



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

ESTUDIO SOBRE EL PAPEL DE LOS LÍPIDOS DE ORNITINA EN BACTERIAS
DE LA FAMILIA *Burkholderiaceae*

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
IPB. LUZ AMÉRICA CÓRDOBA CASTRO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP (CCG)

COMITÉ TUTOR:
DR. OTTO GEIGER (CCG)
DR. EDMUNDO CALVA MERCADO (IBT)

CUERNAVACA, MORELOS Marzo de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo, de tesis de doctorado se realizó en el laboratorio de Ecología Genómica del Grupo de Investigación II, Interacciones entre Pro- y Eucariotas del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Christian Sohlenkamp.

El proyecto fue financiado con apoyos de beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 295964 y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP- UNAM) por el recurso económico para participar en la presentación del proyecto en la modalidad de cartel en el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica en Aguascalientes, del 6 al 11 de noviembre del 2016.

Sueña en grande, trabaja por ellos y hazlos realidad mi querida princesa de vida

Violeta Durán Córdoba

AGRADECIMIENTOS

De manera especial a mi tutor y amigo Dr. Christian Sohlenkamp por darme la gran oportunidad de hacer parte de su grupo de investigación y quien durante mi estancia me brindó su apoyo, confianza, paciencia y enseñanza en cada discusión para mi crecimiento científico y personal.

A los demás miembros del comité tutor Dr. Otto Geiger y Dr. Edmundo Calva M. por sus aportes académicos en cada tutorial para la ejecución de este proyecto.

A los miembros del jurado evaluador, Dr Miguel Ángel Cevallos Gaos, Dra Gloria Soberon Chávez, Dr. Guadalupe Espin Ocampo y Dr. Adrián Fernando Álvarez. Por su apoyo, aportes y dedicación en la revisión de este trabajo de grado.

A todo el programa de Ecología genómica, los grupos de la Dra. Esperanza Martínez, Dr. Otto Geiger, Dra. Isabel Lara y Dr. Christian Sohlenkamp, por su apoyo y aportes académicos para mi crecimiento investigativo.

A nuestros colaboradores y sus grupos de trabajo Dr. Ziquiang Guan (Centro médico de la Universidad de Duke), Dr. Edgar Dantan (UAEM) y Dr. Mario Serrano y Dr. Miguel Ángel Cevallos (CCG-UNAM) por su apoyo para la ejecución y desarrollo de este proyecto de investigación.

Al CONACyT, la UNAM y al CCG por todos los recursos invertidos en mi formación para el desarrollo de este posgrado.

A las coordinaciones del Dr. Pablo Vinuesa, la Dra. Susana Brom y actualmente la Dra. Eria Rebollar Caudillo y el personal administrativo Gladis Avilés y Denny Peralta por su todo su apoyo en la gestión administrativa durante todo mi posgrado.

A mis compañeros y amigos algunos presentes y otros que ya no están en el CCG pero que hicieron de mi estancia un experiencia única y muy agradable: Ángeles, Lulú, Yessy, Jess, Violeta, Leidy, Julio, Gyo, Tonalli, Jony Padilla, Juan, Jony Olea, Miguel, Don Martin, Ivonne.

A mis alumnas Nahomy y Naomi, por permitirme la oportunidad de acompañarlas y brindarles mis conocimientos durante su estancia de servicio social del programa Técnico de Laboratorio Clínico de la UAEM

A mi familia, mi hija Violeta mi nueva compañera de aventuras, por su paciencia pura e inocente y ser mi mayor motor para seguir forjando los sueños. A mis padres Marina y Rafael y mi hermano Edward, por su apoyo incondicional y su voz de aliento cuando por momentos se cree ya no tener fuerzas para seguir. A mi compañero y amigo Andrés Duran quien me motivó y acompañó en esta gran aventura y siempre brindó una mano para seguir adelante.

A mis amigos y familia construida de corazón COFRAMEX, Olguita, mi comadre Sol y familia, Edna Ayerim, Benjamín y Gaby Casrrasquel por su amistad y hacer de mi estancia en México una gran Aventura

1 CONTENIDO

RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	16
1.1 Lípidos de Ornitina (OLs)	16
1.1.1 Biosíntesis y modificaciones	17
1.1.2 Regulación de la síntesis de OLs por el regulon Pho	20
1.2 Características del complejo <i>Burkholderia sensu lato</i> (s.l.)	22
1.2.1 Lípidos de ornitina en <i>Burkholderia</i> s. l.	22
1.2.2 Modelos de estudios para evaluar la interacción de hospederos eucariotas con especies del complejo <i>Burkholderia</i> s. l.	23
2 HIPÓTESIS	26
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIALES Y METODOS	27
4.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	27
4.2 Determinación de la composición de lípidos de membrana	28
4.3 Construcción del árbol filogenético	28
4.4 Identificación de putativas cajas Pho	30
4.5 Limitación de fosfato	31
4.6 Expresión de <i>olsF</i> en <i>Robbsia andropogonis</i>	31
4.7 Análisis de muestras de lípidos por cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	32
4.8 Condiciones de crecimiento frente a estreses abióticos	33
4.9 Ensayos de sensibilidad a antibióticos y detergentes.	33
4.10 Ensayo de virulencia de <i>Burkholderia cenocepacia</i> usando larvas de <i>Galleria mellonella</i>	35

4.11	Prueba de virulencia sobre plantas de maíz con las cepas de <i>Robbsia andropogonis</i>	36
4.12	Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas de maíz	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	<i>Burkholderia</i> sensu lato y sus composiciones lipídicas de membrana: solo las cepas sensu stricto forman OLs constitutivamente y existe una correlación entre la composición lipídica y su filogenia	38
5.2	Los 43 genomas de <i>Burkholderia</i> sensu lato analizados poseen genes homólogos codificando para la <i>N</i> -aciltransferasa OlsB (Bcal1281).....	41
5.3	La síntesis de OLs en los géneros recientemente propuestos probablemente esté regulado por el sistema de dos componentes PhoRB	42
5.4	La síntesis de OLs está probablemente regulada por limitación de fosfato en los géneros recientemente propuestos.	45
5.5	La expresión del gen <i>olsF</i> causa la formación constitutiva de OLs en <i>Robbsia andropogonis</i>	46
5.6	La ausencia de OLs afecta el crecimiento de <i>B. cenocepacia</i> en condiciones de estrés ácido.....	48
5.7	La permeabilidad de la membrana no depende de la presencia o ausencia de OLs en las cepas de <i>Burkholderia cenocepacia</i> y/o <i>Robbsia andropogonis</i>	51
5.8	La ausencia de OLs en <i>Burkholderia cenocepacia</i> reduce su virulencia en el modelo de infección <i>Galleria mellonella</i> en condiciones específicas.	53
5.9	La presencia de OLs en <i>R. andropogonis</i> induce una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plántulas de maíz inmediatamente después de la infección.....	56
5.10	La formación constitutiva de OLs no modifica la progresión de la infección causada por <i>Robbsia andropogonis</i> en plantas de maíz.	58
6	DISCUSIÓN.....	60
7	CONCLUSIONES.....	65

8	PERSPECTIVAS	66
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10	ANEXOS	87
10.1	Anexo 1: Lista de cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio	87
10.2	Anexo 2: Proteínas homólogas a <i>N</i>-aciltransferasa OlsB probablemente responsable del primer paso de la síntesis de OLs en <i>Burkholderia</i> s.l.	88
10.3	Anexo 3: Artículo “Ornithine lipids role in <i>Burkholderia</i> spp pathogenicity” Córdoba-Castro, L. A., Salgado-Morales, R., Torres, M., Martínez-Aguilar, L., Lozano, L., Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Dantán-González, E., Serrano, M., and Sohlenkamp, C. (2021). <i>Frontiers in molecular biosciences</i>, 7, 610932. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.610932	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones enzimáticas para la síntesis de OLs modificados y sin modificar	19
Figure 2. La síntesis de OLs es constitutiva tan solo en cepas pertenecientes al género <i>Burkholderia</i> sensu stricto (s.s), pero está ausente en las otras cepas analizadas	38
Figura 3. Árbol filogenético basado en un análisis de genomas de <i>Burkholderiales</i>	40
Figura 4. El contexto genómico de genes de <i>olsB</i> está conservado en <i>Burkholderia</i> s.l	41
Figura 5. Matriz de puntuación específica de posición (PSSM) de las cajas Pho obtenidas mediante el programa INFO-GIBBS.	43
Figura 6. La síntesis de OLs está regulada por limitación de fosfato en los géneros recientemente propuestos.	45
Figure 7. En <i>R. andropogonis</i> LMG2129 expresando la aciltransferasa bifuncional OlsF se forman OLs y 2OH-OLs.....	47
Figura 8. La ausencia de OL en <i>B. cenocepacia</i> afectó levemente su crecimiento en condiciones de estrés por temperatura, pero en <i>R. andropogonis</i> la presencia de OL no aumentó la tolerancia a este estrés.....	49
Figura 9. La ausencia de OLs en <i>B. cenocepacia</i> afectó levemente su crecimiento en condiciones de bajo pH, pero en <i>R. andropogonis</i> la presencia de OL no afectó la tolerancia a este estrés.	49
Figura 10. La presencia o ausencia de OLs en <i>B. cenocepacia</i> o <i>R. andropogonis</i> no afectó el crecimiento en condiciones de estrés osmótico.	50
Figura 11. La permeabilidad de la membrana no depende de la presencia o ausencia de OLs <i>B. cenocepacia</i> y/o <i>R. andropogonis</i>	52
Figura 12. La melanización en larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas con las cepas de <i>B. cenocepacia</i> ocurre en presencia del patógeno y no depende de la presencia de OLs.....	53
Figura 13. La mutante de <i>B. cenocepacia</i> que carece de OLs causa menor mortalidad en las larvas de <i>Galleria mellonella</i> en algunas condiciones	55
Figura 14. La presencia de OLs en <i>R. andropogonis</i> aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) directamente después de la infiltración en las hojas de las plantas de maíz.....	57

Figura 15. La presencia constitutiva de OLS no modifica la progresión de la infección por *R. andropogonis* en hojas de maíz 59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genomas de especies del complejo <i>Burkholderia</i> s.l. descargados de la base de datos NCBI RefSeq.	29
Table 2. Secuencias de motivos de caja Pho de las regiones promotoras de los genes genes implicados en la biosíntesis de glicolípidos y lípidos de la membrana en <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Mesorhizobium loti</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
Tabla 3. Discos de antibióticos (marca Oxoid) usados en los ensayos de sensibilidad.....	35
Tabla 4. Cajas Pho putativas identificadas en la región promotora cadena arriba de genes que codifican homólogos de OlsB en especies de <i>Burkholderia</i> s.l.....	44

RESUMEN

El complejo multigénero conocido como *Burkholderia sensu lato* (s.l.) está compuesto por un grupo muy diverso de especies bacterianas metabólicamente muy versátiles. Este complejo incluye bacterias de importancia clínica, patógenos de animales y plantas, así como especies benéficas con el medio ambiente, promotoras de crecimiento de plantas o fijadoras de nitrógeno, entre otras. Una característica que se consideraba única del género *Burkholderia* era la presencia de dos formas de lípidos de membrana de fosfatidiletanolamina (PE) y lípidos de ornitina (OL) con y sin la 2-hidroxilación en uno de los ácidos grasos.

En este estudio, queríamos comprender la función de los OLs en el complejo *Burkholderia* s.l. Primero, se estudió la composición de los lípidos de membrana de un conjunto representativo de bacterias pertenecientes a este complejo para saber qué tan extendidos están los OLs y las formas hidroxiladas de PE y OLs. Se encontró que todas las cepas analizadas pertenecientes al complejo *Burkholderia* s.l. sintetizan las dos formas de PE, pero que solo las bacterias del género *Burkholderia sensu stricto* (s.s.) sintetizan ambas formas de OLs de manera constitutiva. La ausencia de la formación constitutiva de OLs en los géneros recientemente propuestos (*Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Mycetohabitans* y *Trinickia*) no se debe a la ausencia de genes involucrados en la biosíntesis de OL, porque sus genomas contienen homólogos del gen Bcal1281 que codifica para la *N*-aciltransferasa OlsB responsable del primer paso en la síntesis de OL en *B. cenocepacia*. Es probable que la formación de OLs solo ocurre en condiciones específicas en estas cepas. Además, se detectaron posibles cajas Pho antecediendo a los genes *olsB* en algunos de los genomas analizados, indicando que la síntesis de OLs se induce en condiciones limitantes de fosfato.

Posteriormente, se seleccionaron dos bacterias modelo para estudiar la función de OLs en *Burkholderia* s.l.: (1) *B. cenocepacia* de tipo silvestre que forma constitutivamente OLs y su mutante deficiente en la síntesis de OLs y (2) *Robbsia andropogonis* (anteriormente *B. andropogonis*) que no forma OLs de manera constitutiva, y una cepa derivada que sintetiza

de manera constitutiva OLS mediante la expresión del gen *olsF* de *Serratia proteomaculans*. Las cepas se caracterizaron en condiciones de vida libre y durante interacciones patógenicas con sus respectivos hospederos. La ausencia de OLS en *B. cenocepacia* afectó levemente el crecimiento bacteriano en condiciones específicas de estrés abiótico, como la alta temperatura y el bajo pH. Además, la mutante de *B. cenocepacia* que carece de OLS causó una menor mortalidad en las larvas de *Galleria mellonella* en condiciones específicas. Por otra parte, *R. andropogonis* que formaba constitutivamente OLS desencadenó una mayor formación de especies reactivas de oxígeno inmediatamente después de la infección en las hojas de maíz, lo que sugiere que los OLS pueden tener un papel importante durante la activación de la respuesta inmune innata de eucariotas.

ABSTRACT

The multi-genus complex known as *Burkholderia* sensu lato (s.l) is composed of a diverse and metabolically versatile group of bacterial species. This complex includes bacteria of clinical importance, pathogens of animals and plants, as well as species beneficial to the environment, plant growth-promoting bacteria, and nitrogen fixers, among others. One characteristic that was considered to be unique for the genus *Burkholderia* was the presence of two forms of the membrane lipids phosphatidylethanolamine (PE) and ornithine lipids (OLs) with and without 2-hydroxylation in one of the fatty acids.

In this study, we wanted to understand the function of OLs in the complex *Burkholderia* s.l. First, the membrane lipid compositions of a representative set of bacteria belonging to this complex were studied to learn how widespread OLs and the hydroxylated forms of PE and OLs are. It was observed that all analyzed strains belonging to the complex *Burkholderia* s.l. synthesize the two forms of PE, but only the bacteria of the genus *Burkholderia* sensu strictu (s.s) constitutively synthesize both forms the OLs. The absence of OL formation in the recently proposed genera *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Mycetohabitans*, and *Trinickia* seems not to be due to the absence of genes involved in the biosynthesis of OLs because the analyzed genomes contained genes encoding homologues of the *N-acyltransferase* Bca11281 (OlsB) responsible for the first step of OL synthesis of in *B. cenocepacia*. It is probable that OL formation only occurs under specific growth conditions in these strains. Pho boxes preceding the genes encoding OlsB homologues were predicted in some of the genomes analyzed, indicating that OL synthesis is induced under phosphate limiting conditions.

