial, L., Groleau, M.C., Dekimpe, V., and Déziel, E. (2007). Burkholderia Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular Products. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:1407–1429. PMID: 18062218
- Walker, R., Emslie, K. A. & Allan, E. J. (1996). Bioassay methods for the detection of antifungal activity by Pseudomonas antimicrobica against the grey mould pathogen Botrytis cinerea. *J Appl Bacteriol*, 81, 531–537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03543.x>
- Walker, M. C., & van der Donk, W.A. (2016). The many roles of glutamate in metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43(2-3), 419–30. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1665-y>
- Watanabe, T., Sugiyama, T., Takahashi, M., Shima, J., Yamashita, K., Izaki, K., ... Seto, H. (1990). The Structure of Enacyloxin II, a Novel Linear Polyenic Antibiotic Produced by Gluconobacter sp. W-315. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 259–261. <https://doi.org/10.1271/abb1961.54.259>
- Whitby, P. W., Pope, L. C., Carter, K. B., LiPuma, J. J., & Stull, T. L. (2000). Species-specific PCR as a tool for the identification of Burkholderia gladioli. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 282–285.
- Wigley, P., & Burton, N. F. (2000). Multiple chromosomes in Burkholderia cepacia and B. gladioli and their distribution in clinical and environmental strains of B. cepacia. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 914–918. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01033.x>
- Wilmes, M., & Sahl, H. (2017). *Chapter 8 Determination of Bacterial Membrane Impairment*. 1520, 133–143. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., ... Arakawa, M. (1992). to the New Genus with the Type Species Burkholderia. *Microbiol. Immunol*, 36(12), 1251–1275.
- Yamaki, M., Miwa, M., Ishiguro, K., & Takagi, S. (1994). Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinols against Staphylococcus aureus. *Phytotherapy Research*, 8(2), 112–114. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650080214>
- Young, J. M., Dye, D. W. J., Bradbury, F., Panagopoulos, C. G., & Robbs C. F. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(1), 153–177. <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427397>

- Yu, Z., Yu, Z., Morrison, M., & Morrison, M. (2004). Comparisons of Different Hypervariable Regions of. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4800–4806. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4800>
- Zhou, F., Ning, H., Chen, F., Wu, W., Chen, A., & Zhang, J. (2015). Burkholderia gladioli infection isolated from the blood cultures of newborns in the neonatal intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(8), 1533–1537. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2382-1>
- Zhu, J., Liu, Y., Qin, Y., Pan, L., Li, Y., Liang, G., & Wang, Q. (2019). Isolation and Characterization of a Novel Bacterium Burkholderia gladioli Bsp-1 Producing Alkaline Lipase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(7), 1043–1052. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03045>
- Zhuang, Z., Zhang, L., Yang, C., Zhu, D., Mao, Q., Wang, Q., & Gao, S. (2019). Enhanced lincomycin A production by calcium gluconate feeding in fermentation of Streptomyces lincolnensis. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0266-4>
- Zlosnik, J. E. A., Zhou, G., Brant, R., Henry, D. A., Hird, T. J., Mahenthiralingam, E., ... Speert, D. P. (2015). Burkholderia species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada: 30 years' experience. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(1), 70–78. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201408-395OC>

# ANEXOS

## ANEXO I. Secuencias

### Gen *lysR* (BG79)

>MF325937.1 *Burkholderia gladioli* strain UAPS07070 transcriptional regulator (*lysR*) gene, complete cds

```
ATGGAATTGCGTCACTGCGGTTCTCGCCGTTGCCGAGGAAGGCCAGTTACCCGCGCCGCGGAGC
GGCTCGCCATGCAGCAGCCGCGCTGTGCGCAGCAGATTGCGCTGCTCGAGGAGGAAATCGGTTTCGACCT
GTTTCGTGCGGCAGCCGCGCGGCGTGGAGCTGACGCCGCGCGGGCGCGCCTTCGCGCAGAACCGGAACTG
GTGCTGGAAACCCTGCAGCAAGGTGTTGCACACGCGCGACGGATCGCGCGCGGCGAGCTGGGCACCATCG
CGGTGGGCCTGACCAGCTCGGCCGTTTCCACCCGATGACGACCGACGCGATCCGCGGCTTTTCGCGCCG
GCACCCCGGCATCGAGATCACGCTGGCCGAGCTGAACGCGGCCGAGTTGACCGAGCGGCTCGCCAACGGG
CAGCTACAGGTGGCCTTCTGCGCAAGCCGGTGGACACTCTGCCCGGCATCGCCTTCGAGCCGCTGCTCG
ACGAGCCGATGGTGGCGGTGCTGCCGGTCAGGCACCGGCTGCTGACGGCGATGGCCGAAGGCGACCCGCC
GCCGACGATCTCGCTGAAGGCGCTGGAGCATGAGGAATTCATCCTGGTTTCGGCGGCCCGCGCGCCGGG
ATGTATGCGGATTTTCTCGCCGCTGCCGGCGCCAGGGTTTCGTGCCGACGTCGCGCGCGAGGTGCCGC
GCATGCTGACCGGCATCCACATGGTGGCGGCCGACTGGGCGTGACGCTGGTGGCGGCTCGATGCGCCG
CTACGACCATCGCAGCGCGGTGTTCTGCCCGCTGGCCGACGACGCGCGTTCGTCGAGTTCGTGTTGCGGC
GCGCATCCGGCCGAGATGCGCGATCCGGCGGCGCGCGCTTCGTGAGTTCGTGTTGCGGCAGAAGGCGA
TGGCCGACGACGACGCGGATCGGCGCGGCAAGCGCGCGCCGACTCGGGCGAGGCCTGA
```

### Proteína LysR putativa (BG79)

>AXB88396.1 transcriptional regulator [*Burkholderia gladioli*]  
MELRHLRYFLAVAEEGQFTRAAERLAMQQPPLSQQIRLLEEEIGFDLFVRQPRGVELTPAGRAFAQNAEL  
VLETLQQGVAHARRIARGELGTIAVGLTSSAGFHPMTTDAIRGFRAAHPGIEITLAE LNAAELTERLANG  
QLQVAFLRKPVDTLPGIAFEPLLDPEMVAVLPVRRHLLTAMAEGDPPPTISLKALEHEEFILVRRPGAPG  
MYADFLAACRRQGFVPHVAREVPRMLTGIHMVAAGLVTLVPASMRRYDHRSVAVFCPLADDAGFSAPLHL  
AHPAEMRDPAAARFVEFVLRQKAMADDDADRRGKRGADSGEA

### Gen *tofRMI* (UAPS07070)

>KP123645.2 *Burkholderia gladioli* strain UAPS07070 putative quorum sensing gene locus, partial sequence

```
TCAGGGCGTCTCGATCAGGCCATGCCGATCGCCTTGACGACGGCCTGCACCTTGTGGTTCGCGCCGAGC
TTGGCGAGGATGTTGTTGATGTGGAAGGTGACGGTGCCTCGGAGATGTTGAGCTGCTCGCCGATCTCGC
TGGCGGTGCGGCCCTCGCTGGTCCAGCTCAGCACCTCGCGTTTCGCGCTTGGTGAGCGTCACGCTGGCCGC
CGGCGACAGCTTGGGCACCAGGAACCTGCCCATCAGCGAGTGCGAGAGATTGCCAGCCAGTTGGCCTGC
AGCGTGAGGCTGTTGATCTCGGCGGGCGTGAGGCGGTTCGGAGCGGCGCGGATGGTCAGCAGTCCGAACA
CGCCGCGCGCGGCCAGGCCGATTGCGCCACGCCGACCGACATGCCGAAGTTCGCGCGCGTTCGCGCCACAG
CGACGGATCCTCCGCGTATCGACATCCGGCCAGATGATCATGTTTCGGGCTCATCGCGCCGTCGCGCACG
GTCGGATCGACCTCGATGTAGTTGCGCGCCTGGTAATGGGCCATCCAGCCGGCCGGGTAGGTGTGGAAGA
TCTCGACCACCGGCTGCGTGCCCGGCTGCGGCACGCGAATGCCGTAGCAGCAGTACTCGAAACCGAGCCG
CTTCGAATAGGCCGAGATCTGCTGGAAGAGCTGTTGCTCGTTCGCGAGCCGCGTGAAGTGGTGGTAGGCA
TCCTGCCAGCGTAGTTCCATCATCTCTCCAACAGCTTCCACGCTGTTCATTCTTGCTAGGTTACATCACGG
TCACGGGCTTGCTACATTGCCGCGCATGACACTGCCCCGCTTCATCCTTACTGCGCGCCGTCGAAGGAC
GGTTACGTCGCGCCTCCCGCTGCATGCCTTCGCGGGGCTCGAACTCGTGCACATCGCCTCGGGGCTCGACC
CCGGGCTCGCCGACGAAGTGCAGCGCCGACGGCCTCGCCTTCGACGCGGCGGCTACACCGAGTGGCAGCG
```

TCCGTCCCTCGCCAGGTTTTCGCACACCTGACCGTCCGGCTGGGACTGGTATGTCGATCCCCGGCTCCGGCCGC  
CTGGTGATCGCCTGGGACGAAGTGCAGCAACCTGATGGGCGTCGACCGCTTCGGCACCGACATCGGCA  
TGCATGCCACCGCCAGCGCCCTGGGCTGTGGCTCGCCTCGCTCGACTGGGCGATGGCGGTCAACCAGGC  
CCTCACCGGGCCGCCGACCCGGCCAGTCTGCGGGCGCAACCCTGGTTCGCACTGAAACCCGCGGCC  
GCTTCGCATTTCAAACGAATGCCCTCGCATTGTGGTCCGACCCGGCCGACAACGCAATCTCGAAATTGA  
ACCACAGATGGCGCGCAAACCTTTGCGCGCCAATTTGACCTGTCAAGATTGCCTGGAAAGTGGCCCGAC  
CTCCTGTCAGGAATAACAGTTACTTGTCTCGGGGCGCGCGCTGTAATGCGCCCATTCCAAACGGAATAA  
CTACGAGGACACCATGCAGACTTACGTTACAGAGGCCGGCCGCTTTCCCCCAGCTCGCCGCCGATCTG  
GGGTCGTACCGCTATCGCGTTTTTCGTGAGCAGCTCGGCTGGCAGTTGCCGTCTGAAGACGATAAATACG  
AGCGGGATCAGTTCGATCGCGACGACACCGTCTATGTCGTGGGCGCGATACGAGCGGAGAAATCTGCGG  
CTGCGCGCGACTATTGCCGACCACGCGACCGTACCTGCTGCACGAGGTGTTCCCGCACCTGCTGTCGGCC  
GACATCGCGGGCGCCCCGCTCTCCCGAAGTGTGGGAATTGTCGCGTTTTTCGCGGCCACCCCGAGGACGGCG  
CCGACGCCGGCAGCCTGGCCTGGTGGTGGCGCGATGCTGGCCGCGGGTGAATGCGCGGCCCGCG  
CGGCGCCCGTCAACTGATCGGCGTGACCTTCTGCAGTATCGAGCGGCTGTTCCGCCGGATCGGCGTGCAC  
GCTCACCGGGCCGGCCACCGGTCTCGATCGACGGCCGATGGTGGTGGCCTGCTGGATCGACATCGACG  
CGCAGACGCTGGCCGCGCTCGACCTCGATCCCGCCCTCTGCCACGCCGAGCCCGCCGAAGCCGCTGA

#### Proteína TofR putativa (BG87)

>AKO73670.2 putative quorum sensing TofR regulator [*Burkholderia gladioli*]  
MMELRWQDAYHQFNAAANEQQLFQQISAYSKRLLGFEYCCYGIRVQPQPTQPVVEIFDTPAGWMAHYQAR  
NYIEVDPTVRDYGAMSPNMI IWPDVDTAEDPSLWRDARDFGMSVGVAAQSAWAARGVFGLLTIARRSDRLTP  
AEINSLTLQANWLANLSHSLMGKFLVPKLSPAASVTLTKREREVL SWTSEGRTASEIGEQLNISERTVTF  
HINNILAKLGATNKVQAVVKAIGMGLIETP

#### Proteína TofM putativa (UAPS07070)

>AKO73669.1 putative TofM regulator [*Burkholderia gladioli*]  
MTLPLLHPYCAPSKDGYVRLPLHAFAGLELVHIASGLDPGLADELRADGLAFDAAGYTEWQRPSPPGFAH  
LTVGWDWYVDPGSGRLVIAWDEVRSNLMGVDRFGTDIGMHATASALGCRLASLDWAMAVNQALTTGGPPTR  
PVCGANHWSH