Then, two model bacteria were selected to study the function of OLs in *Burkholderia* s.l.: (1) *B. cenocepacia* which constitutively forms OLs and its mutant deficient in the formation of OLs and (2) *Robbsia andropogonis* (formerly *B. andropogonis*) which does not form OLs, and a derived strain constitutively forming OLs through the expression of the *olsF* gene from *Serratia proteomaculans*. The strains were characterized under free-living conditions and during pathogenic interactions with their respective hosts. The absence of OLs

in *B. cenocepacia* slightly affected bacterial growth under specific abiotic stress conditions such as high temperature and low pH. Also, the *B. cenocepacia* mutant lacking OLs caused a lower mortality in *Galleria mellonella* larvae under specific conditions. On the other hand, *R. andropogonis* constitutively forming OLs triggers an increased formation of reactive oxygen species immediately after infection of maize leaves, suggesting that OLs can have an important role during the activation of the innate immune response of eukaryotes.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos de membrana son moléculas anfifílicas y una de sus funciones principales es formar la bicapa lipídica de la membrana que limita una célula y sirve como barrera semipermeable. El ejemplo más conocido de lípidos de membrana son los glicerofosfolípidos como por ejemplo el fosfatidilglicerol (PG), la fosfatidiletanolamina (PE), la cardiolipina (CL) y la fosfatidilcolina (PC). Dependiendo de la clase de organismo, existen otros lípidos como los hopanoides, los esfingolípidos, los sulfolípidos, los lípidos de betaína o los lípidos de ornitina (OLs), que pueden estar presentes en las membranas en diferentes concentraciones. Con frecuencia, algunos de estos lípidos solo los sintetizan algunos grupos específicos de bacterias o solo se producen bajo condiciones específicas de estrés (Geiger *et al.*, 2010).

1.1 Lípidos de Ornitina (OLs)

En muchas bacterias se han identificado aminolípidos con una estructura aciloxiacil, los cuales son lípidos de membrana carentes de fósforo. Los aminoácidos que pueden estar presentes dentro de la estructura de estos son la glicina, la glicinaserina, la lisina, la glutamina y la ornitina, formando así lípidos de glicina, lípidos de glicinaserina, lípidos de lisina, lípidos de glutamina y OLs, respectivamente (Sohlenkamp C. 2019). En este grupo de aminolípidos los OLs son el tipo más común. Basados en el análisis de las secuencias del ADN genómico, se estima que aproximadamente el 50% de las especies bacterianas secuenciadas tienen la capacidad de formar OLs de manera constitutiva o en condiciones específicas de crecimiento (Vences-Guzmán *et al.*, 2015; Sohlenkamp and Geiger, 2016). La estructura básica de OLs está compuesta por un ácido graso 3-hidroxilado unido por un enlace amida al grupo α -amino de la ornitina y un segundo ácido graso esterificado unido al grupo 3-hidroxilo del primero (Figura 1) (González-Silva *et al.*, 2011). Estos lípidos se han encontrado en bacterias y están ausentes en eucariotas o arqueas (Geiger *et al.*, 2010).

1.1.1 Biosíntesis y modificaciones

La ruta de biosíntesis de OLs se describió por primera vez en *Sinorhizobium meliloti* mediante dos reacciones secuenciales catalizadas por las dos aciltransferasa OlsBA (Weissenmayer *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004). La vía OlsBA está presente en varias alfa y beta proteobacterias, en unas pocas gamma proteobacterias y en varios actinomicetos (López-Lara y Geiger 2017) (Figura 1, reacción indicada con flechas negras). Por otra parte, la aciltransferasa bifuncional OlsF responsable de la biosíntesis de OLs se describió por primera vez en *Serratia proteamaculans* (Vences-Guzmán *et al.*, 2015). El gen que codifica para OlsF está presente en unas algunas gamma proteobacterias, delta y épsilon-proteobacterias y en bacterias que pertenecen al grupo *Cytophaga-Flavobacterium Bacteroidetes* (CFB) (López-Lara y Geiger 2017) (Figura 1, reacción indicada con flechas rosadas). Este OL formado por OlsBA u OlsF también se llama OL no modificado. Además, se ha descrito la presencia de OLs en el planctomiceto *Singulisphaera acidiphila* (Escobedo-Hinojosa *et al.* 2015), sin embargo, su genoma carece de los genes que codifican para homólogos OlsBA u OlsF. Esto indica que la vía de síntesis de los OLs es distinta y queda por descubrir.

Existen algunas bacterias que pueden introducir hidroxilaciones ya sea en el grupo cabeza o en las cadenas de ácidos grasos o *N*-metilaciones en el OL formado por OlsBA/OlsF (Sohlenkamp y Geiger, 2016). Hay evidencia que estas modificaciones pueden jugar un papel importante en respuesta a los estreses ambientales. A la fecha se han descrito tres hidroxilasas que modifican el OL en tres diferentes posiciones: OlsC, descrita por primera vez en *Rhizobium tropici* (Rojas-Jiménez *et al.*, 2005; Vences-Guzmán *et al.*, 2011), es responsable de introducir un grupo hidroxilo en la posición 2 del ácido graso esterificado de OL (Figura 1, reacción indicada con flechas rojas). La hidroxilasa OlsD, descrita en *Burkholderia cenocepacia* (González-Silva *et al.*, 2011), es responsable de introducir un grupo hidroxilo en la posición 2 en el ácido graso amidificado del OL (Figura 1, reacción indicada con flechas azul claro). Finalmente, OlsE también descrita en *R. tropici* (Vences-Guzmán *et al.*, 2011), introduce un grupo hidroxilo en la posición C-4 del grupo de cabeza de ornitina (Hölzl, G. *et al.*, 2018) (Figura 1, reacción indicada con flechas rojas). También se han descrito *N*-metilaciones en el OL. En el planctomiceto *Singulisphaera acidiphila* se identificaron OLs

trimetilados en la función δ -amino del grupo de cabeza de la ornitina (Moore, *et al.*, 2013) (Figura 1, reacción marcada con flechas marrones) y posteriormente se ha descrito en este organismo OlsG, una *N*-metiltransferasa de Ols responsable de trimetilar en el δ -amino de Ols (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2015)

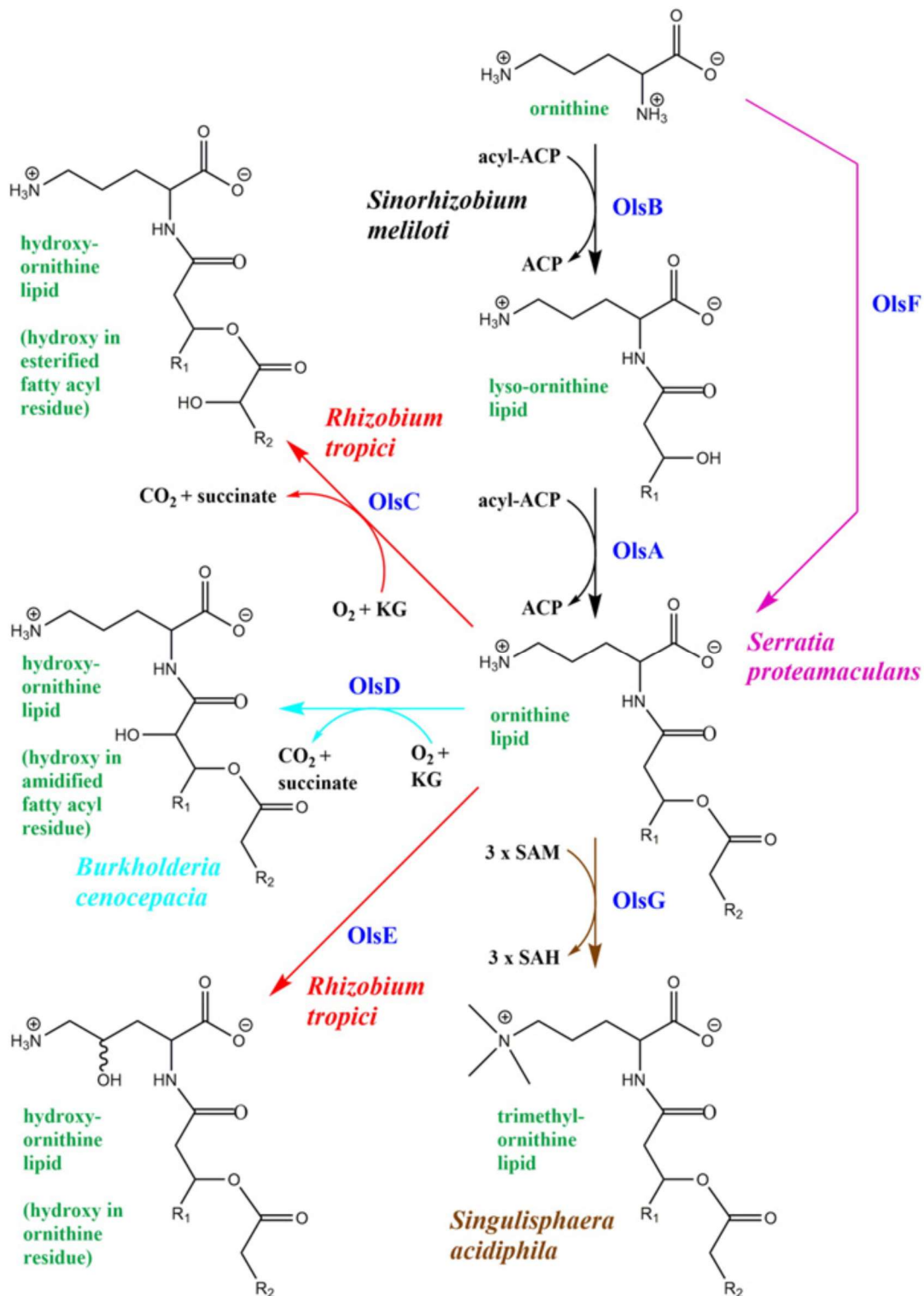


Figura 1. Reacciones enzimáticas para la síntesis de OLs modificados y sin modificar

Los nombres de las enzimas se indican en azul. Las reacciones que ocurren en *Sinorhizobium meliloti* se representan con flechas negras. Las reacciones que ocurren adicionalmente en *Rhizobium tropici*, *Serratia proteamaculans*, *Burkholderia cenocepacia* o *Singulisphaera acidiphila* se indican con flechas rojas, rosadas, azul claro o marrones, respectivamente. (Tomada de la revisión de López-Lara y Geiger 2017).

1.1.2 Regulación de la síntesis de OLs por el regulon Pho

El fósforo es un elemento esencial para muchos procesos celulares y forma parte de las membranas celulares y de los ácidos nucleicos. Las células adquieren el fósforo, en gran medida, a partir de fosfato inorgánico (Pi) (Wanner, 1996; Lamarche *et al.*, 2008b; Crépin *et al.*, 2011; Santos-Beneit, 2015; Shropshire, *et al.*, 2021). Sin embargo, la deficiencia de fosfato es una característica frecuente en muchos hábitats. Esta limitación es un factor que limita el crecimiento de las plantas y de muchos microbios. Para hacer frente a la limitación del fósforo los organismos emplean diferentes estrategias como: (i) mayor solubilización de compuestos que contienen fósforo; (ii) absorción más eficiente en las células; y (iii) menor uso de fósforo al sintetizar sus biomoléculas (Bielecki, 1973; Zavaleta-Pastor *et al.* 2010). Se piensa que los organismos pueden redirigir el fosfato que en condiciones suficientes se ocuparía para la síntesis de fosfolípidos a la síntesis de otros componentes esenciales para la supervivencia, como lo es la síntesis de ácidos nucleicos (Zavaleta-Pastor *et al.* 2010).

Las bacterias utilizan mecanismos especiales para detectar los niveles extracelulares de fosfato inorgánico (Pi) y una de las respuestas a la limitación de este elemento es expresar los genes del regulón Pho involucrados en el transporte y metabolismo de los compuestos de fósforo (Antelmann, *et al.*, 2000; Von Krüger, *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2018). En las bacterias Gram positivas, el regulón Pho está bien estudiado en el género *Bacillus*, donde el sistema de dos componentes PhoPR media una respuesta específica al estrés por limitación de fosfato, resultando por ejemplo en el recambio de ácidos teicoicos en la pared celular (Antelmann *et al.*, 2000; Prunty *et al.*, 2018; Shropshire, *et al.*, 2021). En las bacterias Gram-negativas, la respuesta al estrés de Pi está controlada por el sistema de dos componentes PhoRB, que también desempeña un papel en la respuesta al estrés por limitación de fosfato y la virulencia bacteriana, entre otros procesos (Lery, *et al.*, 2013; Von Krueger, *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2018). A altas concentraciones externas de Pi, se hipotetiza que PhoR forma un complejo de represión con el transportador de Pi de alta afinidad, PstSCAB (Shropshire, *et al.*, 2021). Sin embargo, en concentraciones bajas de Pi, PhoR se libera de esta represión y puede activar a su regulador transcripcional, PhoB, que se fosforila para unirse a motivo nucleotídico altamente conservado llamado caja Pho que se

encuentra ubicada en la región promotora de los genes a los cuales regula (Geske *et al.*, 2013; Shropshire, *et al.*, 2021). Algunos estudios proteómicos han sugerido que la respuesta a la limitación de Pi podría involucrar más de 400 proteínas (Van Bogelen *et al.*, 1996; Shropshire, *et al.*, 2021)

La respuesta al estrés por privación de Pi no solo es fundamental para la supervivencia celular, sino que a menudo está relacionada con la virulencia, la resistencia a los antimicrobianos y a las modificaciones de la pared celular que pueden ocurrir bajo el agotamiento de Pi (Taylor *et al.*, 1998; Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010; Shropshire, *et al.*, 2021). En algunas bacterias se ha descrito la remodelación de la membrana celular con la sustitución de fosfolípidos por glicolípidos u otros lípidos que no contienen fósforo (Geskes *et al.*, 2013). *Sinorhizobium meliloti*, cuando se encuentra en condiciones limitantes de fosfato reemplaza parcialmente la mayoría de sus fosfolípidos de membrana por lípidos libres de fósforo como lo son: sulfolípidos sulfoquinovosil diacilglicerol (SL), diacilgliceril-*N, N, N*-trimetilhomoserina (DGTS) y OLs (Geiger *et al.* 1999; Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010). Experimentos de pulso y caza realizados por Zavaleta-Pastor y colaboradores (2010) sugieren que una fosfolipasa C degrada los fosfolípidos de ion híbrido o zwitteriónicos PE y PC, liberando el fosfoalcohol respectivo (que puede ser usado Pi para otras biomoléculas) y el ácido fosfatídico o diacilglicerol (DAG) que sirve como sustrato inicial en la biosíntesis de DGTS y SL en condiciones limitantes de fósforo.

La biosíntesis de OLs en condiciones de limitación de fosfato se ha visto también en otras especies bacterianas como: *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas diminuta*, *Desulfovibrio alaskensis*, *Serratia proteamaculans* y *Vibrio cholerae* que no forman OLs cuando las bacterias crecen en medios complejos, los cuales suelen ser ricos en fosfato, pero inducen la síntesis de OLs u otros lípidos libres de fósforo en condiciones de crecimiento limitado por la disponibilidad de Pi y reemplazan parcialmente algunos de sus fosfolípidos de membrana (Minnikin and Abdolrahimzadeh, 1974; Benning *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1999; Lewenza *et al.*, 2011; Bosak *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2018). Sin embargo, también se ha observado que la síntesis de OLs ocurre de manera

constitutiva en algunas bacterias como *Rhizobium tropici* CIAT899, *Agrobacterium tumefaciens* o en algunas especies del género *Burkholderia* (Sohlenkamp and Geiger, 2016).