#### Proteína TofI putativa (BG1232)

>AKO73668.2 putative AHL synthase [*Burkholderia gladioli*]  
MQTYVHEAGRLSPQLAADLGSYRYRVFVEQLGWQLPSEDDKYERDQFDRDDTVYVVGRDTSGEICGCARL  
LPTTRPYLLHEVFPHELLSADIAAPRSPEVWELSRFAATPEDGADAGSLAWSVRPMLAAAVECAARRGARQ  
LIGVTFCSIERLFRRIGVHAHRAGPPV SIDGRMVVACWIDIDAQTLAALDLDPALCHAEPAEAA

#### Gen *lectina de unión a fucosa* (BG12)

> *Burkholderia gladioli* strain UAPS07070

TTATGATWGGCCCGGTTCCCTGGCTGTGCGCCGATGAACAGCTTGATGTGCTGCTGCTCGGCGGCATTGG  
CGAGCGGTGGTGTCAACGACGCATCGCATCGTTGATGGATTTTCGAATCTCGGTGGGGGATATTCCCTCGTC  
GCTCACGAT

#### Gen *glutamato deshidrogenasa* (BG12)

> *Burkholderia gladioli* strain UAPS07070

```
TATCGAGCTCGATCGGCACGTCGACCACCAGGATGCGCTTCGGGCGCTTGAGGGTTTCGAGCCAGCGC  
GACAGCGAGCCGAGGTACGGCGCGACGCGATCGACCTGCTGCAGATAGTTGCCCCAGGGACCGAGCGCCT  
CGGCGTTTCAGGTAGGACGGCACGGATTGCACGGGGGACGTGGACTGCGGTTGCGAAGACAT
```

Gen *NAD(P)H flavina oxidoreductasa* (BG12)

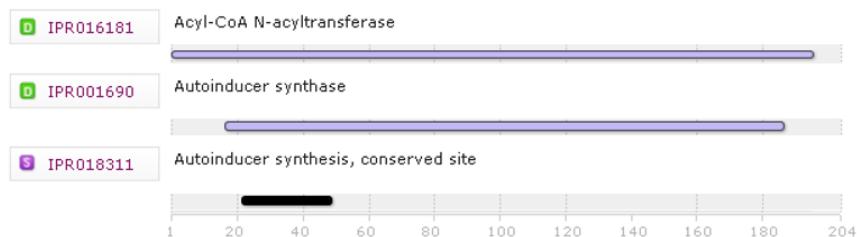
> *Burkholderia gladioli* strain UAPS07070

```
TACGGTTTCGGCAGCGTGACATCACGCAGTTGGAGGGGAGAAAACAGGGCGCTCATCGGG
```

## ANEXO II. Figuras complementarias

A

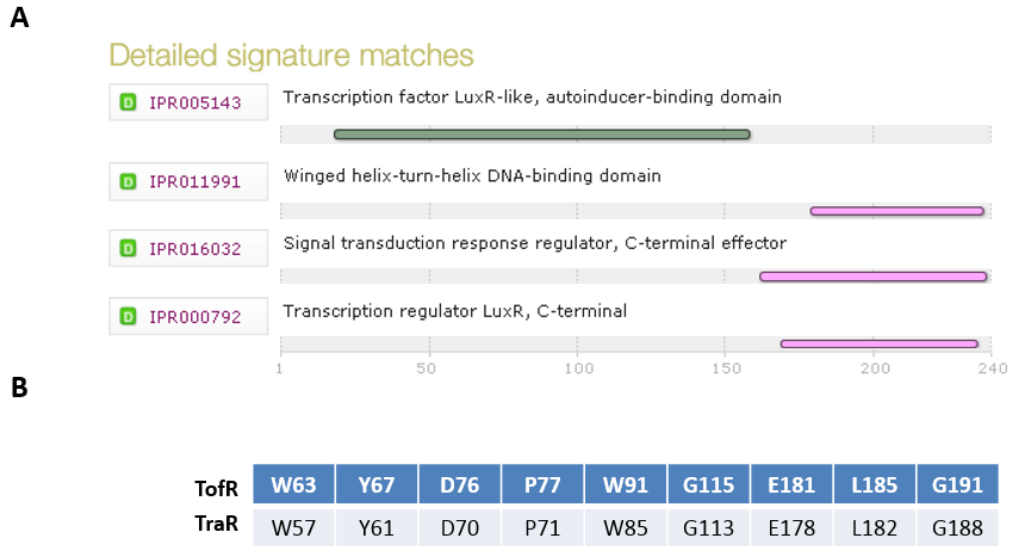
### Detailed signature matches



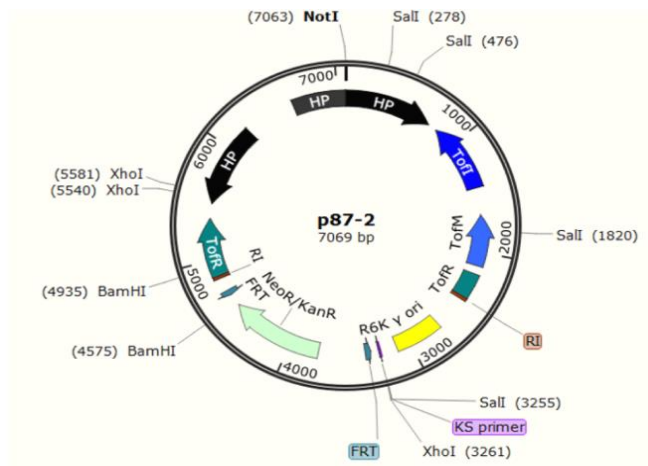
B

<b>TofI</b>	R23	F27	W33	E43	D45	D48	R69	F83	E101	E104
<b>TraI</b>	R25	F29	W35	E44	D46	D49	R70	F84	E101	E104

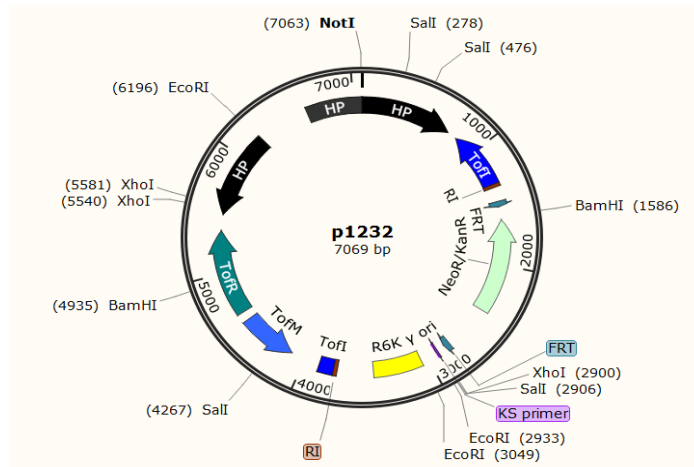
**Fig. S1. Análisis de la proteína TofI putativa en Interproscan platform.** A) dominios encontrados en la proteína TofI putativa; B) aminoácidos conservados en la proteína TofI de *B. gladioli* UAPS07070 comparada con la proteína TraI de *Agrobacterium tumefaciens*.



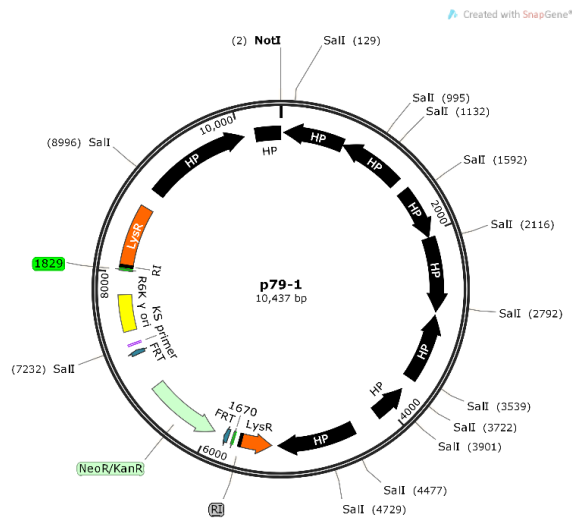
**Fig. S2. Análisis de la proteína TofR putativa en Interproscan platform.** A) dominios encontrados en la proteína TofR putativa; B) aminoácidos conservados en la proteína TofR de *B. gladioli* UAPS07070 comparada con la proteína TraR de *Agrobacterium tumefaciens*.



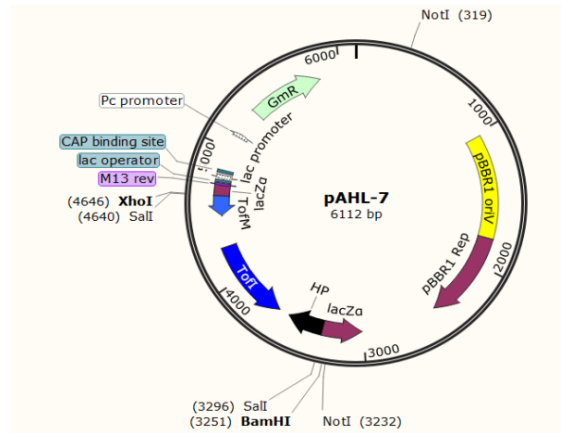
**Fig. S3. Plásmido p87-2.** El plásmido se obtuvo de la recircularización de un fragmento de 7069 pb extraído del cromosoma de BG87 por corte de restricción con *NotI*, el fragmento contiene el gen *tofR* con la inserción del transposon *Himar1* más secuencias contiguas de *B. gladioli* UAPS07070: HP, Proteína hipotética gen desconocido (flecha en negro); TofI, gene *tofI* (flecha azul); TofM, gene *tofM* (flecha azul claro); TofR, gene *tofR* (flecha verde); Neor/KanR, cassette de resistencia a kanamicina; RI, repetido invertido; FRT, Flp recombinasa; R6K, origen de replicación R6K dependiente de la proteína  $\pi$ ; Los sitios de restricción para *NotI*, *Sall*, *BamHI* y *XhoI* son indicados en la figura.



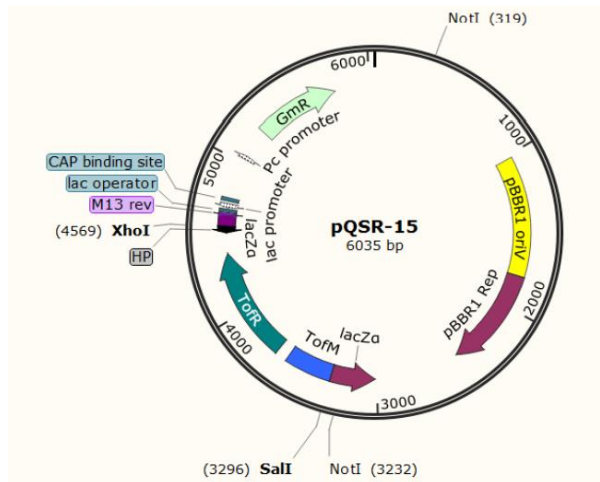
**Fig. S4. Plásmido p1232.** El plásmido se obtuvo de la recircularización de un fragmento de 7069 pb extraído del cromosoma de BG1232 por corte de restricción con *NotI*, el fragmento contiene el gen *tofI* con la inserción del transposon *Himar1* más secuencias contiguas de *B. gladioli* UAPS07070: HP, Proteína hipotética gen desconocido (flecha en negro); TofI, gene *tofI* (flecha azul); TofM, gene *tofM* (flecha azul claro); TofR, gene *tofR* (flecha verde); NeoR/KanR, cassette de resistencia a kanamicina; RI, repetido invertido; FRT, Flp recombinasa; R6K, origen de replicación R6K dependiente de la proteína  $\pi$ ; Los sitios de restricción para *NotI*, *SalI*, *BamHI* y *XhoI* son indicados en la figura.



**Fig. S5. Plásmido p79-1.** El plásmido se obtuvo de la recircularización de un fragmento de 10437 pb extraído del cromosoma de BG79 por corte de restricción con *NotI*, el fragmento contiene el gen *tofR* con la inserción del transposon *Himar1* más secuencias contiguas de *B. gladioli* UAPS07070: HP, Proteína hipotética gen desconocido (flecha en negro); LysR, gene *lysR* (flecha naranja); NeoR/KanR, cassette de resistencia a kanamicina; RI, repetido invertido; FRT, Flp recombinasa; R6K, origen de replicación R6K dependiente de la proteína  $\pi$ ; Los sitios de restricción para *NotI* y *SalI* son indicados en la figura.



**Fig. S6. Plásmido pAHL-7.** El plásmido fue construido con un fragmento de 1344 pb obtenido por digestión *Sall* del plásmido p87-2. Este fragmento contiene el gen *tofI* de *Burkholderia gladioli* UAPS07070 (flecha azul) más 386 pb río arriba que albergan parte del gen *tofM* (flecha azul claro) y 343 pb río debajo de *tofI*. El fragmento *Sall* fue clonado en el sitio *Sall* del plásmido pBBR1MCS-5 (Kovach, 1995).



**Fig. S7. Plásmido pQSR-15.** El plásmido fue construido con un fragmento de 1267 pb obtenido por digestión *XhoI-Sall* del plásmido p1232. Este fragmento contiene el gen *tofR* de *Burkholderia gladioli* UAPS07070 (flecha verde) más 343 pb río arriba que albergan parte del gen *tofM* (flecha azul claro) y 170 pb río debajo de *tofR*. El fragmento *XhoI-Sall* fue clonado en el sitio *Sall* del plásmido pBBR1MCS-5 (Kovach, 1995).

## ANEXO III. Tablas complementarias

**Table S1. Plásmidos y cepas bacterianas.**

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia
<b><i>Burkholderia gladioli</i></b>		
<b>UAPS07070</b>	Cepa silvestre aislada como endófito de un fruto de piña en México: actividad antimicrobiana <sup>+</sup>	Marín-Cevada, 2012
<b>BG1232</b>	UAPS07070 <i>tofI::Himar1</i> ; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG87</b>	UAPS07070 <i>tofR::Himar1</i> ; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG79</b>	UAPS07070 <i>lysR::Himar1</i> ; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG12</b>	UAPS07070 <i>lectina de unión a fucosa::Himar1</i> ; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG33</b>	UAPS07070 <i>glutamato deshidrogenasa::Himar1</i> ; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG41</b>	UAPS07070 <i>NAD(P)H flavina oxidoreductasa::Himar1</i> ; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG1232-pAHL-7</b>	BG1232 complementada con el plásmido pAHL-7; actividad antimicrobiana <sup>+</sup>	Este estudio
<b>BG1232-pBBR1MCS-5</b>	BG1232 complementada con el plásmido pBBR1MCS-5; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio
<b>BG87-pQSR-15</b>	BG87 complementada con el plásmido pQSR-15; actividad antimicrobiana <sup>+</sup>	Este estudio
<b>BG87-pBBR1MCS-5</b>	BG87 complementada con el plásmido pBBR1MCS-5; actividad antimicrobiana <sup>d</sup>	Este estudio

***Acinetobacter sp.*** Cepa silvestre aislada de *Neobuxbaumia macrocephala*; Cepa sensible Bustillos-Cristales, 2017  
**UAPS0169**

***E. coli***

**DH5 $\alpha$**  *supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 thi-1 relA1 recA1* Hanahan 1983

**DH5 $\alpha$ -pAHL-7** DH5 $\alpha$  con pAHL-7 Este estudio

**DH5 $\alpha$ -pQSR-15** DH5 $\alpha$  con pQSR-15 Este estudio

**DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5** DH5 $\alpha$  con pBBR1MCS-5 Este estudio

***Chromobacterium violaceum*** Cepa reportera de Quorum Sensing McClean, 1997

**CV026**

**Plásmidos**

**p1232** Construcción recircularizada de aproximadamente 8 kb de ADN cromosomal of BG1232, fragmento obtenido por corte de restricción con *NotI*, contiene regiones flanqueantes río arriba y río abajo del gen *tofI::Himar1*; R6K *ori*, Km<sup>R</sup> Este estudio

**p87-2** Construcción recircularizada de aproximadamente 9 kb de ADN cromosomal of BG87, fragmento obtenido por corte de restricción con *NotI*, contiene regiones flanqueantes río arriba y río abajo del gen *tofR::Himar1*; R6K *ori*, Km<sup>R</sup> Este estudio

**p79-1** Construcción recircularizada de aproximadamente 10.4 kb de ADN cromosomal of BG79, fragmento obtenido por corte de restricción con *NotI*, contiene regiones flanqueantes río arriba Este estudio

y río abajo del gen *lysR::Himar1*; R6K *ori*, Km<sup>R</sup>

<b>p12</b>	Construcción recircularizada de aproximadamente 8 kb de ADN cromosomal of BG12, fragmento obtenido por corte de restricción con <i>NotI</i> , contiene regiones flanqueantes río arriba y río abajo del gen <i>lectina de unión a fucosa::Himar1</i> ; R6K <i>ori</i> , Km <sup>R</sup>	Este estudio
<b>p33</b>	Construcción recircularizada de aproximadamente 6 kb de ADN cromosomal of BG33, fragmento obtenido por corte de restricción con <i>NotI</i> , contiene regiones flanqueantes río arriba y río abajo del gen <i>glutamato deshidrogenasa::Himar1</i> ; R6K <i>ori</i> , Km <sup>R</sup>	Este estudio
<b>p41</b>	Construcción recircularizada de aproximadamente 8 kb de ADN cromosomal of BG41, fragmento obtenido por corte de restricción con <i>NotI</i> , contiene regiones flanqueantes río arriba y río abajo del gen <i>NAD(P)H flavina oxidoreductasa::Himar1</i> ; R6K <i>ori</i> , Km <sup>R</sup>	Este estudio
<b>pHBurk3</b>	Plásmido que contiene <i>Himar1</i> (con <i>ori</i> <sub>R6K</sub> , gen <i>FRT-nptII-FRT</i> , repetidos invertidos) y gen <i>tnp</i> , el fragmento contiene <i>ori</i> Cole1, <i>oriT</i> , y <i>ori</i> <sub>1600-rep(TsBt)</sub> , la <i>nptII</i> está fuera de la región <i>tnp</i>	Rholl, 2008
<b>pBBR1MCS-5</b>	Vector de clonación de amplio espectro, RK2 <i>ori</i> , <i>lacZα</i> , Gm <sup>R</sup>	Kovach, 1995
<b>pAHL-7</b>	pBBR1MCS-5 contiene un fragmento de 1242 pb del gen <i>tofI</i> más regiones flanqueantes, fragmento obtenido con <i>Sall</i> del plásmido p87-2; Gm <sup>R</sup>	Este estudio
<b>pQSR-15</b>	pBBR1MCS-5 contiene un fragmento de aproximadamente 2 kb del gen <i>tofR</i> más regiones flanqueantes, fragmento	Este estudio

obtenido con *Sall*-*Xho*I del plásmido  
p1232; Gm<sup>R</sup>

Los subíndices significan: R.- resistencia; +.- positivo; D.- disminuido.

## Research Article

E. Seynos-García, M. Castañeda-Lucio, J. Muñoz-Rojas, L. López-Pliego, M. Villalobos, R. Bustillos-Cristales, L. E. Fuentes-Ramírez

# *Loci* identification of a N-acyl homoserine lactone type quorum sensing system and a new LysR-type transcriptional regulator associated with antimicrobial activity and swarming in *Burkholderia gladioli* UAPS07070

<https://doi.org/10.1515/biol-2019-0019>

Received April 5, 2018; accepted January 14, 2019

**Abstract:** A random transposition mutant library of *B. gladioli* UAPS07070 was analyzed for searching mutants with impaired microbial antagonism. Three derivatives showed diminished antimicrobial activity against a sensitive strain. The mutated loci showed high similarity to the quorum sensing genes of the AHL-synthase and its regulator. Another mutant was affected in a gene coding for a LysR-type transcriptional regulator. The production of toxoflavin, the most well known antimicrobial-molecule and a major virulence factor of plant-pathogenic *B. glumae* and *B. gladioli* was explored. The absence of a yellowish pigment related to toxoflavin and the undetectable transcription of *toxA* in the mutants indicated the participation of the QS system and of the LysR-type transcriptional regulator in the regulation of toxoflavin. Additionally, those genes were found to be related to the swarming phenotype. Lettuce inoculated with the AHL synthase and the lysR mutants showed less severe

symptoms. We present evidence of the participation of both, the quorum sensing and for the first time, of a LysR-type transcriptional regulator in antibiosis and swarming phenotype in a strain of *B. gladioli*.

**Keywords:** AHL; Transposon Himar1; Antibiosis; Quorum Sensing; Toxoflavin.

## 1 Introduction

Most microorganisms depend on quorum sensing (QS) as a means for detecting and facing environmental conditions. Individual cells release signaling molecules that are detected by the rest of the population and other bacterial communities living in their microhabitats. They function by making the bacterial cells aware of the density of their own population and of other species as well. Besides this, cells receive information on mass transfer in their microhabitat. These signaling molecules also play a critical role in the activation or silencing of specific metabolic pathways in order to cope with current environmental conditions [1]. The physiological responses regulated through QS are diverse; including bioluminescence, conjugation, virulence, antibiotic synthesis, extracellular protease activity, response genes to oxidative-conditions, flagellar morphogenesis, swarming motility, root nodulation, antibiotic resistance, biofilm formation, reduction of oxidative stress and glutamate uptake [2-12].

The LysR family of transcriptional regulators (LTTR) is involved in the local or global regulation of genes associated to virulence, metabolism, quorum sensing and

**\*Corresponding author: Luis E. Fuentes Ramírez**, Lab. Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edif. IC11, Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla, Puebla, México, E-mail: [luis.fuentes@correo.buap.mx](mailto:luis.fuentes@correo.buap.mx)  
**E. Seynos-García, M. Castañeda-Lucio, J. Muñoz-Rojas, L. López-Pliego, R. Bustillos-Cristales**, Lab. Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edif. IC11, Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla, Puebla, México  
**M. Villalobos**, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional, Carretera Estatal Sta Inés Tecuexcomac-Tepetitla, km. 1.5, C.P: 90700 Tepetitla de Lárdizabal, Tlaxcala, Mexico

motility. LysR-type proteins act as transcriptional activators or repressors of genes, including negative self-regulation. There are two principal domains of LysR-type proteins, an N-terminal domain of DNA-binding and a C-terminal domain of co-inducer-binding which appears to be essential for its proper functioning. The co-inducer is often an intermediate or a metabolic product of the pathway, and its binding generates a feedback loop [review 13].

A recent re-classification of *Burkholderia* left the animal and most of the plant-pathogenic organisms in the same genus, including *B. gladioli*. The remaining species were included in the *Paraburkholderia*, *Caballeronia* and *Robbsia* genera [14-16]. Several species in *Burkholderia* can degrade pollutants, while others can produce various extracellular products such as siderophores, antimicrobials, toxins and extracellular enzymes [17-19]. In addition, antimicrobial activity has been detected for a number of distinct species of *Burkholderia*, and include, *B. bryophila*, *B. megapolitana*, some members of the *B. cepacia* complex, *B. multivorans*, *B. tropica*, *B. thailandensis* and *B. contaminans* [20-27]. Several *B. gladioli* strains show pathogenicity towards immunocompromised humans, plants, animals and inhibitory activity against fungi and other bacteria [28-39]. Genotypes of *B. gladioli* can also synthesize several molecules with different antagonistic mechanisms. Those antimicrobial molecules include: i, Bongkrekic acid, an antagonistic substance against fungi [40]. This substance is a potent toxin in humans, there have been a number of life threatening and sometimes lethal intoxications following the consumption of a native Indonesian fermented food 'Tempe bongkrek', contaminated with *B. gladioli* pv. *cocovenenans* [41]; ii, Enaxyloxin, an antibiotic produced when *B. gladioli* is exposed to *Rhizopus microspores* under O<sub>2</sub> limitation [38]; iii, Toxoflavin, synthesized by *B. glumae* and *Pseudomonas protegens* Pf-5, besides *B. gladioli*. Toxoflavin is active against a wide range of bacteria and fungi [42-46], it functions by transferring electrons between NADH and oxygen producing hydrogen peroxide [42]; iv, Gladiolin, a broad spectrum antibiotic of the macrolide antibiotic family produced by *B. gladioli* BCC0238 [47]; and v, a cyclic peptolide antibiotic with activity against gram-positive bacteria [48].

The global Quorum-sensing mechanism regulates toxoflavin biosynthesis in *B. glumae* BGR1 and in *B. gladioli* BSR3 [49-53]. Furthermore, QS regulates a number of activities, this includes the synthesis of antimicrobial metabolites in other *Burkholderia* species. In *B. thailandensis*, the synthesis of an antibiotic of the bactobolin/actinobolin family [25,26]. The pyrrolnitrin production in species of the *B. cepacia* complex [21]. In *B. ambifaria*, the transcription of genes that potentially

participate in the synthesis of pyrrolnitrin, enacyloxins, and occidiofungins [54].

Swarming is a bacterial collective movement over a surface and is used for colonization [55-56]. The Acyl-Homoserine Lactone-type Quorum-Sensing system regulates swarming in different bacteria including *B. cepacia* H111, *B. glumae* BGR1, and other species [8,52,57,58].

*B. gladioli* UAPS07070 is a bacterium isolated from pineapples. It displays a wide range of antimicrobial activity against different microorganisms including Proteobacteria, Firmicutes and fungi [37]. The antagonistic mechanisms shown by that strain has not been characterized yet. Our aim was to identify and characterize *loci* associated with the antibiosis and swarming phenotypes exhibited by *B. gladioli* UAPS07070.