1.2 Características del complejo *Burkholderia sensu lato* (s.l)

El complejo multigénero que se conoce como *Burkholderia* s. l. es muy diverso y versátil, y contiene más de 100 especies bacterianas aisladas de una gran variedad de ambientes. Se encuentran por ejemplo en el suelo o en forma planctónica en agua dulce, y con frecuencia se les encuentra en asociación con un número cada vez mayor de huéspedes, incluidos los humanos; los animales tanto vertebrados como invertebrados; las plantas y los hongos. Las interacciones con estos huéspedes pueden ser beneficiosa o nocivas (Depoorter *et al.*, 2016; Estrada-de Los Santos *et al.*, 2018).

En los últimos años se ha demostrado que el complejo *Burkholderia* s.l. contiene cepas patógenas, fitopatógenas, simbióticas y no simbióticas, que se puede dividir en varios géneros y actualmente se divide en *Burkholderia* sensu stricto (s.s.), *Paraburkholderia* (Sawana *et al.*, 2014), *Caballeronia* (Dobritsa y Samadpour, 2016), *Robbsia* (Lopes-Santos, L *et al.*, 2017) *Mycetohabitans*, *Trinickia* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2018) y el género adicional propuesto recientemente *Pararobbsia* (Lin *et al.*, 2020).

1.2.1 Lípidos de ornitina en *Burkholderia* s. l.

Durante muchos años se pensó que todas las especies del complejo *Burkholderia* s.l. presentaban dos formas de PE y de OL (Yabuuchi *et al.*, 1992). La segunda forma de ambos lípidos de membrana contiene un ácido graso 2-hidroxilado en lugar de un ácido graso no modificado. Sin embargo, cuando se examinaron en detalle los lípidos de la membrana de algunas cepas, se observó que tenían perfil de lípidos atípicos carentes de sintetizar OLs como es el caso de *B. andropogonis* (ahora clasificada como *Robbsia andropogonis*) (Palleroni,2015). Este último sintetiza PE no modificado y PE hidroxilado (2-OH-PE), pero carece de OL y OL hidroxilado (2-OH-OL) (Taylor *et al.*, 1998).

Los roles biológicos que desempeñan los OLs en el complejo *Burkholderia* s.l. aún no están claros. Al igual que en otros grupos bacterianos, la presencia de OL hidroxilados podría ayudar en la respuesta al estrés ambiental de las bacterias. Taylor y colaboradores (1998) observaron que la cantidad de lípidos hidroxilados (2OH-PE y 2OH-OL) aumentaban en la cepa de *B. cepacia* NCTC 10661, cuando ésta se expuso a una temperatura de 42 °C, lo que podría interpretarse como una respuesta al estrés térmico. Años más tarde se describió que *B. cenocepacia* J2315WT podía formar nuevos OL hidroxilados cuando la cepa se exponía a pH 4.0, lo que podría ser una respuesta para contener el estrés ácido, posiblemente reduciendo la fluidez de la membrana y así la permeabilidad de la misma (González-Silva *et al.*, 2011).

Por otra parte, en la cepa *B. pseudomallei* K96243, González-Juarrero y colaboradores (2013) describieron que los ramnolípidos y los OLs causan una respuesta inmune induciendo las proteínas IFN- γ que se requieren para la expresión de las citosinas secretadas en las cabras. En algunas especies, la presencia de OLs o un aumento en la acumulación de estos mismos se ha relacionado con la resistencia a condiciones de estrés abiótico o como en función de mayor persistencia durante las interacciones con huéspedes eucariotas (Kim *et al.*, 2018).

1.2.2 Modelos de estudios para evaluar la interacción de hospederos eucariotas con especies del complejo *Burkholderia* s. l.

La versatilidad de las especies de *Burkholderia* s.l. ha requerido del uso de diversos modelos de infección para estudiar las interacciones entre patógeno-hospedero, con la finalidad de deducir posibles mecanismos de infección, de las respuestas inmunes, e identificar los tratamientos para el control o manejo de las enfermedades. Como modelos de estudio para evaluar las infecciones con especies del complejo *Burkholderia* s.l se han utilizado: cultivos de células de mamíferos HeLa (Angus *et al.*, 2014), ratones (Sajjan *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2002; Tomich *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2007), ratas (Bernier *et al.*, 2003; Cash *et al.*, 1979) y cabras (González-Juarrero *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de estos modelos es limitado para las investigaciones por sus altos costos, porque los experimentos son laboriosos, y el tiempo de generación de los organismos es lento y en algunos casos

éticamente menos aceptables. Estas dificultades han llevado a los investigadores a la búsqueda de modelos alternativos de infección como ejemplo: el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Köthe *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2004; Angus *et al.*, 2014; Schwager *et al.*, 2013), el pez cebra *Danio rerio* (Deng *et al.*, 2009), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Castonguay-Vanier *et al.*, 2010; Schwager *et al.*, 2013), o las larvas de polilla de la cera *Galleria mellonella* (Seed and Dennis, 2008; Schwager *et al.*, 2013), que es uno de los modelos que usé en esta tesis.

Las larvas de *G. mellonella* se han utilizado para estudiar la virulencia de varios patógenos humanos: tanto hongos (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*) como patógenos bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, y algunas especies del género *Burkholderia* (Chadwick *et al.*, 1990; Cotter *et al.*, 2000; Jander *et al.*, 2000; Hendrickson *et al.*, 2001; Miyata *et al.*, 2003; Fedhila *et al.*, 2006; Seed and Dennis 2008; Fedhila *et al.*, 2010; Ramarao *et al.*, 2012). Dentro de las ventajas de utilizar las larvas de *G. mellonella* como modelo alternativo de infección se encuentra que es económico, el ciclo de vida es corto, son de fácil manipulación (tamaño aproximado 2 cm de largo y pesan 250 mg), lo que permite la inyección de dosis definidas de bacterias; que se puede criar a diversas temperaturas (de 20 °C a 30 °C) y los estudios de infección se pueden realizar entre 15 a 37 °C permitiendo experimentos que imitan el entorno de un mamífero (Seed and Dennis 2008; Ramarao *et al.*, 2012; Schwager *et al.*, 2013; McCloskey *et al.*, 2019). Al igual que los mamíferos, los insectos poseen un sistema inmunológico innato complejo (Hoffmann 1995). Para combatir la infección microbiana se han descrito múltiples reacciones de defensa innatas (muchas las comparten con organismos superiores) que incluyen el uso de barreras físicas junto con respuestas inmunitarias locales y sistémicas (Lemaitre and Hoffmann 2007). Primero, los epitelios, presentes debajo de la cutícula, en el tracto digestivo y en la tráquea, actúan como barrera física y defensa local contra patógenos al producir péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Luego, los hemocitos especializados participan en la melanización, coagulación de la hemolinfa, fagocitosis,

nodulización y la encapsulación de intrusos extraños en la hemolinfa. (Lemaitre and Hoffmann 2007; Seed and Dennis 2008; Ramarao *et al.*, 2012).

Otros modelos alternativos de infección usados para estudiar las interacciones patógeno-hospedero han sido los vegetales como las plántulas de alfalfa (Bernier *et al.*, 2003, Merry *et al.*, 2014), la cebolla (Jacobs *et al.*, 2008; Hendry *et al.*, 2021), las hojas de lechuga (Ibrahim *et al.*, 2012) el arroz (Nandakumar *et al.*, 2008; Riera-Ruiz *et al.*, 2018); el maíz (Estrada *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005), cítricos (Duan *et al.*, 2009) entre otros. El complejo *Burkholderia* s.l alberga especies fitopatógenas como *R. andropogonis* descrita como patógeno de rayas bacterianas en plantas. Fue aislada por primera vez en sorgo por Smith (1911) y causa manchas en las hojas, o rayas en una amplia gama de huéspedes que incluye el maíz, el café, los cítricos, la jojoba y la bugambilia entre otros (Lopes-Santos *et al.*, 2017). Las plantas tienen proteínas receptoras de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés) para detectar el ataque de patógenos y generar respuestas de defensa. Estos receptores reconocen varios componentes estructurales conservados o moléculas efectoras producidas por los patógenos y están presentes en la superficie de las células vegetales. La inducción de respuestas de defensa implica una intrincada red de señalización que traduce la señal a los jugadores moleculares posteriores para desencadenar respuestas inmunes. Estas moléculas de señalización incluyen proteína quinasas dependientes de calcio (CDPK, por sus siglas en inglés), proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés), explosión de Ca^{2+} , explosión de ROS, óxido nítrico, lípidos, proteínas 14-3-3 y varias fitohormonas (como ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno) (Bigeard *et al.* 2015). Curiosamente, la inducción de respuestas de defensa no se limita simplemente al tejido infectado, sino que también se elabora en las partes no infectadas y distales de la planta. (Ghosh *et al.*, 2019).

2 HIPÓTESIS

Sí la síntesis de los lípidos de ornitina no es constitutiva en todas las especies agrupadas dentro del complejo *Burkholderia sensu lato*. Entonces, la síntesis de estos lípidos está regulada genéticamente posiblemente por limitación de fosfato y la presencia u ausencia de estos lípidos podría tener efectos sobre la interacción con su medio ambiente y hospederos eucariotas.

3 OBJETIVOS

- a. Elucidar si es constitutiva o no la síntesis de lípidos de ornitina en especies del complejo *Burkholderia sensu lato*
- b. Identificar los efectos de la presencia o la ausencia de la síntesis de lípidos de ornitina en especies del complejo *Burkholderia s.l.* frente a condiciones ambientales
- c. Evaluar la patogenicidad y respuesta en la interacción con hospederos eucariotas por la presencia o ausencia de la síntesis de lípidos de ornitina en especies del complejo *Burkholderia s.l*

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio se describen en el Anexo 1. Para el crecimiento de las cepas se utilizó el medio de cultivo complejo líquido y sólido Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001) y cuando fue necesario, se agregaron antibióticos al medio en las siguientes concentraciones: 20 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de kanamicina para el crecimiento de las cepas *R. andropogonis* (LMG2129.pRK404.pET9a y LMG2129.pRK404.pET9a.olsF) y 300 µg/ml de cloranfenicol para *B. cenocepacia* mutante NG1. Las cepas del complejo *Burkholderia* s.l. se cultivaron en medio LB sólido e incubadas a 30 °C por 3 días y los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37 °C toda la noche.

Para el crecimiento a condiciones de bajo fosfato se diseñó el medio mínimo BSE, con base en la composición del medio M9 (Miller, 1972) y el medio de citrato de sodio (Simmons, 1926). La composición es 2 g de succinato de sodio dibásico hexahidratado, 1 g de NH₄Cl, 0,2 g de MgSO₄ x 7H₂O, 0,5 g de NaCl y 0,1 M tampón K-fosfato preparado con K₂HPO₄ y KH₂PO₄.

Para las cinéticas de crecimiento, a partir de preinóculos de 5 ml en medio líquido LB de *R. andropogonis* y *B. cenocepacia* incubados con agitación de 250 rpm a 30 °C toda la noche, se tomaron alícuotas para ajustar cultivos a una densidad óptica de 620 nm (DO₆₂₀) de 0.05 en microplacas de 96 pozos (Costar REF 3370). Para la recolección de datos de densidad óptica se midió en el lector de microplacas Synergy 2.0 Biotek, midiendo cada 3 horas durante 24 horas con agitación media. Por cada tipo de estrés evaluado se realizaron 3 repeticiones independientes.

4.2 Determinación de la composición de lípidos de membrana

A partir de placas con cultivos bacteriano de las 35 cepas del complejo *Burkholderia* s.l. (descritas en el Anexo 1) se hicieron preinóculos de 5 ml en medio líquido LB e incubando a 30 °C toda la noche. En seguida, se tomaron alícuotas para ajustar cultivos a una DO₆₂₀ de 0.1 en un volumen final de 15 ml. De cada cultivo crecido a una DO₆₂₀ de 0.3 se transfirió 1 ml a tubos de polietileno, se agregó 1 µCi de [1-¹⁴C]acetato (45 -60 mCi mmol⁻¹ Perkin Elmer) y los cultivos se incubaron toda la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Las células se recolectaron por centrifugación a 6000 rpm y se lavaron una vez con 500 µl de agua, y finalmente se resuspendieron en 100 µl de agua ultrapura Milli Q. Los lípidos se extrajeron por la metodología de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Las alícuotas de los extractos de lípidos se visualizaron en placas de cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC sílica gel 60, Merck, Poole, UK) y separadas en dos dimensiones usando cloroformo / metanol / agua (16:4:1, v/v/v) como fase móvil para la primera dimensión y cloroformo / metanol / ácido acético (15:3:2, v/v/v) como fase móvil para la segunda dimensión (Tahara and Fujiyoshi, 1994). Para visualizar los lípidos de la membrana, las placas de TLC bidimensionales se expusieron a una pantalla PhosphorImager (Amersham Biosciences). Los lípidos individuales se cuantificaron utilizando el software ImageQuant (Amersham Biosciences).

4.3 Construcción del árbol filogenético

En este análisis se utilizaron los genomas de 43 especies del género *Burkholderia* que se descargaron de la base de datos NCBI RefSeq (Tabla 1). Para obtener las familias de genes ortólogos de estos genomas se utilizó el programa GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013). Subsecuentemente, con ayuda del programa GET_PHYLOMARKERS (Vinuesa *et al.*, 2018), las familias de ortólogos se analizaron para obtener los marcadores óptimos de reconstrucción filogenética. Finalmente, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el alineamiento concatenado de familias de genes ortólogos usando el modelo evolutivo GTR + G con el programa PHYML (Guindon *et al.*, 2010).

Tabla 1. Genomas de especies del complejo *Burkholderia* s.l. descargados de la base de datos NCBI RefSeq.