## 2 Methods

### 2.1 Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The plasmids and strains of this study are shown in Table 1. *B. gladioli* UAPS07070 and the mutants were grown on Luria Bertani (LB) agar plates or liquid medium at 30°C or 37°C, depending on the experiment. *E. coli* DH5 $\alpha$  was grown on LB plates or in LB broth at 37°C. Kanamycin (Km) was supplemented when required (80  $\mu$ g/ml).

### 2.2 Mutagenesis with *Himar1*

A randomly mutated library of *B. gladioli* UAPS07070 was obtained containing the transposon *Himar1*, an efficient genetic tool for *B. gladioli* and other *Burkholderia* species [59,60]. Additionally, *Himar1* possesses an origin or replication that allows for the recovery of sequences next to the transposon insertion even without cloning them into another vector. The suicide plasmid pHBurk3 was introduced into *B. gladioli* UAPS07070 by electroporation [61]. Electrocompetent cells were obtained as follows; cells were inoculated in 1 ml of LB broth and incubated at 30°C under agitation for 24 h. The bacterial cells were washed twice with 300 mM sucrose at room temperature and the pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of the same solution. The conditions of the electrical pulse were 25  $\mu$ F; 200  $\Omega$ ; 2.5 kV on a Bio-Rad GenePulserXcell. The transformants were selected in plates of LB kanamycin (80  $\mu$ g/ml), incubated at 37°C until isolated colonies appeared. The mutants were preserved at -70°C in 50% glycerol (v/v).

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

Strain or Plasmid	Relevant Characteristic(s)	Reference or source
<i>Burkholderia gladioli</i>		
UAPS07070	Wild type strain isolated from pineapple in Mexico; Microbial antagonistic activity*	[39]
BG1232	UAPS07070 <i>tofI::Himar1</i> Diminished antagonistic activity	This study
BG87	UAPS07070 <i>tofR::Himar1</i> Diminished antagonistic activity	This study
BG1232-pAHL-7	BG1232 transformed with pAHL-7; positive for antagonistic activity	This study
BG1232-pBBR1MCS-5	BG1232 carrying pBBR1MCS-5	This study
BG87-pQSR-15	BG87 transformed with pQSR-15; positive for antagonistic activity	This study
BG87-pBBR1MCS-5	BG87 carrying pBBR1MCS-5	This study
BG79	UAPS07070 <i>lysR::Himar1</i> ; Antimicrobial activity	This study
<i>Acinetobacter</i> sp.		
UAPS0169	Wild type strain isolated from <i>Neobuxbaumia macrocephala</i> ; Sensitive strain	[87]
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 thi-1 relA1 recA1</i>	[88]
DH5 $\alpha$ -pAHL-7	DH5 $\alpha$ with pAHL-7	This study
DH5 $\alpha$ -pBBR1MCS-5	DH5 $\alpha$ with pBBR1MCS-5	This study
DH5 $\alpha$ -pQSR-15	DH5 $\alpha$ with pQSR-15	This study
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
CV026	Biosensor of Quorum Sensing	[64]
Plasmid		
p1232	Recircularized construct of approximately 8-kb of chromosomal DNA of BG1232 digested with <i>NotI</i> , containing flanking regions upstream and downstream to <i>tofI::Himar1</i> ; R6K <i>ori</i> , Km <sup>R</sup>	This study
p87-2	Recircularized construct of approximately 9-kb of chromosomal DNA of BG87 digested with <i>NotI</i> , containing flanking region to <i>tofR::Himar1</i> ; R6K <i>ori</i> , Km <sup>R</sup>	This study
pBBR1MCS-5	A broad host range cloning vector, RK2 <i>ori</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Gm <sup>R</sup>	[70]
pAHL-7	pBBR1MCS-5 containing a 1242-pb fragment of <i>tofI</i> plus flanking regions, obtained with a <i>Sall</i> fragment of plasmid p87-2; Gm <sup>R</sup>	This study
pQSR-15	pBBR1MCS-5 containing a -pb fragment of <i>tofR</i> plus flanking regions, obtained with a <i>Sall-XhoI</i> fragment of plasmid p1232; Gm <sup>R</sup>	This study
pHBurk3	Plasmid containing <i>Himar1</i> (with <i>oriR6K</i> , FRT- <i>nptII</i> -FRT gene, inverted repeats) and <i>tnp</i> gene, fragment containing ColE1 <i>ori</i> , <i>oriT</i> , and <i>ori1600-rep(TsBt)</i> , the <i>nptII</i> facing toward <i>tnp</i>	[59]

### 2.3 Screening of mutants with reduced anti-microbial activity

Inhibition-impaired mutants against the sensitive bacterium *Acinetobacter* sp. UAPS0169 were initially screened with a multiple antagonism assay as described below. The mutants were grown with agitation in LB

broth at 30°C for 24 h. 20  $\mu$ l of this culture was plated on LB agar and incubated for 24 h at 30°C. Thereafter, 20  $\mu$ l of culture of the sensitive strain in stationary phase was placed in the vicinity of the antagonistic strain growth without touching it. The cells were further incubated at 30°C for 24 h. Candidates for loss of antagonism were detected by the growth of the sensitive strain into the radius of one centimeter starting in the edge of the

cell mass of the mutant. Double layer assay [Modified from 62] corroborated the phenotype. All antagonistic strains were grown in LB broth at 30°C for 24 h to reach stationary phase. The cultures were adjusted to an OD<sub>620</sub> of 0.05 in LB broth, 6 µl was inoculated onto solid LB agar plates and incubated for 24 h at 30°C. Subsequently, the bacterial growth was removed with a sterile glass slide, and the remaining cells were inactivated by exposure to chloroform vapors for 1 h. The plates were left opened in a laminar flow cabinet until the residual chloroform had been evaporated. *Acinetobacter* sp. UAPS0169 was grown and its density was adjusted in a similar manner to the mutants. 200 µl of the adjusted *Acinetobacter* culture was spread onto the LB agar plates where the mutant clone had been previously grown. The plates were incubated for 24 h at 30°C and inhibition halos were measured. For statistical analysis, the double layer assay was performed with twelve repeats for each mutant clone. The statistical significance was tested with ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## 2.4 Identification of transposition location

The transposon-chromosomal junction in clones with decreased antagonistic activity was rescued according to the methodology described by Rholl et al. [59]. Briefly, DNA was extracted and purified with Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega Co). The DNA was digested with *NofI* (Thermo Fisher Scientific) and purified with the High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche), and self-ligated with the Rapid DNA ligation kit (Roche). The DNA was transformed into *E. coli* DH5α, and plated on LB agar plates containing Km (30 µg/ml) at 37°C. Plasmid extraction was conducted with the Pure Yield Plasmid Miniprep System kit (Roche). All kits were used following manufacturer's instructions. The mutated sites were sequenced with the transposon specific primers 1670 (5'-TCGGGTATCGCTCTTGAAGGG-3') and 1829 (5'-GCATTAATACTAGCGACGCC-3'). Blastx ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) was used to compare the sequences. Multiple sequence alignment with ClustalW was used to calculate the percentage of identity of the translated orfs [63]. The DNA sequence was deposited in NCBI GenBank with the acc. numbers KP123645 and MF325937. The orfs were searched with the Interproscan platform (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) to identify conserved domains in TofI, TofR and LysR.

## 2.5 Acyl homoserine lactone assay

The secretion of acyl homoserine lactones was detected with the quorum sensing indicator strain *C. violaceum* CV026 [64] which exhibits a purple pigmentation in the presence of AHLs. Cells were grown in LB broth to the stationary phase, a layer of *C. violaceum* CV026 (approximately 200 µl) was distributed over a PSUC plate (4.2 mM succinic acid, 1% casein peptone and 1.6% bacteriological agar). The plates were left opened until the suspension had dried up. 10 µl of the bacterial suspension of the tested cells was placed onto each plate and incubated for 24 h at 30°C. A positive reaction was indicated by the presence of a violet halo around the colony (violacein production).

## 2.6 Swarming assay

Bacterial cultures were grown for 24 h at 30°C in LB broth. One ml of bacterial culture, with an OD<sub>620</sub> of 0.01, was washed twice with sterile LB broth. A volume of 1 µl of bacterial cells was placed in the center of an LB plate and incubated either at 30°C or 37°C for 48 h. There were a total of five replicates for each sample. A dendritic pattern formation was regarded as positive for swarming.

## 2.7 Toxoflavin quantification

The toxoflavin production was quantified in solid medium. *B. gladioli* UAPS07070 or derivate mutants were grown to stationary phase in LB broth with an OD<sub>620</sub> of 0.05. 200 µl of suspension was spread over LB plates and incubated at 30°C for 24 h. The cell mass was removed mechanically with a glass slide and the agar surface was cleaned with a swab soaked with 70% ethanol to remove the remaining cells. An agar fragment (500 mg) where the cells had been grown, was sliced up and resuspended in 500 ml of chloroform. The chloroform fraction was transferred to fresh polypropylene tubes and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in 80% methanol and the absorbance was measured at 393 nm [65]. The absorbance lectures were compared with ANOVA ( $p < 0.05$ ) using six replicates.

## 2.8 End-point RT-PCR analysis of *toxA* gene

The transcription of *toxA* gene by *B. gladioli* UAPS07070, by QS and by LysR mutants were analyzed by RT-PCR.

Bacterial cells were grown at 30°C in LB broth until reaching the stationary phase with an  $OD_{620} = 0.05$ . 30  $\mu$ l of this bacterial suspension was plated on LB plates and incubated for 24 h at 30°C. The cells were recovered in 1 ml of RNase free water and centrifuged at 4°C and 8,000 x g for 3 min. The simple phenol method [66] was used for total RNA extraction and were as follows: 100  $\mu$ l of RNase free water was added to the pellet and the cells were vortexed for 3 min, 100  $\mu$ l of acid phenol-chloroform (1:1) was added and the tube was vortexed for 1 min. Following this, tubes were incubated at 70°C for 30 min, vortexing each for 5 min. The sample was centrifuged at 12,000 x g for 10 min, 100  $\mu$ l of aqueous phase was transferred to a clean tube and 200  $\mu$ l of isopropanol was added. The tube was vortexed for 3 min and centrifuged at 12,000 x g for 10 min, the RNA pellet was washed twice with 200  $\mu$ l of 70% ethanol and centrifuged at 12,000 x g for 5 min. The pellet was air dried and RNA was solubilized in 25  $\mu$ l of RNase free water. The integrity of the RNA was qualitatively evaluated in 1% agarose gel electrophoresis. The concentration and purity were measured in a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA (4 mg) was treated with DNaseI (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. For synthesis of cDNA, 2 mg of DNA-free RNA was used. cDNA was generated with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) according to manufacturer's instructions. The *toxA* gene expression was evaluated by PCR amplification of a fragment of 181 bp using the oligonucleotides RTP3 (5'-GTT CAG CTT CTA CCG CTG GA-3') [45] and TOXA2 (5'-TCA AGG CTT GCA GAC CAG-3') [48]. A 412 bp fragment of 16S rDNA gene was amplified as control of constitutive expression with the oligonucleotides Fwd (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA ATA C-3') and Rev (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') [67]. 1  $\mu$ l of cDNA was used for amplification of both, *toxA* and 16S rDNA with the following conditions: 96°C for 2 min, 30 cycles at 96°C for 1 min, 50°C for 1 min for *toxA*; and, for 16 rDNA, 58°C for 1 min and a final extension at 72°C for 30 s.

## 2.9 Assay for virulence in onion and lettuce

*B. gladioli* UAPS07070, BG1232, BG87 and BG79 were grown until reaching the stationary phase at 30°C in Luria-Bertani broth. Cultures were washed twice with sterile culture medium and adjusted to  $OD_{620} = 0.05$  (ca.  $10^7$  cfu/ml). For the onion assay a modification of the method of Jacobs *et al.* [68] was used. Fragments of 'Yellow Globe' onion bulbs (ca. 10 cm<sup>2</sup>) were inoculated with 5 ml of bacterial suspension inside of the inner surface from a

wound made with a micropipette tip. The onion bulbs were incubated in a wet chamber at 30°C for 48 h and virulence was demonstrated by tissue maceration. For the assays in lettuce plants three bright leaves of four weeks old plants were inoculated in the midribs with  $10^3$  washed CFU in 10 ml. The control was inoculated with 10 ml of 10 mM MgSO<sub>4</sub>. The plant were maintained in humid conditions and the appearance was observed daily for 5 days [Modified from 69].

## 2.10 Complementation strategy

The AHL synthase defective mutant BG1232 was complemented in trans with the plasmid pAHL-7 (Table 1 and Fig. S1) harboring 615 bases of *tofI* plus 386 nucleotides upstream and 343 bases downstream. The plasmid pAHL-7 was constructed by ligating the 1,344-bp *Sall* fragment of plasmid p87-2 (Fig. S2) into the corresponding restriction site of backbone vector pBBR1MCS-5 [70] (see Table1). The mutant BG87 was complemented with 723 bases of *tofR* plus 374 bases upstream and 170 bases downstream. A fragment of 1,267-bp containing *tofR* was obtained from the plasmid p1232 digested with *Sall*-*XhoI* (Thermo Fisher Scientific) (Fig. S3) and cloned in the *XhoI* site of pBBR1MCS-5, yielding plasmid pQSR-15 (Fig. S4). The plasmid pQSR-15 was transformed in BG87. Both inserts were confirmed by sequencing.

**Ethical approval:** The conducted research is not related to either human or animals use.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Screening of antimicrobial activity impaired mutants

We employed random mutagenesis for identifying *loci* associated with antimicrobial activity of *B. gladioli* UAPS07070. A library of 3,500 random mutants of *B. gladioli* UAPS07070 was analyzed. To show antimicrobial activity to *B. gladioli* UAPS07070, the gram-negative strain *Acinetobacter* sp. UAPS0169 was used. This strain exhibits fast and homogenous growth that allows for the clear detection of inhibition halos. The mutants, BG1232, BG87 and BG79 exhibited remarkable reduction of antimicrobial activity against *Acinetobacter* sp. UAPS0169 (Fig. 1B). The *Himar1* insertions in BG1232 and in BG87 were located close to each other allowing for the ligation of a 2,098 bp DNA segment (Fig. 2A). The sequence showed high

similarity to *tofI*, *tofM* and *tofR* sequences (Table 2), which is related to the Acyl homoserine lactone quorum sensing system (AHL QS). The insertion in BG1232 interrupted a sequence corresponding to the putative Acyl-homoserine lactone synthase *tofI* (Table 2), and in the mutant BG87, affected the putative QS regulator *tofR* (Table 2, Fig. 2A). The QS circuitry that regulates pathogenicity of both *B. gladioli*, including UAPS07070 and *B. glumae* corresponds to the topological arrangement of M1 described in Proteobacteria [71,72]. The arrangement in the group M1 is characterized by the divergent transcription of *tofI* and *tofR*. Besides, *tofM*, a negative regulator homolog to *rsaM*, is found in the intergenic region between *tofI* and *tofR*. Both *tofM* and *tofI* are transcribed in tandem, and *tofR* is transcribed divergently to *tofMI* [72]. Domain search of TofI of *B. gladioli* UAPS07070 with Interproscan identified domains related to acyl transferase activity, autoinductor synthase activity and autoinductor binding (Fig. S5). The same analysis of TofR showed the presence of four characteristic domains of LuxR (Fig. S6).

The *tofIMR* genes are implicated in the regulation of toxoflavin biosynthesis and swarming movement in the plant-pathogenic bacteria, *B. glumae* BGR1, 336gr-1 and *B. gladioli* BSR3 [49-53,73]. Toxoflavin is a virulence factor demonstrated by the phytopathogen *B. glumae* [49,50,74,75] and potentially involved in the phytopathogenicity of *B. gladioli* [53]. In both models, *N*-hexanoyl homoserine lactone (C6-HSL), and *N*-octanoyl homoserine lactone (C8-HSL), are synthesized by TofI, the ortholog of the AHL synthase LuxI [49,76]. This TofR-C8-HSL complex activates the regulatory cascade of toxoflavin synthesis and its transport in *B. glumae* [49]. Besides its virulence role in plant-pathogenic bacteria, toxoflavin shows strong antimicrobial activity. Recently, the genome analysis of 88 isolates of a *B. gladioli* collection revealed that the toxoflavin biosynthetic pathway is conserved across all genomes [77]. The genetic element interrupted by the transposon *Himar1* in BG79 shows a 99% nucleotide identity with a gene of the *lysR* family, harbored in chromosome 2 of *B. gladioli* BSR3, nt 1581223 to

nt 1582191 (GenBank CP002600.1). The gene is transcribed independently and encodes for a LysR-type protein of 322 a.a. (Table 2). The *Himar1* insertion was located near the C-terminal domain (nucleotide 634) that is essential for binding the co-inducer (Fig. 2B). The antibiosis of BG79 against the sensitive strain was severely diminished, suggesting a positive regulation of genetic elements involved in the synthesis and/or transport of toxoflavin. All of the *B. gladioli* sequenced genomes, including BSR3, show this same region with identical gene context among them (Results not shown). In all of them, downstream to the *lysR* locus there is a hypothetical protein in the opposite transcription direction. Upstream to *lysR* there is one hypothetical OmpC family outer membrane protein and one hypothetical protein, both in the opposite transcription direction to the *lysR* gene. In the regulatory circuit of toxoflavin production by *B. glumae* BGR1, ToxR positively regulates the toxoflavin biosynthesis and transport genes. It is a LysR-type protein that recognizes toxoflavin as a co-inducer [49]. The sequence of *lysR*, is interrupted by *Himar1* in BG79, and exhibits low sequence homology to the *toxR* sequences of *B. glumae* BGR1 and *B. gladioli* BSR3 (data not shown) suggesting that it could detect a toxoflavin alternative co-inducer.

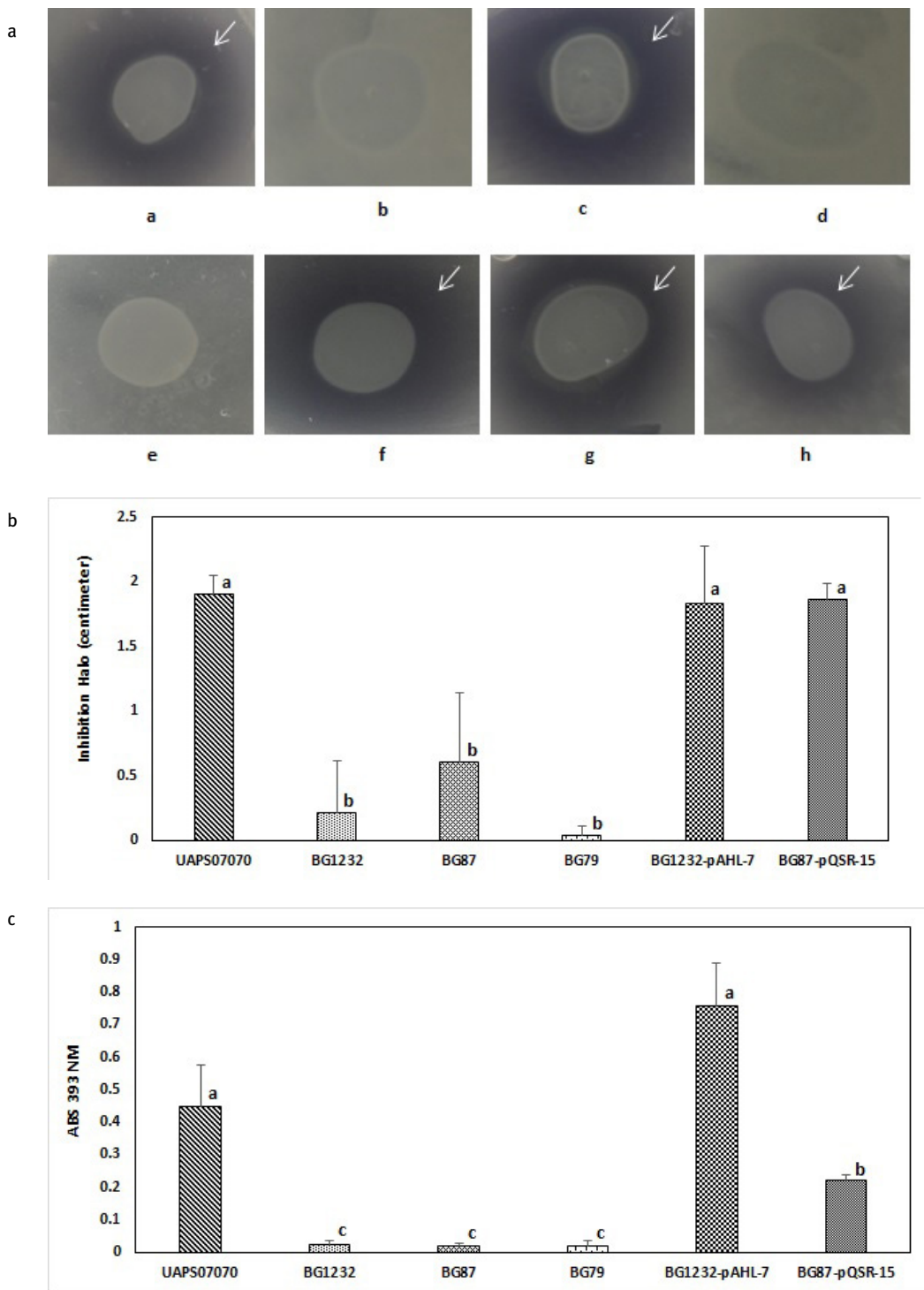
We explored the production of a yellowish pigment, indicative of toxoflavin production [49] in *B. gladioli* UAPS07070. Normally, UAPS07070 produces toxoflavin on solid medium. However, the mutants BG1232, BG87, and BG79 do not (Fig. 1C). It has been reported that some *B. gladioli* phytopathogenic genotypes produces toxoflavin, and it is QS-dependent [52,53]. *B. gladioli* UAPS07070 is an endophytic bacterium isolated from inner tissues of pineapple. It exhibits strong antimicrobial activity against several bacteria and fungi [39]. It might also antagonize the phytopathogenic bacterium *Tatumella ptyseos* under natural conditions in pineapple plants [39].

While our results indicate that UAPS07070 synthesizes toxoflavin in culture media (Fig. 1C). We cannot discount the production of other antimicrobial metabolites. Kim et al. [52] observed that the expression of *B. gladioli* BSR3

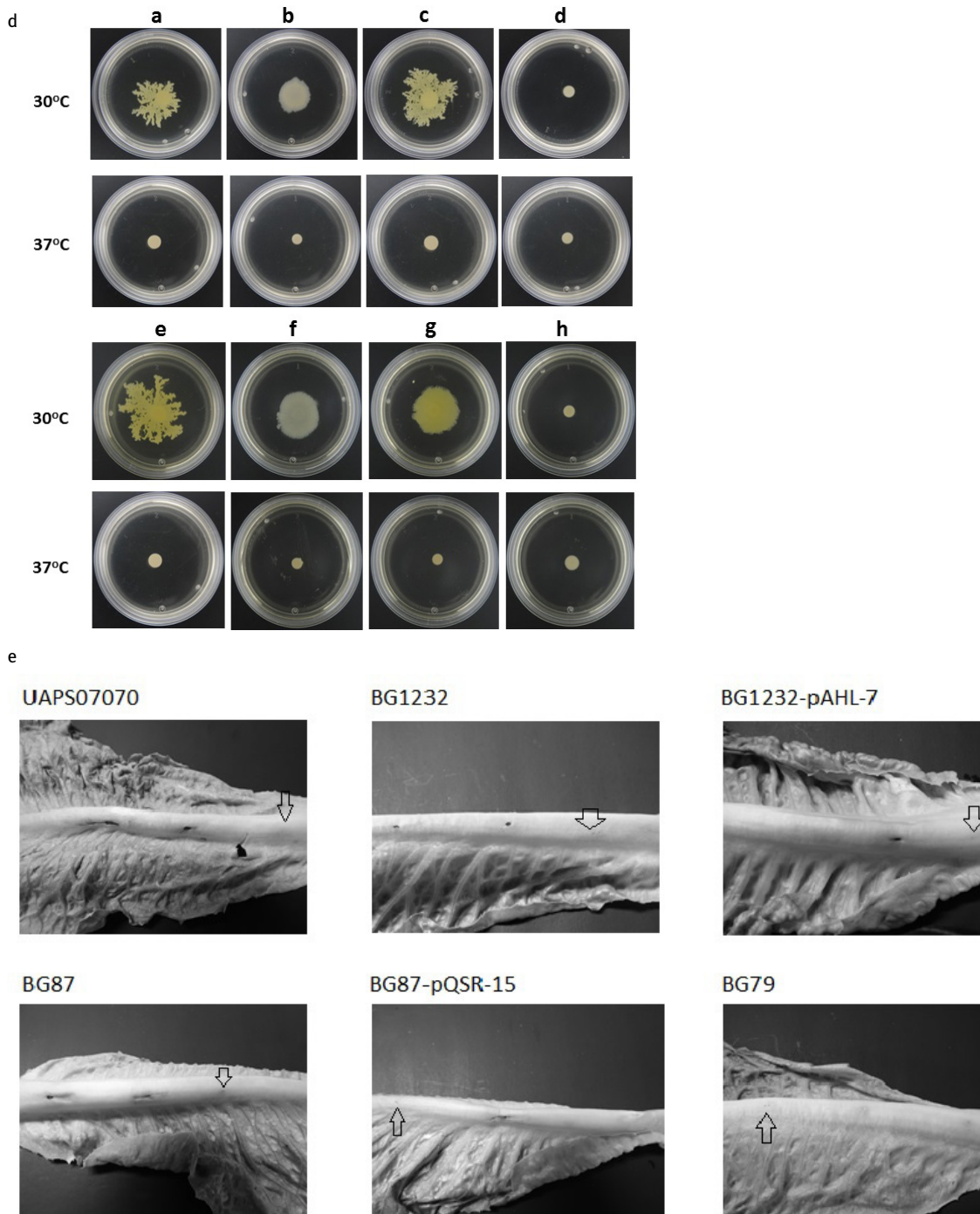
**Table 2.** Identity of the QS and *lysR* peptides identified in *B. gladioli* UAPS07070.