RefSeq	Especie	Cepa
GCF_000009485.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	J2315
GCF_000010545.1	<i>Burkholderia multivorans</i>	ATCC 17616
GCF_000011545.1	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	K96243
GCF_000011705.1	<i>Burkholderia mallei</i>	ATCC 23344
GCF_000012945.1	<i>Burkholderia lata</i>	383
GCF_001524085.1	<i>Burkholderia seminalis</i>	FL-5-5-10-S1-D0
GCF_001411495.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416
GCF_001685505.1	<i>Burkholderia stabilis</i>	LA20W
GCF_000022645.2	<i>Burkholderia glumae</i>	BGR1
GCF_000152585.1	<i>Burkholderia dolosa</i>	AU0158
GCF_000203915.1	<i>Burkholderia ambifaria</i>	AMMD
GCF_000835205.1	<i>Burkholderia plantarii</i>	PG1
GCF_000959245.1	<i>Burkholderia ubonensis</i>	MSMB22
GCF_000959445.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	LMG 10929
GCF_000959725.1	<i>Burkholderia gladioli</i>	ATCC 10248
GCF_000013645.1	<i>Paraburkholderia xenovorans</i>	LB400
GCF_000020045.1	<i>Paraburkholderia phymatum</i>	STM815
GCF_000020125.1	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	PsJN
GCF_000172415.1	<i>Paraburkholderia graminis</i>	C4D1M
GCF_000519185.1	<i>Paraburkholderia nodosa</i>	DSM 21604
GCF_000685035.1	<i>Paraburkholderia ferrariae</i>	NBRC 106233
GCF_000685055.1	<i>Paraburkholderia fungorum</i>	NBRC 102489
GCF_000739735.1	<i>Paraburkholderia ginsengisoli</i>	NBRC 100965
GCF_000739795.1	<i>Paraburkholderia kururiensis</i> subsp. <i>Thiooxydans</i>	NBRC 107107
GCF_000785435.1	<i>Paraburkholderia sacchari</i>	LMG 19450
GCF_001449005.1	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	MWAP64
GCF_003096875.1	<i>Paraburkholderia unamae</i>	SCZa-39
GCF_002071575.1	<i>Paraburkholderia tropica</i>	Ppe8
GCF_003330745.1	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	PHRS4
GCF_900101795.1	<i>Paraburkholderia tuberum</i>	DUS833
GCF_900107685.1	<i>Paraburkholderia sartisoli</i>	LMG 24000
GCF_900113825.1	<i>Paraburkholderia megapolitana</i>	LMG 23650
GCF_900177465.1	<i>Trinickia caryophylli</i>	Ballard 720
GCF_000970345.1	<i>Robbsia andropogonis</i>	ICMP2807

Tabla 1 continuación. Genomas de especies del complejo *Burkholderia* s.l. descargados de la base de datos NCBI RefSeq.

RefSeq	Especie	Cepa
GCF_001278535.1	<i>Caballeronia cordobensis</i>	LMG 27620
GCF_000648925.1	<i>Caballeronia jiangsuensis</i>	MP-1
GCF_000698555.1	<i>Caballeronia grimmiae</i>	R27
GCF_000698575.1	<i>Caballeronia zhejiangensis</i>	OP- 1
GCF_000698595.1	<i>Caballeronia glathei</i>	DSM 50014
GCF_001544455.2	<i>Caballeronia sordidicola</i>	LMG 22029
GCF_001544475.1	<i>Caballeronia humi</i>	LMG 22934
GCF_001544535.1	<i>Caballeronia choica</i>	LMG 22940
GCF_001544555.2	<i>Caballeronia udeis</i>	LMG 27134

4.4 Identificación de putativas cajas Pho

Se utilizó el programa INFO-GIBBS (Defrance y Van, 2009) para la construcción de una matriz de puntuación de posiciones específicas (PSSM por sus siglas en inglés), usando secuencias de cajas Pho de *Agrobacterium tumefaciens*, de *Sinorhizobium meliloti* y de *Mesorhizobium loti* identificadas en las secuencias promotoras de genes implicados en la biosíntesis de glicolípidos y lípidos de membrana (Tabla 2) (Yuan *et al.*, 2006; Geske *et al.*, 2013). Los parámetros usados fueron: la longitud de la matriz fijada en 18 pb, el número esperado de sitios por secuencia (1) y el número de motivos a extraer (1). Como modelo de fondo se utilizaron las secuencias río arriba de los genes del taxón *Burkholderiaceae* y el modelo de Markov de primer orden. Luego, se utilizó el programa MATRIX-SCAN (Turatsinze *et al.*, 2008) para buscar cajas Pho putativas en las regiones río arriba de los genes que codifican homólogos de OlsB encontrados en los 43 genomas y que están descritos en la tabla 1. Esta búsqueda se realizó para ambas cadenas del DNA,

Tabla 2. Secuencias de motivos de caja Pho de las regiones promotoras de los genes implicados en la biosíntesis de glicolípidos y lípidos de la membrana en *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* y *Agrobacterium tumefaciens*

Genes	motivos de caja Pho	Especie	Referencia
SMc01848 (BtaA)	TCGTCATCAAAGTGTAGC	<i>S. meliloti</i>	(Yuan <i>et al.</i> , 2006)
mlr1574 (BtaA-like)	CTGTCACCGGCCTGTCAT	<i>M. loti</i>	(Yuan <i>et al.</i> , 2006)
Atu1808 (Pgt)	ATGACATGTAAGTGTAC	<i>A. tumefaciens</i>	(Geske <i>et al.</i> , 2013)
Atu0318 (OlsE)	CAGTCTTCAACCGGTCGC	<i>A. tumefaciens</i>	(Geske <i>et al.</i> , 2013)
Atu2119 (BtaA)	CTGTCATCAAAGTGTAGC	<i>A. tumefaciens</i>	(Geske <i>et al.</i> , 2013)

4.5 Limitación de fosfato

La cepa tipo LB400 de *P. xenovorans*, se creció en medio mínimo BSE usando concentraciones de fosfato de 0, 0.02, 0.2, 2 y 20 mM a pH6.8 e incubando a 30 °C con agitación a 250 rpm durante 100 horas. Las células se recolectaron por centrifugación a 6000 rpm y se extrajeron los lípidos de acuerdo con la metodología de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Las alícuotas de los extractos de lípidos fueron separados en placas de HPTLC (sílica gel 60, Merck, Poole, UK) en una dimensión usando cloroformo / metanol / agua (13:5:0,8, v/v/v) como fase móvil. La visualización de los lípidos de la membrana en las placas de TLC se hizo por tinción con ninhidrina al 0.2% para identificar lípidos con un grupo amino primario.

4.6 Expresión de *olsF* en *Robbsia andropogonis*

El vector de expresión pET9a y el plásmido pET9a.OlsF que contiene el gen *olsF* de *Serratia proteomaculans* (Vences-Guzmán *et al.*, 2015) se subclonaron en el vector de amplio rango de hospederos pRK404, para obtener los plásmidos pRK404.pET9a (Vector vacío) y el plásmido pRK404.pET9aOlsF (que contenía el gen *olsF* de *S. proteamaculans*) con ellos se transformó la cepa S17 de *E. coli* y se movilizaron por conjugación biparental a la cepa receptora *R. andropogonis* LMG2129.

A partir de precultivos con una DO_{620} de 0.5 las células donadoras y receptoras se recolectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con medio LB para eliminar los antibióticos residuales. Posteriormente, las suspensiones celulares se mezclaron, y sembraron en placas de LB agar sin antibióticos e incubaron toda la noche a 30 °C. Las células se rasparon de las placas, se suspendieron y se sembraron alícuotas seriadas en medio citrato de sodio con agar (Simmons, 1926) suplementado con tetraciclina y kanamicina. La incubación continuó durante 2-5 días para seleccionar la presencia del plásmido en los transconjugantes. Las colonias transconjugantes se transfirieron a placas con medio LB suplementado con tetraciclina y kanamicina y se cultivaron a 30 °C durante tres días. Las cepas se conservaron en glicerol a una concentración final del 30% (p/v) y se almacenaron a -80 °C.

4.7 Análisis de muestras de lípidos por cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Las tres cepas de *R. andropogonis* (LMG2129-cepa tipo, LMG2129.pRK404.pET9a-control vector vacío y LMG2129.pRK404.pET9a.olsF expresando la aciltransferasa OlsF) se crecieron hasta una DO_{620} de 1.2 en medio LB o medio LB con tetraciclina en el caso de las cepas que albergan plásmidos. Las células se recolectaron por centrifugación y los lípidos se extrajeron de acuerdo con la metodología de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). La cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC- MS/MS por sus silgas en inglés) de fase normal de los extractos de lípidos se realizó utilizando un sistema LC cuaternario Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TripleTOF5600 de alta resolución (Sciex, Framingham, MA). La separación cromatográfica se realizó en una columna de HPLC Ascentis Silica, 5 μ m, 25 cm x 2,1 mm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Los lípidos se eluyeron con la fase móvil A, que consta de cloroformo / metanol / hidróxido de amonio acuoso (800:195:5, v/v/v), fase móvil B, que consta de cloroformo / metanol / agua / hidróxido de amonio acuoso (600:340:50:5, v/v/v/v) y fase móvil C, que consta de cloroformo / metanol / agua / hidróxido de amonio acuoso (450:450:95:5, v/v/v/v). A lo largo de una serie de 40 minutos de duración, se realizó la cromatografía con el siguiente programa: la fase móvil A se mantuvo isocráticamente durante 2 min y luego se incrementó

linealmente hasta la fase móvil B durante 14 min y se mantuvo durante 11 min. La composición de la fase móvil se cambió luego a la fase móvil C durante 3 min y se durante 3 min, y finalmente se volvió a la fase A durante 0,5 min y se mantuvo durante 5 min. El eluyente LC (con un caudal total de 300 μl / min) se introdujo en la fuente ESI del espectrómetro de masas TF5600 de alta resolución. MS y MS/MS se realizaron en modo de iones negativos, con los espectros de barrido completo recogidos en el rango m/z 200-2000. Los ajustes de MS son los siguientes: ion spray voltaje (IS) = $-4,500$ V (negativo ion modo), curtain gas (CUR) = 20 psi, ion source gas 1 (GS1) = 20 psi, de-clustering potential (DP) = -55 V, y focusing potential (FP) = -150 V. Se utilizó nitrógeno como gas de colisión para experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El análisis de datos se realizó utilizando el software Analyst TF1.5 (Sciex, Framingham, MA).

4.8 Condiciones de crecimiento frente a estreses abióticos

A partir de precultivos de *R. andropogonis* y *B. cenocepacia* incubados a 30 °C con agitación 250 rpm durante toda la noche, se recolectaron las células por centrifugación a 6000 rpm y se lavaron con una solución de NaCl al 1% (p/v), excepto para las pruebas de salinidad para las cuales las células se lavaron en medio LB sin sal. Para los experimentos de estrés por temperatura, se evaluaron a 30 °C, 37 °C y 42 °C. Para los experimentos de estrés por acidez, el medio LB fue ajustado a pH 4 con buffer 50 mM Homopipes (Homopiperazine-*N*, *N'*-bis-2-(ácido etanosulfónico)) y para pH 7 con buffer 50 mM Pipes (ácido piperazina-*N*, *N'*-bis (2-etanosulfónico)). Para los experimentos de estrés por salinidad el medio LB fue suplementado con concentraciones de sal de NaCl a 0,05, 0,5 y 1 M. La recolección de datos de DO_{620} se realizó en el lector de microplacas Synergy 2.0 Biotek, midiendo cada 3 horas durante 24 horas, realizando 3 repeticiones independientes por cada estrés evaluado.

4.9 Ensayos de sensibilidad a antibióticos y detergentes.

A partir de placas con cultivos bacterianos de las cepas de *B. cenocepacia* y *R. andropogonis* se hicieron cultivos de 10 ml en medio líquido LB con tetraciclina y kanamicina para las cepas de *R. andropogonis* que contenían plásmido y en cloranfenicol

para la mutante NG1 de *B. cenocepacia* e incubando a 30 °C con agitación a 250 rpm hasta una DO₆₂₀ de 0.3 de crecimiento. De cada cultivo se distribuyó uniformemente 50 µl sobre la superficie de cajas Petri con medio LB sin antibióticos, y sobre ellos se colocaron discos de antibióticos (marca Oxoid) (tabla 3). Los cultivos se incubaron a 30 °C por 4 días y se comparó la sensibilidad mediante la medición del diámetro de las zonas transparentes (halos de inhibición) alrededor de los discos, realizando 3 repeticiones independientes de este ensayo

La permeabilidad de la membrana en este estudio se usó las condiciones descritas en las que se estudió la producción de hopanoides en *B. cenocepacia* K12 (Schmerk *et al.*, 2011) La permeabilidad de la membrana se determinó para ver los efectos de presencia o ausencia de la síntesis de OLs en las cepas de *R. andropogonis* y *Burkholderia cenocepacia*. A partir de precultivos cultivados a 30 °C a 250 rpm durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos respectivos, se recolectaron las células por centrifugación a 6000 rpm y se lavaron con una solución de NaCl al 1% (p/v) Posteriormente, los cultivos se inocularon a una DO₆₂₀ de 0,05 en medio LB suplementado con 1 mg/ml de polimixina B, o 50 g/ml de eritromicina, o con SDS al 0,01, 0.02 o 0.03 % (p/v), en microplacas de 96 pozos a 30 °C con agitación media. El crecimiento de las bacterias en forma de DO se midió en el Synergy 2.0 Biotek, midiendo cada 3 horas durante 24 horas, realizando 3 repeticiones independientes por cada ensayo.

Tabla 3. Discos de antibióticos (marca Oxoid) usados en los ensayos de sensibilidad

Código	Nombre	Unidades/ μg	Blanco
TE30	tetraciclina	30	subunidad del ribosoma 30S
C30	cloranfenicol	30	subunidad del ribosoma 50S
VA30	vancomicina	30	pared celular
PB300	polimixina B	300	membranas celulares
B10	bacitracina	10	membranas celulares
E15	eritromicina	15	subunidad del ribosoma 50S
F300	nitrofurantoína	300	DNA y metabolismo energético
TOB10	tobramicina	10	subunidad del ribosoma 30S
W5	trimetoprima	5	metabolismo del ácido fólico
N30	neomicina	30	subunidad del ribosoma 30S
CN10	gentamicina	10	subunidad del ribosoma 30S
S10	estreptomicina	10	subunidad del ribosoma 30S
AMP10	ampicilina	10	pared celular
FOX30	cefoxitina	30	pared celular
DA2	clindamicina	2	subunidad del ribosoma 50S
K30	kanamicina	30	subunidad del ribosoma 30S
PRL1000	piperacilina	1000	pared celular
NA30	ácido nalidíxico	30	DNA girasa

4.10 Ensayo de virulencia de *Burkholderia cenocepacia* usando larvas de *Galleria mellonella*

La virulencia de las cepas de *B. cenocepacia* se evaluó en larvas de *G. mellonella*. A partir de cultivos bacterianos crecidos hasta una DO_{620} de 1, se realizaron diluciones en serie de 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 y 2×10^4 UFC/ml en solución de MgSO_4 a 10 mM. Como controles negativos se usaron: una simple punción de las larvas, la inyección de solución de MgSO_4 a 10 mM o la inyección a 3×10^6 UFC/ml con la cepa *E. coli* DH5 α que es una bacteria inocua en *G. mellonella* (Alghoribi *et al.*, 2014; Jonsson *et al.*, 2017). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando el método de inyección en larvas de *G. mellonella* en sexto estadio con 10 μl de suspensiones bacterianas en la región dorsal del tercer segmento abdominal anterior de las larvas usando una jeringa de insulina de 31G (calibre). Cada suspensión bacteriana se probó utilizando diez larvas de insectos colocadas individualmente en placas de Petri de 55 mm sin dieta e incubadas a 30 °C.