	TofI	TofM	TofR	LysR
<b><i>B. gladioli</i> BSR3</b>	<b>98.5%</b> AEA63554.1	<b>97.3%</b> AEA63555.1	<b>100%</b> AEA63556.1	<b>99.4%</b> AEA63716.1
<b><i>B. glumae</i> BGR1</b>	<b>86.7%</b> ACR31808.1	<b>78.7%</b> ACR31807.1	<b>92.1%</b> ACR31806.1	<b>83.5%</b> ACR31745.1
<b><i>B. glumae</i> PGI</b>	<b>86.2%</b> AJK49063.1.1	<b>79.3%</b> AJK49064.1	<b>94.6%</b> AJK49065.1	<b>87.4%</b> AJK49176.1

The identity was determined by ClustalW alignment of the amino acids.



**Fig. 1. Role of Quorum-sensing and LysR in antagonism, toxoflavin synthesis, motility, and virulence. A,** Acyl homoserine lactones detection. **a**, UAPS07070; **b**, BG1232; **c**, BG1232-pAHL-7; **d**, BG1232-pBBR1MCS-5; **e**, CV026; **f**, BG87; **g**, BG87-pQSR-15; **h**, BG87-pBBR1MCS-5. Positive reaction is by the presence of a violet halo around of the colony (marked with a white arrow). An aliquot of 10  $\mu$ l of the suspension of the tested cells was placed onto a dry layer of *C. violaceum* CV026 distributed over a PSUC plate. **B,** Antagonism assay against *Acinetobacter* sp. UAPS0169. Inhibition halos produced by UAPS07070, BG1232, BG87, BG79, BG1232-pAHL-7 and BG87-pQSR-15. Double layer assay in LB plates incubated for 24 h. S.D. Standard deviation of five replicates. **C,** Toxoflavin detection. Toxoflavin level detected to 393 nm of absorbance with a standard deviation of six repeats of the strain UAPS07070, BG1232, BG87, BG79, BG1232-pAHL-7 and BG87-pQSR-15. **D,** Motility assay. **a** and **e**, UAPS07070; **b**, BG1232; **c**, BG1232-pAHL-7; **d**, BG1232-pBBR1MCS-5; **f**, BG87; **g**, BG87-pQSR-15; **h**, BG87-pBBR1MCS-5. Motility was determined in LB agar, 0.4 %, after incubation for 48 h at either 30 or 37°C. **E.** Virulence lettuce assay, the inoculated strains are indicated in the figure. Observations was determined after incubation for 5 days at 30°C. The arrows indicate control inoculation.



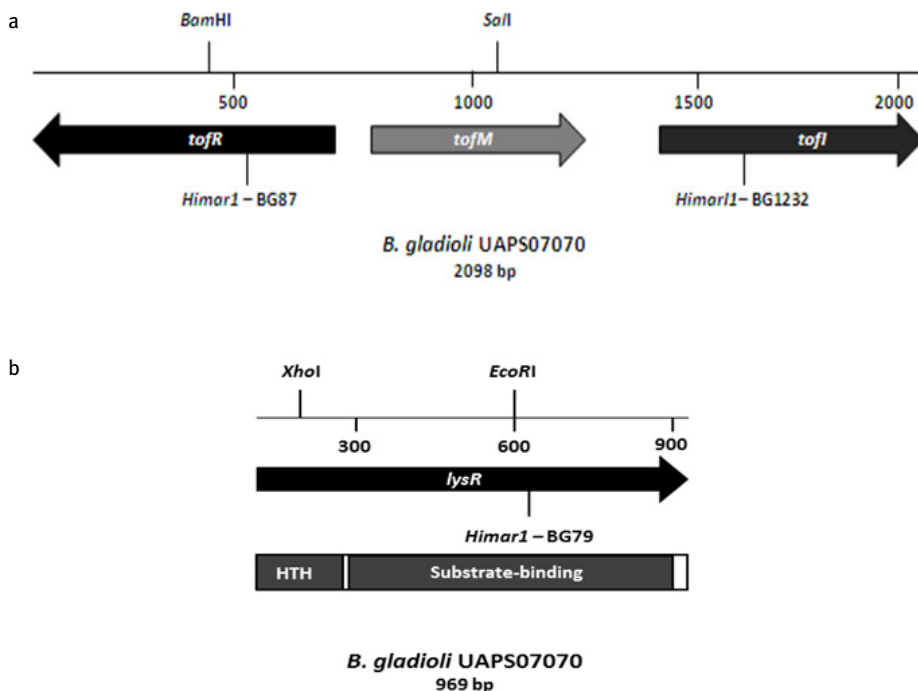
**Fig. 1. Role of Quorum-sensing and LysR in antagonism, toxoflavin synthesis, motility, and virulence. A,** Acyl homoserine lactones detection. **a**, UAPS07070; **b**, BG1232; **c**, BG1232-pAHL-7; **d**, BG1232-pBBR1MCS-5; **e**, CV026; **f**, BG87; **g**, BG87-pQSR-15; **h**, BG87-pBBR1MCS-5. Positive reaction is by the presence of a violet halo around of the colony (marked with a white arrow). An aliquot of 10  $\mu$ l of the suspension of the tested cells was placed onto a dry layer of *C. violaceum* CV026 distributed over a PSUC plate. **B**, Antagonism assay against *Acinetobacter* sp. UAPS0169. Inhibition halos produced by UAPS07070, BG1232, BG87, BG79, BG1232-pAHL-7 and BG87-pQSR-15. Double layer assay in LB plates incubated for 24 h. S.D. Standard deviation of five replicates. **C**, Toxoflavin detection. Toxoflavin level detected to 393 nm of absorbance with a standard deviation of six repeats of the strain UAPS07070, BG1232, BG87, BG79, BG1232-pAHL-7 and BG87-pQSR-15. **D**, Motility assay. **a** and **e**, UAPS07070; **b**, BG1232; **c**, BG1232-pAHL-7; **d**, BG1232-pBBR1MCS-5; **f**, BG87; **g**, BG87-pQSR-15; **h**, BG87-pBBR1MCS-5. Motility was determined in LB agar, 0.4 %, after incubation for 48 h at either 30 or 37°C. **E**, Virulence lettuce assay, the inoculated strains are indicated in the figure. Observations was determined after incubation for 5 days at 30°C. The arrows indicate control inoculation.

polyketide genes related to the synthesis of the putative antibiotic bacillaene is QS-dependent [52]. Furthermore, other genotypes of *B. gladioli* synthesize antagonistic molecules like enacyloxin, bongkreic acid, gladiolin, and a cyclic peptolide antibiotic [38,40,41,48,77], but the relationship to QS regulation remains to be elucidated. In addition to QS, the regulation of the toxoflavin synthesis in *B. glumae* includes an alternative pathway comprised of different *loci*, among them an orphan *luxR* [50,51,78]. The *B. gladioli* mutants BG87 and BG1232 exhibit slight antimicrobial activity against the sensitive strain *Acinetobacter* sp. UAPS0169 (Fig. 1B). This suggests alternative pathways of regulation in the residual production of inhibitory substances in UAPS07070 or the production of multiple antimicrobial molecules, as has been reported in *Pantoea agglomerans* Eh318 or *Pseudomonas protegens* Pf-5 [79,80].

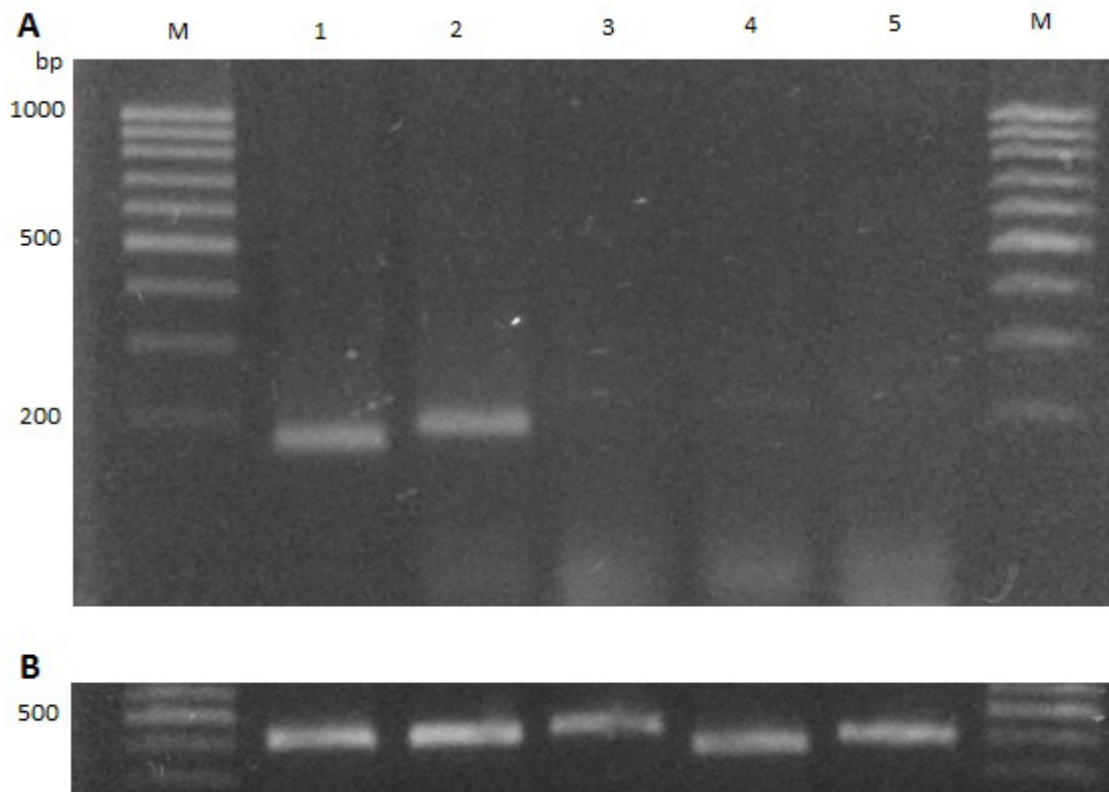
### 3.2 Search of putative lux-box and autoinducer signal detection

The mutated region was aligned with the cep-box consensus sequence of *B. cenopacia* and *B. ambifaria* [54,81]. These two lux-boxes are well characterized in

species of *Burkholderia*. A putative box was detected between positions 63-80 nucleotides upstream of the first ATG in *tofI* (Table S1). While *tofM* exhibits a putative lux-box 36 bp upstream of the start codon (Table S1). There was no lux-box found upstream of *tofR* (Table S1). We also did not find any lux-box upstream to *lysR* gene of BG79 (data not shown). The synthesis of signaling molecules associated to the putative QS system of UAPS07070 was confirmed with the reporter strain *C. violaceum* CV026. Apparently BG1232 did not synthesize short chain N-acyl homoserine lactones (Fig. 1A). In *B. glumae*, TofR, the ortholog to LuxR, activates the transcription of itself and of *tofI* in the presence of C8-HSL [52]. Interestingly, the mutant in the regulator, *B. gladioli* BG87, was not affected in the synthesis of signal molecules detected by *C. violaceum* CV026 (Fig. 1A). In that mutant the transposon insertion is close to the codon of residue D70 of TofR (TraR nomenclature of *Agrobacterium tumefaciens*), which is essential for the activity of this regulator [82,83]. In *B. glumae* BGR1, the expression of *tofI* is completely dependent on the TofR-C8-HSL complex [49]. Thus, a *tofR* mutant derived of *B. glumae* 336gr-1 does not synthesize AHLs [50]. In contrast, a different regulation of *tofI* is exhibited by *B. gladioli* UAPS07070. The mutant BG87 (*tofR::Himar1*) still synthesized AHLs, demonstrating that



**Fig. 2. A**, Map of the quorum sensing region of *B. gladioli* UAPS07070. The site of insertion of the transposon is indicated with ‘*Himar1* followed by the mutant name’. **B**, Map of the *lysR* gene region of *B. gladioli* UAPS07070. The site of the insertion of the transposon is indicated with ‘*Himar1* followed by the mutant name’. The principal domains of LysR-type protein, DNA binding domain (HTH) and co-inducer binding domain (substrate binding) in the LysR-type protein of UAPS07070 are indicated below.



**Fig. 3.** End-point RT-PCR of *toxA* gene. **A**, Agarose gel electrophoresis of *toxA* amplified by approximately 181 bp: lane 1 UAPS07070 (gDNA); lane 2 UAPS07070; lane 3 BG1232; lane 4 BG87; lane 5 BG79, line M leader 100 bp (GeneCraft). **B**, End-point RT-PCR of 16S rDNA gene of approximately 412 bp: lane 1 UAPS07070 (gDNA); lane 2 UAPS07070; lane 3 BG1232; lane 4 BG87; lane 5 BG79.

UAPS07070 *tofI* can be transcribed regardless of the *tofR* mutation. An example of *TofR*-independent regulation of *tofI* is demonstrated by *B. pseudomallei*, in which two of three AHL synthases (*bpsI2* and *bpsI3*) are expressed constitutively [84]. In UAPS07070 the constitutive expression of *tofI* might provoke a fast response to environmental changes before reaching high cell density. This aligns with the production of inhibitory molecules by UAPS07070 in the exponential phase [39]. Another possible explanation is that *tofI* might possess another regulatory sequence besides the lux box. Further research is required to clarify the self-regulation QS system in *B. gladioli* UAPS07070.

### 3.3 Detection of *toxA* expression

The wild type strain, *B. gladioli* UAPS07070, released a deep yellowish pigment into the agar which is indicative of toxoflavin synthesis. This in contrast to the mutants BG1232, BG87 and BG79 (Fig. 1C). Two of the genes for

the synthesis of toxoflavin, *toxA* and *toxB* in *B. gladioli* UAPS07070 were sequenced and compared by BLAST (data not shown). The transcription of *toxA* under experimental condition was evaluated using end-point RT-PCR. This revealed undetectable transcription of *toxA* in the mutants BG1232, BG87 and BG79 (Fig. 3). In contrast, an intense amplicon of *toxA* from RNA was observed in *B. gladioli* UAPS07070 (Fig. 3). These results strongly suggest toxoflavin acting as an antimicrobial of *B. gladioli* UAPS07070 here.

The transcription of *toxA* was undetectable in BG79 indicating a regulatory role of the LysR-type protein for the synthesis of toxoflavin. Our data revealed the participation of QS and of a LysR-type regulator in the toxoflavin production. However, the dependency between both regulation systems is unknown. To elucidate if both regulation systems are related, we explored the synthesis of acyl homoserine lactone by BG79. We found that the synthesis of autoinducer molecules was not hindered in BG79 (Fig. 1A), suggesting a higher hierarchical position of the system QS than the regulator LysR-type.

### 3.4 Swarming phenotype and virulence in onion and lettuce

Swarming is a multicellular movement over a solid or semi-solid surface, and requires flagellae, cell-cell interactions and surfactant [55]. This is exhibited by *B. gladioli* UAPS07070 at 30°C with a dendritic pattern (Fig. 1D). A previous study in *B. gladioli* BSR3 showed QS-dependent swarming motility at 28°C with a movement pattern different than the dendritic one [52]. The interruption of *tofI* or *tofR* genes altered the swarming phenotype of *B. gladioli* UAPS07070 at 30°C (Fig. 1D). This may be related to the QS regulation of the synthesis of rhamnolipids, as what occurs in *B. glumae* [58]. In that model, a *tofI* mutant showed a significantly diminished synthesis of surfactant and decreased swarming activity. We show clearly that in *B. gladioli* UAPS07070, swarming motility is QS-dependent.

*B. gladioli* UAPS07070 inhabits pineapple as an avirulent bacterium [85]. In *in vitro* assays, we detected synthesis of toxoflavin, an important virulence factor involved in the pathogenicity of *B. gladioli* and *B. glumae* in rice and onion [53,75]. Although we have not detected pathogenic activity of *B. gladioli* UAPS07070 in pineapple. In *in vitro* assays in onions, this strain induces pathogenic symptoms. Peculiarly, the BG1232, BG87 and BG79 mutants seem to induce tissue maceration in onion bulb scales (Results not shown). Mutants BG1232 and BG79 showed less severe soft rotting in lettuce leaves (Fig. 1E). On the other hand, mutant in the *tofR* locus, BG87, did not show apparent decrease in virulence in lettuce (Fig. 1E). This is probably due to the AHL synthesis that could regulate toxoflavin-independent virulence mechanisms (Fig. 1A). QS regulatory networks of *B. glumae*, the close relative to *B. gladioli* are diverse as has been shown for strains BGR1 and PG1 [49,86]. Pathogenicity in *B. glumae* PG1 seem to be regulated by two different quorum sensing systems while in BGR1 is only regulated by one system [49,86]. *B. gladioli* BSR3 possess two distant quorum systems in different replicons (Acc. Num. NC\_015376 and NC\_015382) [72]. It is unknown if UAPS07070 possesses more than one quorum loci and if one or both of them are related to pathogenicity. Lee *et al.* [53] reported that between *B. gladioli* and *B. glumae* there are differences in the participation of quorum sensing regulation. *B. gladioli* strain KACC11889 carries the genetic elements for the biosynthesis of toxoflavin but does not possess the quorum sensing genes for activating the synthesis of the phytotoxin. Nevertheless, *B. gladioli* KACC11889 still induces tissue maceration of onion bulb scales and exhibits swarming movement and cannot cause damage

in rice. Thus, the regulation in this bacterium might have evolved differently to *B. gladioli* BSR3 and *B. glumae* BGR1, since in those strains the inactivation of QS system abolished the virulence in onion, toxoflavin production and the swarming motility [49,52,53,58]. Interestingly, two strains of the same species *B. glumae*, BGR1 and PG1, show different regulatory QS behavior [49,86]. It is known that *B. glumae* 237-5, an avirulent strain in rice does not produce toxoflavin and keeps its virulence in onion, indicating that the tissue maceration in onion is not attributed exclusively to toxoflavin [75].

**Acknowledgments:** We thank Herbert P. Schweizer for his valuable gift of the plasmid pHBurk3. This work was supported by grant CONACYT CB-2009 128235-Z and BUAP VIEP. We are grateful for English edition to Joseph Bradley (English Teaching Assistant, Fulbright García-Robles) and to an anonymous professional. We recognize Braulio Fuentes for preparing final figures.

**Conflict of interest:** Authors state no conflict of interest.

## References

- [1] Popat R., Comforth D.M., McNally L., Brown S.P., Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria, *J. R. Soc. Interface*, 2015, 12, 20140882, <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0882>
- [2] Bassler B.L., Wright M., Showalter R.E., Silverman M.R., Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence, *Mol. Microbiol.*, 1993, 9, 773–786
- [3] Piper K.R., Beck von Bodman S., Farrand S.K., Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction, *Nature*, 1993, 362, 448–450
- [4] Latifi A., Winson M.K., Foglino M., Multiple homologs of LuxR and LuxL control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Mol. Microbiol.*, 1995, 17, 333–343
- [5] Costa J.M., Loper J.E., EcbI and EcbR: Homologs of LuxI and LuxR affecting antibiotic and exoenzyme production by *Erwinia carotovora* subsp. *Betavasculorum*, *Can. J. Microbiol.*, 1997, 43, 1164–1171
- [6] Hassett D.J., Ma J.F., Elkins J.G., McDermott T.R., Ochsner U.A., West S.H.E., Huang C.T., Fredericks J., Burnett S., Stewart P.S., McFeters G., Passador L., Iglewski B.H. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide, *Mol. Microbiol.*, 1999, 34, 1082–1093
- [7] Chun H., Choi O., Goo E., Kim N., Kim H., Kang Y., Kim J., Moon J.S., Hwang I., The quorum sensing-dependent gene *katG* of *Burkholderia glumae* is important for protection from

- visible light, *J. Bacteriol.*, 2009, 191, 4152-4157, DOI: 10.1128/JB.00227-09
- [8] Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S., Eberl L., The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility, *Microbiology*, 2001, 147, 2517–2528
- [9] Loh J., Lohar D.P., Andersen B., Stacey G., A two component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes, *J. Bacteriol.*, 2002, 184, 1759–1766
- [10] Shih P.C., Huang C.T., Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance, *J. Antimicrob. Chem.*, 2002, 49, 309–314
- [11] Jang M.S., Goo E., An J.H., Kim J., Hwang I., Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*, *Plos One*, 9, e84831, doi:10.1371/journal.pone.0084831
- [12] Kang Y., Goo E., Kim J., Hwang I., Critical role of quorum sensing-dependent glutamate metabolism in homeostatic osmolality and outer membrane vesiculation in *Burkholderia glumae*, *Sci. Rep.*, 2017, 7, 44195
- [13] Maddocks S.E., Oyston P.C.F., Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins, *Microbiology*, 2008, 154, 3609–3623
- [14] Dobritsa A.P., Samadpour M., Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, 66, 2836-2846
- [15] Lopes-Santos L., Castro D.B.A., Ferreira-Tonin M., Alves Corrêa D.B., Weir B.S., Park D., Mariscal Ottoboni L.M., Rodrigues Neto J., Lanza Destéfano S.A., Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov., *Antoon. Leeuw. Int. J. G.*, 2017, 110, 727–736
- [16] Sawana A., Adeolu M., Gupta R.S., Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species, *Front. Genet.*, 2014, 5, 429, <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- [17] Coenye T., Vandamme P., Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches, *Environ. Microbiol.*, 2003, 5, 719–729
- [18] Vial L., Groleau M.C., Dekimpe V., Déziel E., *Burkholderia* diversity and versatility: An inventory of the extracellular product, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 17, 1407–1429
- [19] Estrada-de los Santos P., Vinuesa P., Martínez-Aguilar L., Hirsch A.M., Caballero-Mellado J., Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis, *Curr. Microbiol.*, 2013, 67, 51-60
- [20] Vandamme P., Opelt K., Knöchel N., Berg C., Schönmann S., De Brandt E., Eberl L., Falsen E., Berg G., *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57, 2228–2235
- [21] Schmidt S., Blom J.F., Pernthaler J., Berg G., Baldwin A., Mahenthiralingam E., Eberl L., Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex, *Environ. Microbiol.*, 2009, 11, 1422–1437
- [22] Ji X., Lu G., Gai Y., Gao H., Lu B., Kong L., Mu Z., Colonization of *Morus alba* L. by the plant growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1, *BMC Microbiol.*, 2010, 10, 243, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-243>
- [23] Lin H.H., Chen Y.S., Li Y.C., Tseng I.L., Hsieh T.H., Buu L.M., Chen Y.L., *Burkholderia multivorans* acts as an antagonist against the growth of *Burkholderia pseudomallei* in soil, *Microbiol. Immunol.*, 2011, 55, 616–624
- [24] Tenorio-Salgado S., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Caballero-Mellado J., Perez-Rueda E., Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens, *Bioengineered*, 2013, 4, 236–243
- [25] Duerkop B.A., Varga J., Chandler J.R., Peterson S.B., Herman J.P., Churchill M.E., Parsek M.R., Nierman W.C., Greenberg E.P., Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*, *J. Bacteriol.*, 2009, 191, 3909–3918
- [26] Seyedsayamdost M.R., Chandler J.R., Blodgett J.A., Lima P.S., Duerkop B.A., Oinuma K., Greenberg E.P., Clardy J., Quorum-sensing-regulated bacteriocin production by *Burkholderia thailandensis* E264, *Org. Lett.*, 2010, 12, 716–719
- [27] Deng P., Wang X., Baird S.M., Showmaker K.C., Smith L., Peterson D.G., Lu S., Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis, *MicrobiologyOpen*, 2016, 5, 353–369
- [28] Kennedy M., Coakley R., Donaldson S., Aris R.M., Hohneker K., Wedd J.P., Knowles M.R., Gilligan P.H., Yankaskas J.R., *Burkholderia gladioli*: Five year experience in cystic fibrosis and lung transplantation center, *J. Cystic Fibrosis*, 2007, 6, 267–73
- [29] Segonds C., Clavel-Batut P., Thouvez M., Grenet D., Le Coustumier A., Plésiat P., Chabanon G., Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli*, *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47, 1510–1516
- [30] Foley P.L., Lipuma J.J., Feldman S.H., Outbreak of otitis media caused by *Burkholderia gladioli* infection in immunocompromised mice, *Comp. Med.*, 2004, 54, 93–99
- [31] Marom A., Miron D., Wolach B., Gavrieli R., Rottem M., *Burkholderia gladioli*-associated facial pustulosis as a first sign of chronic granulomatous disease in a child - Case report and review, *Pediat. Allerg. Imm.*, 2018, 29, 451-453, DOI: 10.1111/pai.12884
- [32] Vigliani M.B., Cunha, C.B., Multiple recurrent abscesses in a patient with undiagnosed IL-12 deficiency and infection by *Burkholderia gladioli*, *IDCASSES*, 2018, 12, 80-83
- [33] Lincoln S., Fermor T., Stead D., Sellwood J., Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*, *Plant Pathol.*, 1991, 40, 136–144
- [34] Matsuyama N., Presumptive identification of several phytopathogenic bacteria by novel diagnostic tests, *J. Agric. Kyushu Univ.*, 1998, 43, 337–343
- [35] Elshafie H.S., Camele I., Racioppi R., Scrano L., Iacobellis N.S., Bufo S.A., In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* against some phytopathogenic fungi, *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 13, 16291–16302
- [36] Jha G., Tyagi I., Kumar R., Ghosh S., Draft genome sequence of broad-spectrum antifungal bacterium *Burkholderia gladioli*