La mortalidad se evaluó cada 24 h durante 5 días después de la inyección, realizando cinco experimentos independientes. Para las pruebas estadísticas, los datos experimentales ($n = 50$) se trazaron utilizando el método de Kaplan-Meier y las diferencias en la supervivencia se calcularon utilizando la prueba de rango logarítmico con un valor de $p \leq 0,05$ que indica la significancia estadística. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism, versión 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.11 Prueba de virulencia sobre plantas de maíz con las cepas de *Robbsia andropogonis*

Los ensayos con las cepas de *R. andropogonis* se realizaron en plantas de maíz utilizando una variedad de maíz nativo (“criollo de Hidalgo”). La esterilización y germinación de semillas se realizaron como se describió anteriormente en (Matus-Acuña *et al.*, 2018), y las semillas esterilizadas se incubaron durante 48 horas a 30 °C en la oscuridad. Posteriormente, las plántulas germinadas se trasplantaron a macetas que contenían vermiculita estéril y se cultivaron en condiciones de invernadero regando cada 3 o 4 días con agua o solución de Fahraeus (Fahraeus, 1957) durante cuarenta días antes de la infección con las cepas bacterianas. Se infiltraron hojas de maíz en el envés de las hojas con una jeringa sin aguja de 1 ml que contenía un 1×10^5 UFC/ml suspensión bacteriana (correspondiente a una DO_{620} de 0.02) de las cepas tipo LMG2129 o de las transconjugantes (LMG2129.pRK404.pET9a, LMG2129.pRK404.pET9a.olsF). Como control simulado se usó una solución de 10 mM de $MgCl_2$ y se infiltraron aproximadamente 10 μ l en la hoja en cada sitio. Se utilizaron cuarenta plantas de maíz sanas de 40 días y por cada tratamiento se inocularon diez plantas y se siguió el desarrollo de los síntomas durante 15 días.

Las bacterias se aislaron a los 0, 3, 7 y 15 días después de la infección, utilizando una metodología descrita previamente (Katagiri *et al.*, 2002). Brevemente, las hojas de maíz se cortaron con sacabocados sobre las lesiones y los cortes de las hojas se maceraron con pistilo, se lavaron dos veces con $MgCl_2$ a 10mM. La suspensión se diluyó en serie, se sembró en medio LB e incubó a 30 °C durante 72 horas. Posteriormente, se contaron las colonias y se determinaron las unidades formadoras de colonias. Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba t de una cola con un valor de $p \leq 0,05$ que indica significancia estadística. Los análisis

estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism, versión 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.12 Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas de maíz

Las ROS se detectaron utilizando la sonda fluorescente diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com) como se describió anteriormente (L'Haridon *et al.*, 2011). Las hojas se enjuagaron rápidamente en medio DCFH-DA y se observaron bajo luz ultravioleta con un microscopio de fluorescencia LEICA DMR (Leica, www.leica.com). Las imágenes de microscopio se guardaron como archivos TIFF y se procesaron para la cuantificación de los píxeles con Image J versión 1.51 (NIH). Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba t de una cola con un valor de $p \leq 0,05$ que indica significancia estadística. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism, versión 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 *Burkholderia* sensu lato y sus composiciones lipídicas de membrana: solo las cepas sensu stricto forman OLs constitutivamente y existe una correlación entre la composición lipídica y su filogenia

Del análisis de la composición lipídica de la membrana de las 35 cepas del complejo *Burkholderia* s.l. marcadas con acetato [^{14}C] se muestran seis cepas representativas (Figura 2). En todas las cepas se detectaron los lípidos fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE) y PE 2-hidroxilado (2OH-PE). OLs sin modificar y / o modificados solo se detectaron en las cepas del género *Burkholderia* s.s. (Figura 2 A y B). En los géneros recientemente propuestos de *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Trinickia* y *Mycetohabitans* no se detectó la síntesis de OLs sin modificar y / o modificados (Figura 2 C, D, E y F).

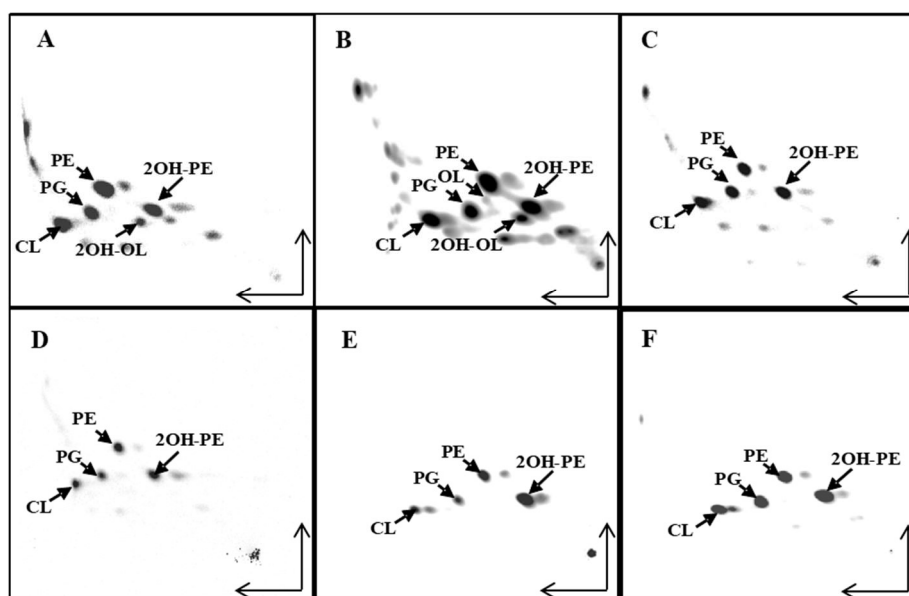


Figure 2. La síntesis de OLs es constitutiva tan solo en cepas pertenecientes al género *Burkholderia* sensu stricto (s.s), pero está ausente en las otras cepas analizadas.

Separación de lípidos marcados con acetato [^{14}C] mediante cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional de diferentes cepas de *Burkholderia* sensu lato (s.l) crecidas en medio LB a 30 °C. (A) *Burkholderia cenocepacia* J2315, (B) *B. dolosa*, (C) *Paraburkholderia sortisoli*, (D) *P. xenovorans*, (E) *Caballeronia glathei*, y (F) *Robbsia andropogonis*. CL: cardiolipina; PG: fosfatidilglicerol; PE: fosfatidiletanolamina; 2-OH-PE: fosfatidiletanolamina 2-hidroxilado C2 del ácido graso esterificado; OL: lípido de ornitina no modificado; 2-OH-OL: lípido de ornitina 2-hidroxilado dentro del C2 del ácido graso esterificado. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3)

Los resultados de la composición de lípidos de la membrana de las especies se correlacionan con sus posiciones filogenéticas dentro del complejo *Burkholderia* (s.l.). Al hacer una reconstrucción filogenómica del complejo *Burkholderia* s.l. con el análisis de 43 genomas de especies del complejo. Se identificó con el software GET_HOMOLOGUES 780 familias de genes ortólogos y utilizando el software Get Phylomarkers 411 familias de estos ortólogos se utilizaron para la reconstrucción filogenómica del complejo *Burkholderia* s.l.

La filogenia obtenida de las 43 especies de genomas analizados de *Burkholderia* s.l. muestra la separación de cinco linajes diferentes (Figura 3): *Burkholderia* s.s., *Trinickia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia* y *Robbsia*. Las especies incluidas en el clado *Burkholderia* s.s. (indicado en rosa, Figura 3), son las especies que observamos en el análisis de la composición lipídica que sintetizaban OLs de forma constitutiva (Figura 2A y B), las especies de este género se han relacionado en su mayoría como especies patógenas de humanos, plantas o animales (Depoorter *et al.*, 2016). El clado que agrupa los géneros *Trinickia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia* y *Robbsia* (marcado en violeta, Figura 3) incluyó a las especies que no sintetizaron OLs cuando se cultivaron en medio complejo (Figura 2C, D y F), varias de estas bacterias se han relacionado como bacterias beneficiosas para las plantas y el ambiente, algunas se han involucrado en una simbiosis fijadora de N₂ con plantas leguminosas (Estrada-de Los Santos *et al.*, 2018) y algunos géneros como *Robbsia* y *Trinickia* se han relacionado con patogenicidad en plantas, pero no se han detectado en muestras clínicas.



Figura 3. Árbol filogenético basado en un análisis de genomas de *Burkholderiales*. El primer clado (indicado con color rosa) agrupa especies del género *Burkholderia* sensu stricto (s.s.) que sintetizan OL no modificados y modificados cuando se cultivan en medio LB complejo. El segundo clado (marcado en color púrpura) agrupa especies de los géneros *Trinickia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, y *Robbsia*, que no sintetizan OL cuando se cultivan en medio complejo LB. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3)

5.2 Los 43 genomas de *Burkholderia* sensu lato analizados poseen genes homólogos codificando para la *N*-aciltransferasa OlsB (Bcal1281)

Una búsqueda en la base de datos NCBI por blastp de proteínas homólogas a la *N*-aciltransferasa OlsB responsable del primer paso en la síntesis de OLs. en *B. cenocepacia* (González-Silva et al., 2011) en los 43 genomas usados para la filogenia, mostró que poseen proteínas homólogas a la *N*-aciltransferasa OlsB con un porcentaje de identidad mayor al 62%, y un porcentaje de cobertura mayor al 85% (Anexo 2). El contexto genómico usando el programa Gene Context Tool NG (Martinez-Guerrero *et al.*, 2008), indicó que alrededor del gen *olsB* (Bcal1281) que codifica para la *N*-aciltransferasa OlsB se conserva en casi todas las especies de *Burkholderia* s.l. (figura 4). La presencia de un gen codificando a un homólogo de OlsB en los nuevos géneros propuestos se considera un buen indicador de la capacidad para formar OL (Geiger *et al.*, 2010).

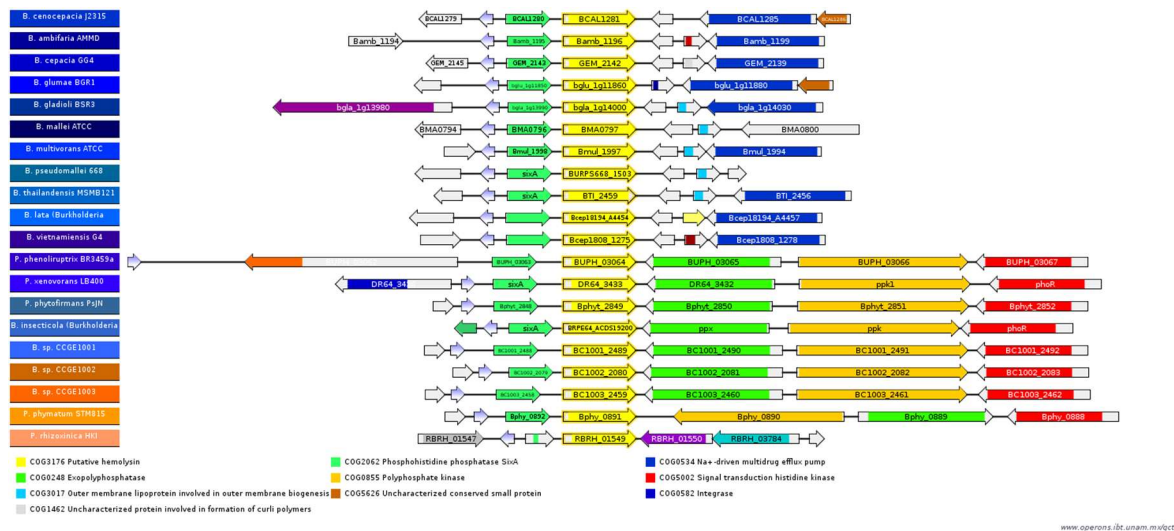


Figura 4. El contexto genómico de genes de *olsB* está conservado en *Burkholderia* s.l.

Los genomas seleccionados presentan un gen codificando para la *N*-aciltransferasa OlsB. Flechas amarillas corresponden a genes homólogos a *olsB* y flechas verdes río arriba de este gen codifican para la fosfohistidina fosfatasa SixA en *Burkholderiales*. Especies incluidas en la comparación: *B. cenocepacia*, *B. ambifaria*, *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. glumae*, *B. mallei*, *B. multivorans*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. lata*, *P. phenoliruptrix*, *P. xenovorans*, *P. phytofirmans*, *P. insecticola*, *Paraburkholderia* sp (CCGE1001, CCGE1002 y CCGE1003), *P. phymatum* y *M. rhizoxinica*. Análisis de contexto genómico realizado por Gene Context Tool NG (<http://biocomputo.ibt.unam.mx:8080/GeConT/index.jsp>) y los genes están coloreados de acuerdo a su clusters de grupos ortólogos (COG por sus siglas en inglés).

5.3 La síntesis de OLs en los géneros recientemente propuestos probablemente esté regulado por el sistema de dos componentes PhoRB

Entre las bacterias capaces de formar OLs existen especies que los forman de manera constitutiva mientras que otras los forman exclusivamente en condiciones específicas de crecimiento, donde la más conocida es la limitación de fósforo. La ausencia de OLs aunada a la presencia de una copia del gen codificando la *N*-aciltransferasa OlsB en los genomas de los géneros recientemente propuestos (Anexo 2), indica que la síntesis de OLs requiere de condiciones específicas de crecimiento. En *S. meliloti* y *A. tumefaciens* se ha reportado que la expresión de estos genes está regulada por el sistema de dos componentes PhoRB. El regulador de respuesta (factor de transcripción) PhoB reconoce un sitio de unión o motivo nucleotídico altamente conservado llamado caja Pho que antecede la región promotora de los genes regulados (Geske *et al.*, 2013). Usando las secuencias de cajas Pho identificadas en *Agrobacterium tumefaciens*, *S. meliloti*, y *Mesorhizobium loti* (Yuan *et al.*, 2006; Geske *et al.*, 2013) presentes en las secuencias promotoras de los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de glicolípidos y OLs formados en condiciones de limitación de fósforo (Tabla 2), se obtuvo una secuencia consenso o matriz de puntuación de posiciones específicas (PSSM por sus siglas en inglés) obtenida mediante el programa INFO-GIBBS (Figura 5A).

Con esta PSSM (Figura 5A) se buscó en los genomas de las 43 especies de *Burkholderia* s.l. la presencia de cajas Pho río arriba de los genes que codifican homólogos de OlsB (Anexo 3). Se detectaron cajas Pho putativas en 21 de los genomas analizados, que correspondían a catorce especies del género *Paraburkholderia*, dos especies del género *Caballeronia* (ambos géneros no sintetizan constitutivamente OL) y cinco especies correspondientes al género *Burkholderia* s.s. que sintetizan constitutivamente OL (Tabla 4).