- strain NGJ1, isolated from healthy rice seeds, *Genome Announc.*, 2015, 3, e00803-15, doi:10.1128/genomeA.00803-15
- [37] Yan Q.H., Zhou J.X., Li H.Z., Zhi Q.Q., Zhou X.P., He Z.M., Coexistence of and interaction relationships between an aflatoxin-producing fungus and a bacterium, *Fungal Biol.*, 2015, 7, 605–614
- [38] Ross C., Opel V., Scherlach K., Herweck C., Biosynthesis of antifungal and antibacterial polyketides by *Burkholderia gladioli* in coculture with *Rhizopus microspores*, *Mycoses*, 2014, 3, 48–55
- [39] Marin-Cevada V., Muñoz-Rojas J., Caballero-Mellado J., Mascarúa-Esparza M.A., Castañeda-Lucio M., Carreño-López R., Estrada-de los Santos P., Fuentes-Ramírez L.E., Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple, *Appl. Soil Ecol.*, 2012, 61, 230–235
- [40] Subik J., Behun J., Effect of bongkrekic acid on growth and metabolism of filamentous fungi, *Arch. Microbiol.*, 1974, 97, 81–88
- [41] Moebius N., Ross C., Scherlach K., Rohm B., Roth M., Hertweck C., Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*, *Chem. Biol.*, 2012, 19, 1164–674
- [42] Latuasan H.E., Berends W., On the origin of the toxicity of toxoflavin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 502–508
- [43] Buckle K.A., Kartadarma E., Inhibition of bongkrek acid and toxoflavin production in tempe bongkrek containing *Pseudomonas cocovenenans*, *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, 68, 571–576
- [44] Furuya N., Iiyama K., Shiozaki N., Matsuyama N., Phytotoxin produced by *Burkholderia gladioli*, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 1997, 42, 33–37
- [45] Suzuki F., Sawada H., Azegami K., Tsuchiya K., Molecular characterization of the *tox* operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*, *J. Gen. Plant Pathol.*, 2004, 70, 97–107
- [46] Philmus B., Shaffer B.T., Kidarsa T.A., Yan Q., Raaijmakers J.M., Begley T.P., Loper J.E., Investigations into the biosynthesis, regulation, and self-resistance of toxoflavin in *Pseudomonas protegens* Pf-5, *Chembiochem.*, 2015, 16, 1782–1790
- [47] Song L.J., Jenner M., Masschelein J., Jones C., Bull M.J., Harris S.R., Hartkoorn R.C., Vocat A., Romero-Canelon I., Coupland P., Webster G., Dunn M., Weiser R., Paisey C., Cole S.T., Parkhill J., Mahenthalingam E., Challis G.L., Discovery and biosynthesis of gladiolin: A *Burkholderia gladioli* antibiotic with promising activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139, 7974–7081
- [48] Jenner M., Masschelein J., Dashti Y., Jones C., Harris S., Parkhill J., Pearce C., Mahenthalingam E., Challis G.L., Biosynthesis of a 'fungal' peptide antibiotic by *Burkholderia gladioli*, *Planta Med.*, 2016, 82, abstr. P1112
- [49] Kim J., Kim J.G., Kang Y., Jang J.Y., Jog G.J., Lim J.Y., Kim S., Suga H., Nagamatsu T., Hwang I., Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*, *Mol. Microbiol.*, 2004, 54, 921–934
- [50] Chen R.X., Barphagha I.K., Karki H.S., Ham J.H., Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *tofM* for toxoflavin production, *Plos One*, 2012, 7, e52150
- [51] Chen R., Barphagha I.K., Ham J.H., Identification of potential genetic components involved in the deviant quorum-sensing signaling pathways of *Burkholderia glumae* through a functional genomics approach, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2015, 5, 22, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2015.00022>
- [52] Kim S., Park J., Choi O., Kim J., Seo J.-S., Investigation of quorum sensing-dependent gene expression in *Burkholderia gladioli* BSR3 through RNA-seq analyses, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 24, 1609–1621
- [53] Lee J., Park J., Kim S., Park I., Seo Y.S., Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*, *Mol. Plant Pathol.*, 2016, 17, 65–76
- [54] Chapalain A., Vial L., Laprade N., Dekimpe V., Perreault J., Deziel E., Identification of quorum sensing-controlled genes in *Burkholderia ambifaria*, *MicrobiologyOpen*, 2012, 2, 226–242
- [55] Kearns D.B., A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 634–644
- [56] Partridge J.D., Harshey R.M., Swarming: flexible roaming plans, *J. Bacteriol.*, 2013, 195, 909–918
- [57] Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J., Quorum sensing and swarming migration in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, 28, 261–289
- [58] Nickzad A., Lépine F., Déziel E., Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids, *Plos One*, 2015, 10, e0128509
- [59] Rhol D.A., Trunck L.A., Schweizer H.P., *Himar1* in vivo transposon mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 7529–7535
- [60] Somprasong N., McMillan I., Karkhoff-Schweizer R.R., Mongkolsuk S., Schweizer H.P., Methods for genetic manipulation of *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans*, *BMC Res. Notes*, 2010, 3, 308, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-308>
- [61] Choi K.H., Khumar A., Schweizer H.P., A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation, *J. Microbiol. Meth.*, 2006, 64, 391–397
- [62] Muñoz-Rojas J., Fuentes-Ramírez L.E., Caballero-Mellado J., Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, 54, 57–66
- [63] Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 4673–4680
- [64] McClean K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P., Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones, *Microbiology*, 1997, 143, 3703–3711
- [65] Jung W.S., Lee J., Kim M.I., Ma J., Nagamatsu T., Structural and functional analysis of phytotoxin toxoflavin-degrading enzyme, *Plos One*, 2011, 6, e22443
- [66] Atshan S.S., Shamsudin M.N., Lung L.T., Ling K.H., Sekawi Z., Pei C.P., Ghaznavi-Rad E., Improved method for the isolation of

- RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm, *Gene*, 2012, 494, 219–224
- [67] Yu Z., Morrison M., Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 4800–4806
- [68] Jacobs J.L., Fasi A.C., Ramette A., Smith J.J., Hammerschmidt R., Sundin G.W., Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 3121–3129
- [69] Ibrahim M., Tang Q.M., Shi Y., Almoneafy A., Fang Y., Xu L.H., Li W., Li B., Xie G.L., Diversity of potential pathogenicity and biofilm formation among *Burkholderia cepacia* complex water, clinical, and agricultural isolates in China, *World J. Microb. Biot.*, 2012, 28, 2113–2123, DOI: 10.1007/s11274-012-1016-3
- [70] Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T., Farris M.A., Roop R.M.II, Peterson K.M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, *Gene*, 1995, 166, 175–176
- [71] Gelencsér Z., Choudhary K.S., Coutinho B.G., Hudaiberdiev S., Galbáts B., Venturi V., Pongor S., Classifying the topology of AHL-driven quorum sensing circuits in proteobacterial genomes, *Sensors*, 2012, 12, 5432–5444
- [72] Choudhary K.S., Hudaiberdiev S., Gelencsér Z., Gonçalves Coutinho B., Venturi V., Pongor S., The organization of the quorum sensing *luxI/R* family genes in *Burkholderia*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14, 13727–13747
- [73] Jang M.S., Goo E., An J.H., Kim J., Hwang I., Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*, *Plos One*, 2014, 9, e84831
- [74] Ham J.H., Melanson R.A., Rush M.C., *Burkholderia glumae*: Next major pathogen of rice? *Mol. Plant Pathol.*, 2011, 12, 329–339
- [75] Karki H.S., Shrestha B.K., Han J.W., Groth D.E., Barphagha I.K., Rush M.C., Melanson R.A., Kim B.S., Ham, J.H., Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*, *Plos One*, 2012, 7, e45376
- [76] Prashanth S.N., Bianco G., Cataldi T.R.I., Iacobeli N.S., Acylhomoserine lactone production by bacteria associated with cultivated mushrooms, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 11461–11472
- [77] Jones C., Bull M.J., Jenner M., Song L., Dashti Y., Harris S.R., Parkhill J., Connor T.R., Challis G.L., Mahenthiralingam E., Genome mining and characterisation of multiple bioactive compounds from a *Burkholderia gladioli* isolate collection, *Planta Med.*, 2016, 82, 1, abstr. SL42
- [78] Naughton L.M., An S.Q., Hwang I., Chou S.H., He Y.Q., Tang J.L., Ryan R.P., Dow J.M., Functional and genomic insights into the pathogenesis of *Burkholderia* species to rice, *Environ. Microbiol.*, 2016, 18, 780–790
- [79] Wright S.A., Zumoff C.H., Schneider L., Beer, S.V., *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 284–292
- [80] Quecine M.C., Kidarsa T.A., Goebel N.C., Shaffer B.T., Henkels M.D., Zabriskie T.M., Loper J.E., An interspecies signaling system mediated by fusaric acid has parallel effects on antifungal metabolite production by *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 and antibiosis of *Fusarium* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 82, 1372–1382
- [81] Chambers C.E., Lutter E.I., Visser M.B., Law P.P., Sokol P.A., Identification of potential CepR regulated genes using a *cep* box motif-based search of the *Burkholderia cenocepacia* genome, *BMC Microbiol.*, 2006, 22, 104
- [82] Koch B., Liljefors T., Persson T. Nielsen J., Kjelleberg S., Givskov M., The LuxR receptor: the sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors, *Microbiology*, 2005, 151, 3589–3602
- [83] Zhang R.G., Pappas T., Brace J.L., Miller P.C., Oulmassov T., Molyneaux J.M., Anderson J.C., Bashkin J.K., Winans S.C., Joachimiak A., Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA, *Nature*, 2002, 417, 971–974
- [84] Kiratisin P., Sanmee, S., Roles and interactions of *Burkholderia pseudomallei* BpsIR quorum-sensing system determinants, *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, 7291–7297
- [85] Marin-Cevada V., Caballero-Mellado J., Bustillos-Cristales R., Muñoz-Rojas J., Mascarúa-Esparza M.A., Castañeda-Lucio M., López-Reyes L., Martínez-Aguilar L., Fuentes-Ramírez L.E., *Tatumella ptyseos* an unrevealed causative agent of Pink disease in pineapple, *J. Phytopathol.*, 2010, 158, 93–99
- [86] Gao R., Krysiak D., Petersen K., Utpatel C., Knapp A., Schmeisser C., Daniel R., Voget S., Jaeger K.-E., Streit W.R., Genome-wide RNA sequencing analysis of quorum sensing-controlled regulons in the plant-associated *Burkholderia glumae* PG1 strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 81, 7993–8007, doi:10.1128/AEM.01043-15
- [87] Bustillos-Cristales M.R., Corona-Gutierrez I., Castañeda-Lucio M., Águila-Zempoaltécatl C., Seynos-García E., Hernández-Lucas I., Muñoz-Rojas J., Medina-Aparicio L., Fuentes-Ramírez L.E., Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia macrocephala* possess the locus *xoxF* and consume methanol in the presence of Ce<sup>3+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, *Microbes Environ.*, 2017, 32, 244–251, https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsme2, doi:10.1264/jsme2.ME17070
- [88] Hanahan D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.*, 1983, 166, 557–580

**Supplemental Material:** The online version of this article (DOI: 10.1515/biol-2019-0019) offers supplementary material.