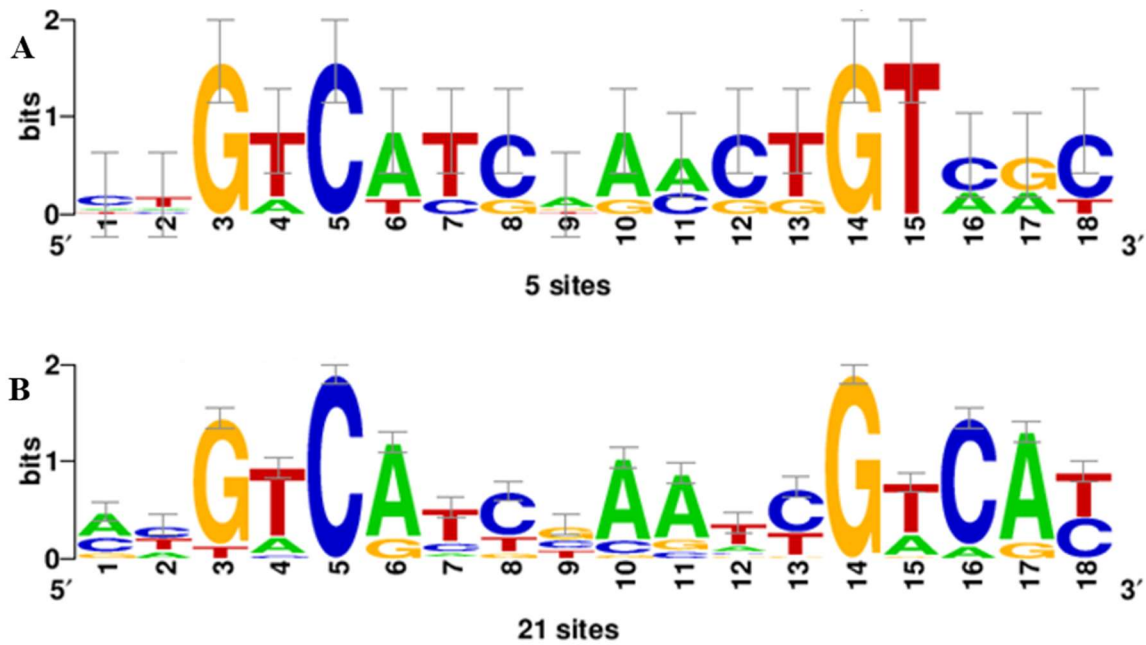


Figura 5. Matrices de puntuación de posiciones específicas (PSSM) obtenidas de las cajas Pho mediante el programa INFO-GIBBS.

(A) PSSM derivado de las secuencias de cajas Pho de *A. tumefaciens*, *S. meliloti* y *M. loti* presentes en las secuencias promotoras de los genes implicados en la biosíntesis de lípidos de glicolípidos y OLs (Tabla 2). (B) PSSM obtenido de posibles cajas Pho de *Burkholderiales* (Tabla 4) que sintetizan constitutivamente o no OLs. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3)

Debido a la distancia evolutiva entre las α -proteobacterias y las β -proteobacterias, es posible que no se logran detectar las cajas de Pho en algunos genomas. Alternativamente, la formación de OL podría estar regulada de manera diferente en estas especies. Usando las posibles cajas Pho obtenidas de *Burkholderiales* (tabla 4), se obtuvo una nueva matriz (Figura 5B). Al buscar con la nueva matriz, se detectaron cajas Pho putativas en las regiones río arriba de los genes que codifican homólogos de OlsB de los 43 genomas analizados.

Tabla 4. Cajas Pho putativas identificadas en la región promotora río arriba de genes que codifican homólogos de OlsB en especies de *Burkholderia* s.l.

Especies	Inicio	Fin	Secuencia	Tamaño	P val ▼
<i>P. xenovorans</i>	-99	-82	CAGTCATCCAATCGTCAT	7.5	5.2e-05
<i>P. phytotfirmans</i>	-100	-83	CAGTCATCCAATCGTCAT	7.5	5.2e-05
<i>P. fungorum</i>	-99	-82	CCGTCACCTAATCGTCAT	7.5	5.2e-05
<i>P. caledonia</i>	-99	-82	CAGTCATCCAATCGTCAT	7.5	5.2e-05
<i>B. multivorans</i>	-99	-82	ACGTCATTGAACGGACAC	7.5	5.2e-05
<i>P. kururiensis</i>	-77	-60	TTGCCATGGAAGCGTCAC	7.9	3.7e-05
<i>P. sartisoli</i>	-52	-35	ACGTCATCGAATCGTCAT	8.2	2.8e-05
<i>P. nodosa</i>	-95	-78	ACGTCATCGAATCGTCAT	8.2	2.8e-05
<i>P. tuberum</i>	-100	-83	CAGTCATCCAATCGTCAC	8.4	2.4e-05
<i>P. graminis</i>	-175	-158	CAGTCATCCAATCGTCAC	8.4	2.4e-05
<i>B. plantarii</i>	-99	-82	ATGTCACCGAATTGACAC	8.6	2.0e-05
<i>B. glumae</i>	-99	-82	ATGTCACCGAATTGACAC	8.6	2.0e-05
<i>C. humi</i>	-94	-77	ATTCATCGAAGCGTCAC	8.9	1.5e-05
<i>C. cordobensis</i>	-112	-95	CCGTCATGCGCGTGTCGT	8.9	1.5e-05
<i>P. unamae</i>	-75	-58	TTGCCATGTAACCGTAAC	9.0	1.4e-05
<i>P. ferrariae</i>	-75	-58	ATGCCATGTAACCGTAAC	9.0	1.4e-05
<i>P. phymatum</i>	-99	-82	ACGTCATCGAATCGTCAC	9.1	1.2e-05
<i>P. kururiensis</i>	-99	-82	ACGTCATCGAATCGTCAC	9.1	1.2e-05
<i>P. caribensis</i>	-98	-81	ACGTCATCGAATCGTCAC	9.1	1.2e-05
<i>B. ubonensis</i>	-94	-77	TTGCCACGTAACGGTCAC	9.2	1.1e-05
<i>B. gladioli</i>	-99	-82	ATGTCACCAAACCTGACAC	12.4	3.7e-07

Inicio/ final: Corresponden al sitio de unión del factor de transcripción. La posición es en relación con el primer nucleótido siendo "-1" en las secuencias de entrada.

Tamaño: Corresponde al número de bases que coinciden con la matriz

P-value: Indican los valores que estiman la importancia del peso asociado a cada sitio y se calcula a partir de la matriz, según las probabilidades descritas en Staden (1989), Bailey and Gribskov (1998)

5.4 La síntesis de OLs está probablemente regulada por limitación de fosfato en los géneros recientemente propuestos.

Entre las especies identificadas con una caja Pho predicha se encontró *P. xenovorans* que no forma OLs cuando se crece en medio LB (Figura 2D). Al comparar el perfil de lípidos de la cepa LB400 cultivada sin limitación en medio LB, con los perfiles de la cepa cultivada en limitación de fosfato en medio mínimo BSE con concentraciones entre 0 y 20 mM: Mostró en la TLC unidimensional teñido con ninhidrina, que a partir de 0.02mM de fosfato la cepa es capaz de reemplazar paulatinamente los fosfolípidos PE y 2OH-PE por OL modificados y no modificados (figura 6). En las concentraciones de 0.2, 2 y 20mM no hubo diferencias en el perfil de lípidos comparado con el perfil de la cepa crecida sin limitación en medio LB.

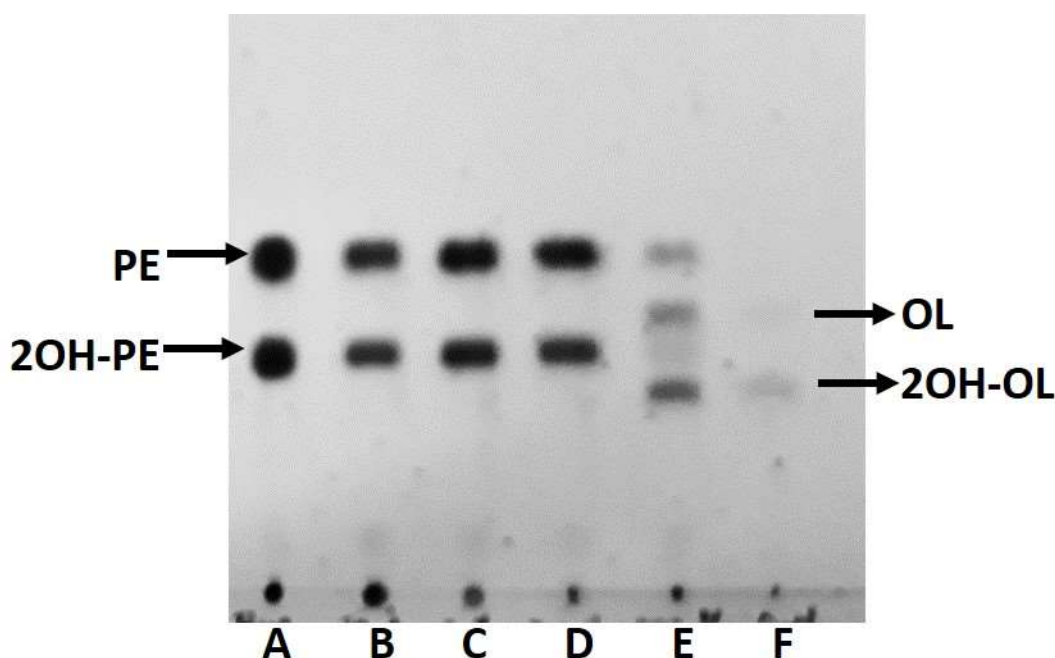


Figura 6. La síntesis de OLs está probablemente regulada por limitación de fosfato en los géneros recientemente propuestos.

Separación de lípidos teñidos con ninhidrina mediante cromatografía en capa fina (TLC) de la cepa *Paraburkholderia xenovorans* LB400 crecida en medio mínimo con diferentes concentraciones de fosfato a 30 °C. (A) medio LB, (B) 20mM de fosfato, (C) 2mM de fosfato, (D) 0.2mM de fosfato, (E) 0.02mM de fosfato, y (F) 0mM de fosfato. PE: fosfatidiletanolamina; 2OH-PE: fosfatidiletanolamina hidroxilada; OL: lípido de ornitina no modificado; 2OH-OL: lípido de ornitina 2-hidroxilado dentro de ácido graso esterificado.

5.5 La expresión del gen *olsF* causa la formación constitutiva de OLs en *Robbsia andropogonis*

La síntesis de OLs es constitutiva en el género *Burkholderia* s.s., y probablemente inducible en los otros géneros que forman parte del complejo *Burkholderia* s.l. Algunas facetas sobre la función de los OL quedaban por elucidar: primero, como afecta la presencia o la ausencia de OLs la resistencia al estrés abiótico de las bacterias. Segundo, como se modifica la permeabilidad de las membranas frente a péptidos antimicrobianos, Tercero, como los OLs pueden modificar la forma en que las bacterias interactúan o cómo son percibidas por sus huéspedes eucariotas.

Por lo tanto, se estudió dos pares de cepas que forman o no OLs, en condiciones de estrés abiótico y durante las interacciones con sus huéspedes eucariotas: 1) *B. cenocepacia* J2315 (Vandamme *et al.*, 2003), que forma constitutivamente OLs y su correspondiente mutante deficiente en la formación de OLs NG1 (González-Silva *et al.*, 2011) y 2) *R. andropogonis* (anteriormente *B. andropogonis*) que no forma constitutivamente OL y una cepa derivada de *R. andropogonis* que forme constitutivamente OLs debido a la presencia de un plásmido que alberga el gen *olsF* de *S. proteamaculans* (Vences-Guzmán *et al.*, 2015).

R. andropogonis presenta ambas formas de PE, pero no se puede detectar OL cuando se cultiva en medio complejo (Figura 1F). Para crear una cepa de *R. andropogonis* que forme constitutivamente OL, la aciltransferasa bifuncional OlsF de *S. proteamaculans* (Vences-Guzmán *et al.*, 2015) se expresó en la cepa tipo de *R. andropogonis* LMG2129 (Gillis *et al.*, 1995). Al analizar la composición de lípidos de la cepa que expresa OlsF usando LC-MS, observamos la formación de dos nuevos lípidos que estaban ausentes en la cepa control con vector vacío (Figura 7A, 7B). Hay que mencionar que el perfil de lípidos de la cepa control con vector vacío es similar al de la cepa de tipo silvestre. Estos nuevos lípidos se identificaron como OL no modificado e hidroxilado (Figura 7C, 7D), observando los iones $[M-H]^-$ de sus principales especies a m/z 649.5 y 665.5, respectivamente. Una comparación de los espectros de fragmentación MS/MS de m/z 649.5 y 665.5 (Fig. 7C, 7D) indica que la hidroxilación se localiza en el ion m/z 665.5, dentro de la cadena secundaria de ácido graso. Específicamente,

el anión carboxílico del ácido graso C18:1 se observa en m/z 281 (Fig. 7C), y el anión carboxílico del ácido graso hidroxilado C18:1 se observa en m/z 297 (Fig. 7D). Este resultado sugiere que la hidroxilasa responsable de la 2-hidroxilación de OL se expresa constitutivamente mientras que la síntesis de OL es inducible en la cepa de tipo silvestre. Al igual que posiblemente la hidroxilasa responsable de la 2-hidroxilación de PE tenga una doble función hidroxilando también a los OLs.

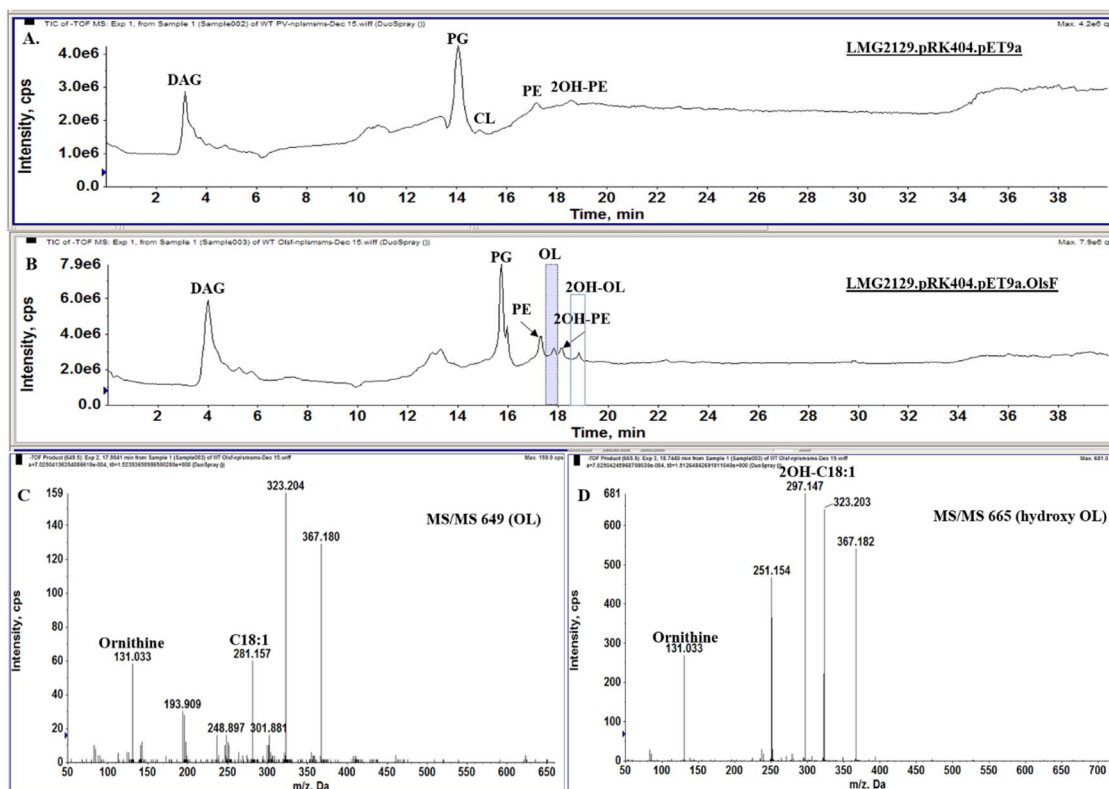


Figure 7. En *R. andropogonis* LMG2129 expresando la aciltransferasa bifuncional OlsF se forman OLs y 2OH-OLs.

Se muestran los cromatogramas de iones totales del análisis LC-MS de extractos de lípidos totales de (A) *R. andropogonis* LMG2129.pRK404.pET9a, y (B) *R. andropogonis* LMG2129.pRK404.pET9a.OlsF. (C) Espectros de masas de fragmentación inducida por colisión en modo negativo de m/z 649 identificando OL y (D) m/z 665 mostrando que son 2OH-OLs. La diferencia de 16 entre las masas m/z 297 y m/z 281 de los fragmentos principales indica que el grupo hidroxilo se encuentra en la cadena secundaria de ácido graso. Marca los picos en C y D: m/z 131 de ornitina; m/z 281 de los ácidos grasos C18:1 y m/z 297 de los ácidos grasos hidroxilados 2OH-C18:1. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3)

5.6 La ausencia de OLs afecta el crecimiento de *B. cenocepacia* en condiciones de estrés ácido.

Algunos informes anteriores habían demostrado que *B. cepacia* incrementa la formación de OLs en condiciones de estrés calórico (Taylor *et al.*, 1998). La importancia de la presencia de OLs para la resistencia al estrés por calor y al medio ácido también se había descrito en *R. tropici* (Rojas-Jiménez *et al.*, 2005; Vences-Guzmán *et al.*, 2011). Por lo tanto, se analizó si la ausencia de OL en *B. cenocepacia* NG1 afectaría negativamente la tolerancia al estrés de esta cepa en comparación con su respectiva cepa de tipo silvestre J2315. De manera análoga se estudió si la formación constitutiva de OLs podría contribuir a la resistencia de la cepa tipo *R. andropogonis* LMG2129. Para ello, las cepas se expusieron a diversos estreses abióticos variando la temperatura (30 °C, 37 °C, o 42 °C), o las condiciones de pH (pH 4 o pH 7) o las condiciones osmóticas (0.05 M, 0.5 M, o 1 M NaCl).

En los experimentos de estrés por temperatura se observó que las cepas de *R. andropogonis* tuvieron crecimiento óptimo a 30 °C (Figura 8A), y su crecimiento se afectó drásticamente a 37 °C. La ganancia de función en la cepa de *R. andropogonis* que forma constitutivamente OLs crece un poco menos que la cepa tipo a 37 °C (Figura 8B). A 42 °C, las cepas de *R. andropogonis* no crecieron, no hay aumento de la OD y suponemos que hubo lisis. No se observaron diferencias entre el crecimiento de ambas cepas de *B. cenocepacia* a 30 °C y 37 °C. Sin embargo, a 42 °C en las cepas de *B. cenocepacia* se observó, que alcanzan la fase estacionaria en un tiempo de 3h menor a lo observado a 30°C y 37°C que fué a las 10h (figura 8). Además, las cepas de *B. cenocepacia* bajo este estrés térmico reducen su crecimiento, alcanzando un máximo de OD de 0.3 y 0.18 para la cepa silvestre J2315 y la mutante NG1 respectivamente. Al parece la ausencia de OLs afecta ligeramente el crecimiento de la cepa mutante en comparación en comparación con la cepa tipo J2315 (Figura 8C).

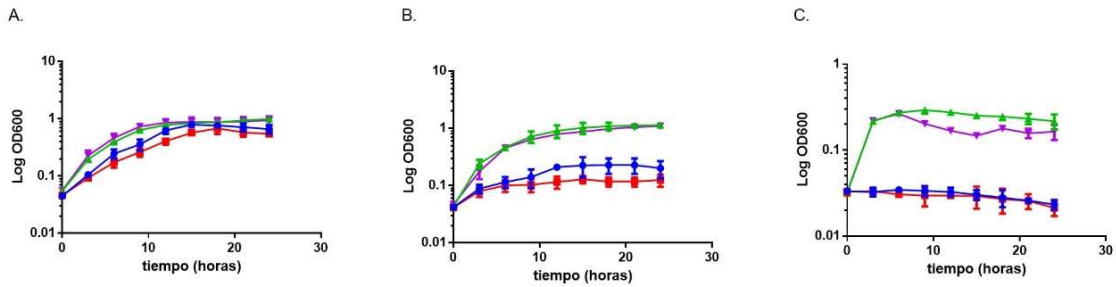


Figura 8. La ausencia de OL en *B. cenocepacia* afectó levemente su crecimiento en condiciones de estrés por temperatura, pero en *R. andropogonis* la presencia de OL no aumentó la tolerancia a este estrés. Las cepas se cultivaron en medio complejo LB a 30 °C (A), 37 °C (B), o 42 °C (C). La cinética de crecimiento se determinó en el lector de microplacas Synergy 2.0 Biotek, con agitación media midiendo cada 3 horas durante 24 horas, realizando 3 repeticiones independientes. ▲ (triángulo verde hacia arriba) *B. cenocepacia* J2315, ▼ (triángulo púrpura hacia abajo) *B. cenocepacia* NG1, ● (círculo azul) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a, ■ (cuadrado rojo) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a.olsF.

Con respecto al estrés ácido, observamos que la presencia de OL no afectó el crecimiento de las cepas de *R. andropogonis*. Por el contrario, la ausencia de OL en la cepa de *B. cenocepacia* NG1 afectó levemente la tolerancia al estrés de esta cepa en comparación con su respectiva cepa tipo J2315. En general, las cepas de *R. andropogonis* eran más resistentes a pH 4 que las cepas de *B. cenocepacia* (Figuras 9A y 9B).

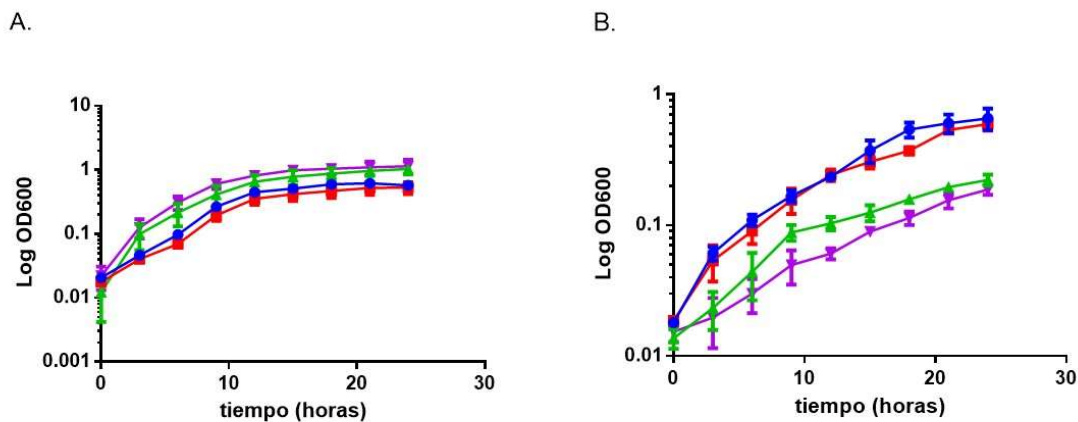


Figura 9. La ausencia de OLs en *B. cenocepacia* afectó levemente su crecimiento en condiciones de bajo pH, pero en *R. andropogonis* la presencia de OL no afectó la tolerancia a este estrés. Las cepas se cultivaron a 30 °C en medio complejo LB ajustado con búfer a pH 7.0 (A), o pH 4.0 (B). La cinética de crecimiento se determinó en un lector de placas Synergy 2.0 Biotek, con agitación media en microplacas de 96 pozos midiendo cada 3 horas durante 24 horas, realizando 3 repeticiones independientes. ▲ (triángulo verde hacia arriba) *B. cenocepacia* J2315, ▼ (triángulo púrpura hacia abajo) *B. cenocepacia* NG1, ● (círculo azul) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a, ■ (cuadrado rojo) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a.olsF.

El estrés osmótico es un estrés ambiental común para *B. cenocepacia*, al que está expuesta, por ejemplo, en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (FQ) o en el suelo (Smith *et al.*, 1996). Behrends y colaboradores (2011), investigaron la tolerancia al estrés osmótico de cinco aislamientos de *B. cenocepacia* y elucidaron los cambios metabólicos asociados con el estrés osmótico cuando los aislamientos se expusieron a 0.5 M NaCl. Al exponer las cepas a concentraciones de NaCl de 0.05 M, 0.5 M y 1 M, observamos que no hubo diferencia entre las cepas que sintetizaron OL con las que no (Figura 10A, 10B y 10C). Las cepas de *R. andropogonis* no crecieron bajo condiciones de estrés osmótico, mientras que las cepas de *B. cenocepacia* crecieron bien en medio suplementado con 0.5 M NaCl, pero no crecieron en medio suplementado con 1 M NaCl.

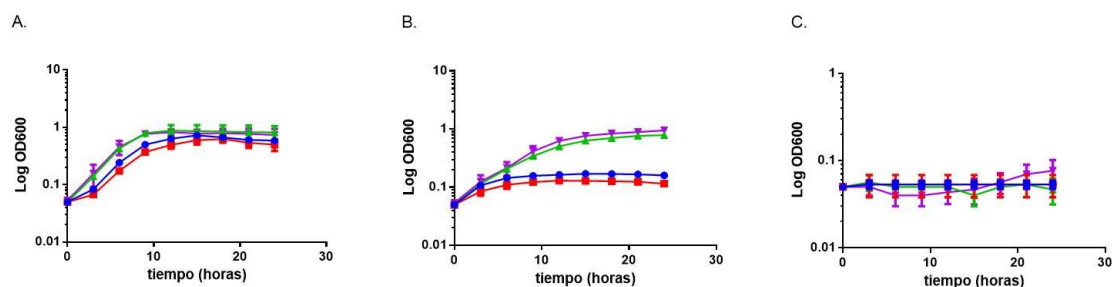


Figura 10. La presencia o ausencia de OLs en *B. cenocepacia* o *R. andropogonis* no afectó el crecimiento en condiciones de estrés osmótico.

Las cepas se cultivaron a 30 °C en medio complejo LB suplementado con NaCl a 0.05 M (A), 0.5 M (B), o 1 M (C). La cinética de crecimiento se determinó en el lector de placas Synergy 2.0 Biotek, con agitación media en microplacas de 96 pozos midiendo cada 3 horas durante 24 horas, realizando 3 repeticiones independientes. ▲ (triángulo verde hacia arriba) *B. cenocepacia* J2315, ▼ (triángulo púrpura hacia abajo) *B. cenocepacia* NG1, ● (círculo azul) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a, ■ (cuadrado rojo) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a.olsF.

5.7 La permeabilidad de la membrana no depende de la presencia o ausencia de OLs en las cepas de *Burkholderia cenocepacia* y/o *Robbsia andropogonis*

Para saber si la ausencia o la presencia de OLs tienen efectos indirectos que puedan afectar la permeabilidad de la membrana se evaluó la sensibilidad de las cepas de *B. cenocepacia* y *R. andropogonis* frente a 18 antibióticos con diferentes blancos de acción (tabla 3). No se observaron halos de inhibición en las cepas de *B. cenocepacia*, excepto en el cloranfenicol que presentó un pequeño halo de inhibición en el crecimiento de la cepa tipo J2315. La mutante NG1 no presentó un halo, pero esto se debe al cassette de resistencia que tiene la cepa mutante. En las cepas de *R. andropogonis* no se observaron diferencias entre los halos de inhibición entre las dos cepas. Las cepas de *R. andropogonis* presentaron sensibilidad a los antibióticos cloranfenicol, eritromicina, nitrofurantoína, tobramicina, trimetoprima, gentamicina, estreptomina, piperacilina y ácido nalidíxico. Además, la cepa silvestre LMG2129 de *R. andropogonis* también presentó sensibilidad a los antibióticos de neomicina, kanamicina y tetraciclina pero las cepas con plásmidos no (LMG2129.pRK.pET9a y LMG2129.pRK.pET9a.olsF), porque habían adquirido la resistencia debido a los plásmidos.

Resultados similares se observaron al evaluar la permeabilidad de la membrana frente a péptidos antimicrobianos y detergentes siguiendo las condiciones que se habían descrito para evaluar la importancia de hopanoides en la cepa K12 de *B. cenocepacia* por Schmerk y colaboradores (2011). A diferencia de los hopanoides, los OLs no presentaron efectos en la permeabilidad o fluidez de la membrana en las cepas de *R. andropogonis* y *Burkholderia cenocepacia* (figura 11). Además, las cepas de *R. andropogonis* no crecieron en las tres concentraciones evaluadas de detergente (0.01, 0.02 y 0.03% de SDS).

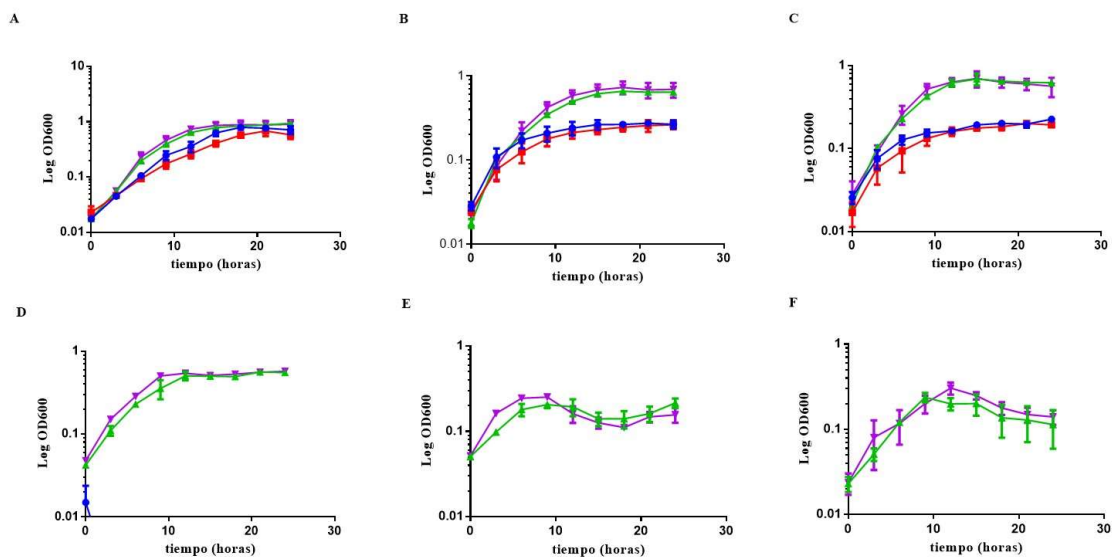


Figura 11. La permeabilidad de la membrana no depende de la presencia o ausencia de OLs en *B. cenocepacia* y/o *R. andropogonis*.

Las cepas se cultivaron a 30 °C en medio complejo LB control (A), LB con polimixina a 1000 µg (B), LB con eritromicina a 50 µg (C), o LB con SDS al 0.01% (D), SDS al 0.02% (E) o SDS al 0.03% (F). La cinética de crecimiento se determinó en el lector de placas Synergy 2.0 Biotek, con agitación media en microplacas de 96 pozos midiendo cada 3 horas durante 24 horas, realizando 3 repeticiones independientes. ▲ (triángulo verde hacia arriba) *B. cenocepacia* J2315, ▼ (triángulo púrpura hacia abajo) *B. cenocepacia* NG1, ● (círculo azul) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a, ■ (cuadrado rojo) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a.olsF.

5.8 La ausencia de OLs en *Burkholderia cenocepacia* reduce su virulencia en el modelo de infección *Galleria mellonella* en condiciones específicas.

Para investigar si la presencia o la ausencia de OLs en las cepas de *B. cenocepacia* tiene un impacto en procesos relacionados con virulencia, se analizaron los efectos de las cepas de *B. cenocepacia* en el modelo de infección de larvas de *G. mellonella*. Se observó que cuando las larvas control se infiltraron con solución salina, con la cepa DH5 α de *E. coli* o simplemente piqueteadas, permanecieron asintomáticas y no se observó muerte ni melanización hasta el día 5 (Figura 12A). Al evaluar la virulencia de la cepa tipo de *B. cenocepacia* J2315 y la cepa mutante NG1 en larvas de *G. mellonella*, observamos que ambas cepas provocaron melanización, una coloración negro pardo en las larvas de *G. mellonella* (Figura 12B y 12C).

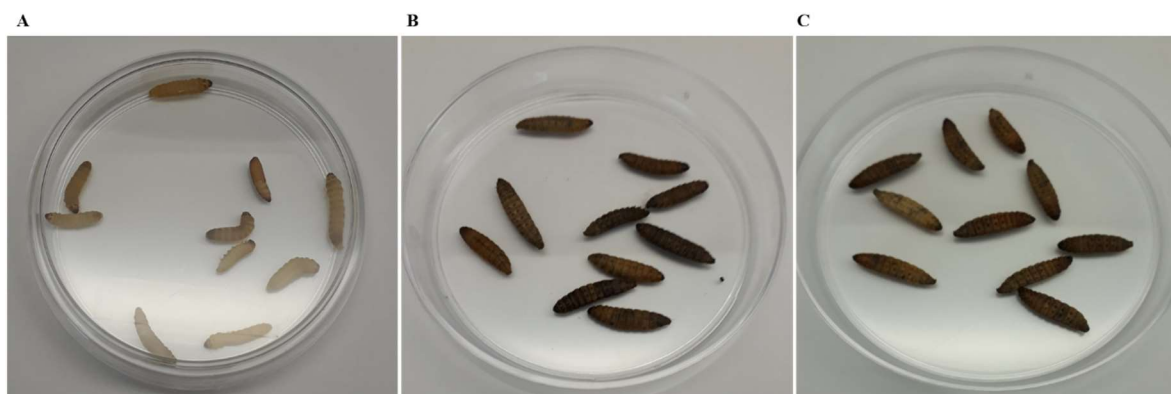


Figura 12. La melanización en larvas de *Galleria mellonella* infectadas con las cepas de *B. cenocepacia* ocurre en presencia del patógeno y no depende de la presencia de OLs.

(A) Larvas control infiltradas con solución de 10 mM MgSO $_4$, (B) Larvas infectadas con 10ul a 3×10^7 UFC/ml de la cepa tipo *B. cenocepacia* J2315, y (C) Larvas infectadas con 10ul a 3×10^7 UFC/ml de la cepa mutante NG1. Las pruebas de patogenicidad se realizaron utilizando 10 larvas de insectos colocadas individualmente en placas petri de 55 mm sin dieta e incubadas a 30 °C. La mortalidad se evaluó cada 24 h después de la inyección durante 5 días antes de pasar a la siguiente etapa de crecimiento larval. La melanización en larvas de *G. mellonella* ocurrió junto con la muerte de la larva. Se realizaron cinco experimentos independientes. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3).

Cuando larvas de *G. mellonella* se infectaron con altas concentraciones de células (3×10^7 UFC/ml y 3×10^6 UFC/ml), no se observaron diferencias entre las larvas infectadas con la cepa tipo o la cepa mutante (Figura 13). Sin embargo, a concentraciones bacterianas más bajas, como 3×10^5 UFC/ml, se observó una menor mortalidad con la cepa mutante que carece de OLs. A esa concentración, la cepa tipo *B. cenocepacia* J2315 causó una tasa de mortalidad del 44% después de 5 días, mientras que la tasa de mortalidad de la cepa mutante NG1 fue del 28 % en el mismo tiempo. La dosis mínima para la mortalidad larvaria fue 2×10^3 UFC/ml y solo aquellas larvas infectadas con la cepa tipo presentaron muerte larval con un 2% de mortalidad. Nuestros resultados indican que la presencia de OLs provoca un aumento de la mortalidad en el modelo de infección *G. mellonella* bajo una densidad celular de 3×10^5 UFC/ml.

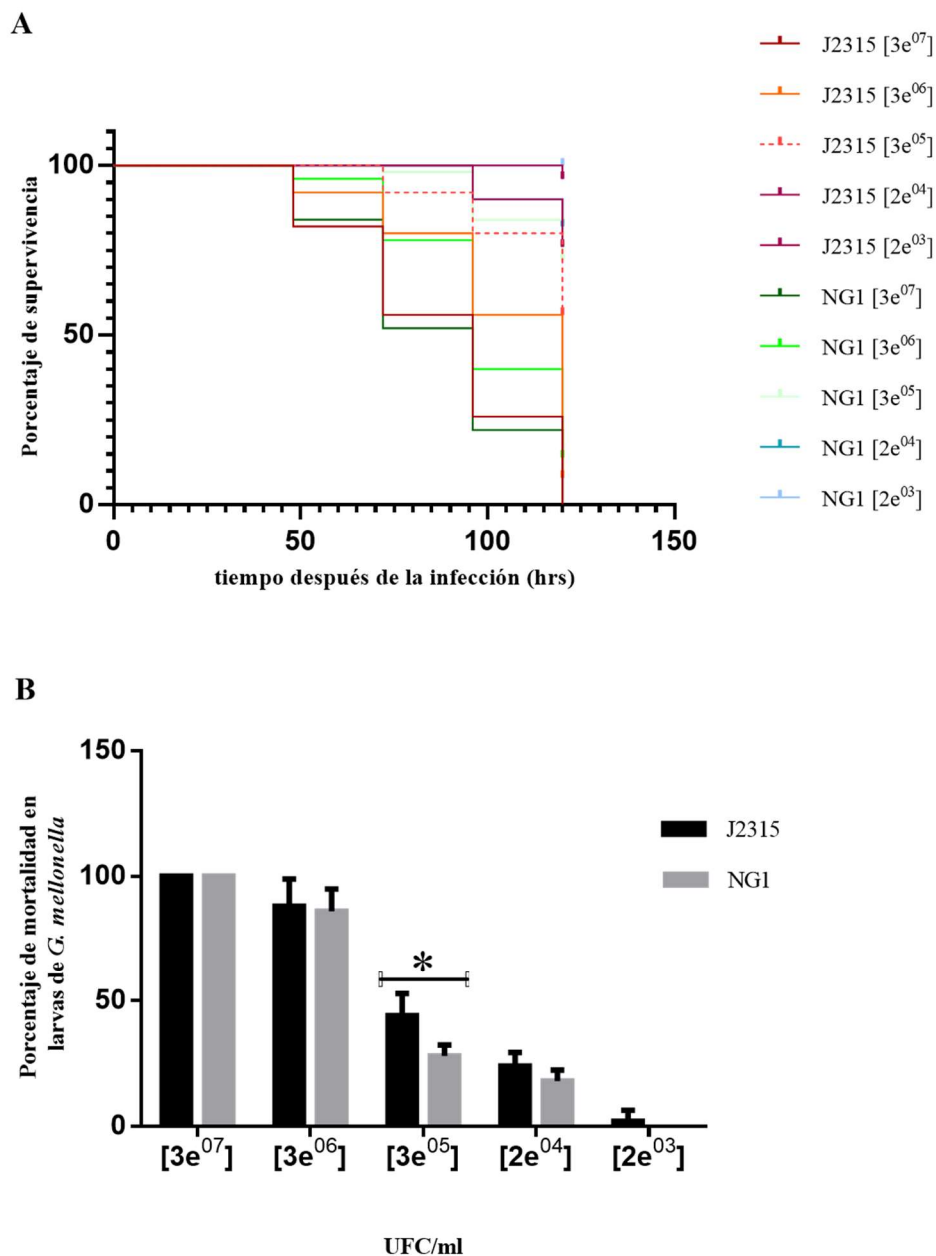


Figura 13. La mutante de *B. cenocepacia* que carece de OLs causa menor mortalidad en las larvas de *Galleria mellonella* en algunas condiciones.

(A) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier: las larvas se inyectaron con células de la cepa tipo de *B. cenocepacia* J2315 o la cepa mutante NG1 (que no sintetiza OLs) usando concentraciones de 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , 2×10^4 , y 2×10^3 UFC/ml. Las larvas se evaluaron cada 24 horas durante 5 días. La concentración más alta de 3×10^7 UFC/ml, presentó una mortalidad para ambas cepas del 100%. (B) Curva de porcentaje de mortalidad tiempo final: la cepa J2315 (columnas negras) causó una mayor mortalidad después de 5 días en el modelo de infección de larvas de *G. mellonella* en comparación con la mutante NG1 (que no sintetiza OLs) (columnas grises) a una concentración de 3×10^5 UFC/ml. Esta diferencia fue significativamente diferente (*) determinado por el análisis de prueba t con un valor P: 0,0349. El experimento se repitió 5 veces con resultados similares utilizando cincuenta larvas en total para cada tratamiento.

5.9 La presencia de OLs en *R. andropogonis* induce una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plántulas de maíz inmediatamente después de la infección.

Para saber si la presencia de OLs podría modificar la respuesta de la planta ante el patógeno, se estudió la producción de ROS por la planta tras la infección con *R. andropogonis*. Se cuantificó la formación de ROS en hojas de plantas de maíz infiltradas con bacterias utilizando la fluorescencia emitida por el compuesto diacetato 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) cuando es oxidado por ROS (Lehmann *et al.*, 2015). Inmediatamente después de la infección (dpi por sus siglas en inglés) se detectó la formación de ROS en las hojas infectadas con *R. andropogonis* (Figura 14). La producción de ROS fue significativamente mayor en las hojas infectadas con la cepa LMG2129.pRK.pET9a.olsF que forma constitutivamente OLs comparado con muestras infiltradas con 10 mM MgCl₂ o la cepa con vector vacío LMG2129.pRK.pET9a (Figura 14A, 14B, y 14C).

Para estudiar la progresión de la acumulación de ROS a lo largo del tiempo, se cuantificó ROS a los 0, 3, 7 y 15 dpi (Figura 14D). Inmediatamente después de infectar las hojas de maíz con las cepas de *R. andropogonis* se midió los niveles de ROS y se observó que fueron dos veces más altos en la cepa que forma constitutivamente OLs en comparación con la cepa con plásmido vacío. Los niveles de ROS disminuyeron a los 3, 7 y 15 dpi, y no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en los puntos de tiempo posteriores. Anteriormente ya se había descrito que las heridas causadas por la infiltración inducen la acumulación de ROS (Benikhlef *et al.*, 2013) y observamos que posiblemente el daño por infiltración de la solución de MgCl₂ induce ligeramente la formación de ROS (Figura 14A y 14D).

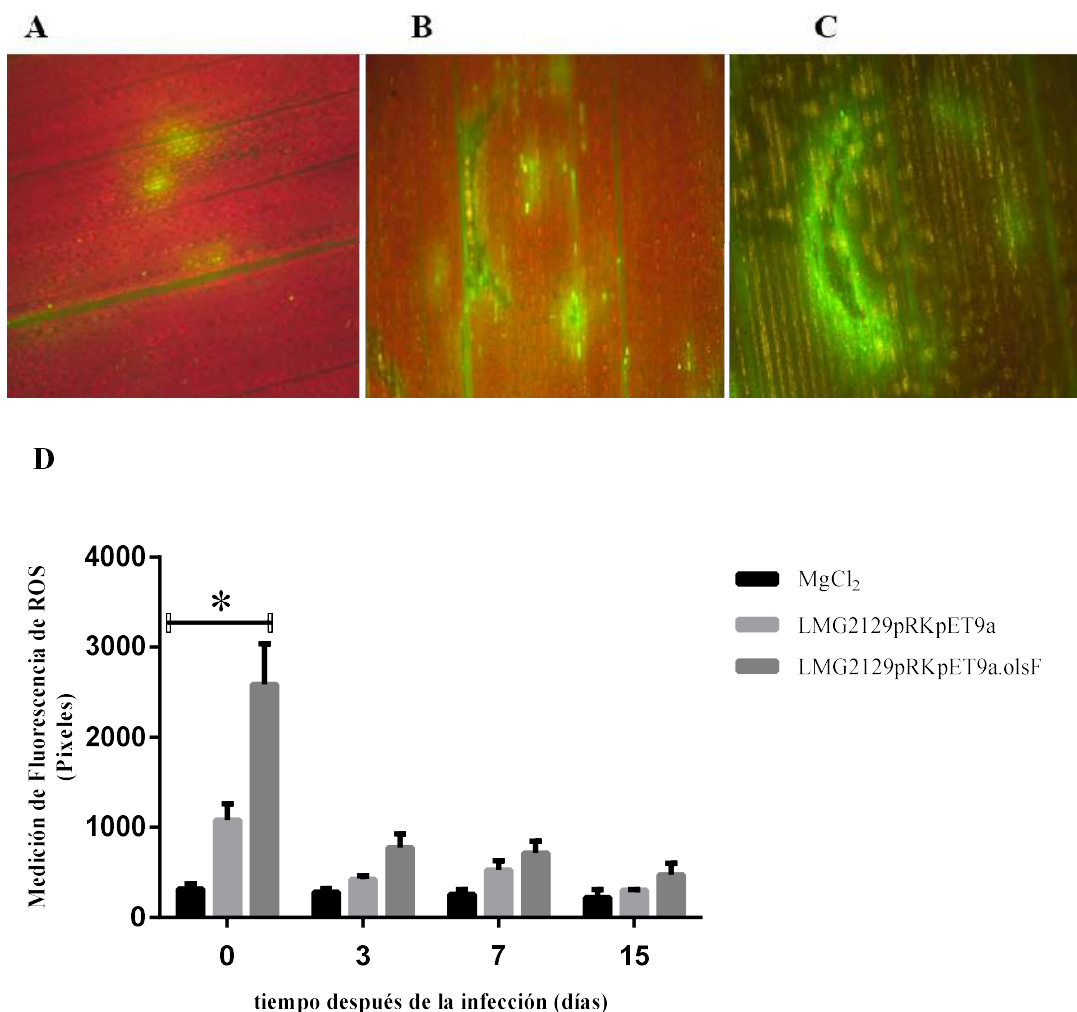


Figura 14. La presencia de OLS en *R. andropogonis* aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) directamente después de la infiltración en hojas de las plantas de maíz.

Detección de ROS con fluorescencia por DCFH-DA en hojas de maíz infiltrados con (A) solución de 10mM MgCl₂, (B) LMG2129.pRK404.pET9a, o (C) LMG2129.pRK404.pET9a.olsF. (D) La cuantificación densitométrica de la producción de ROS medida por fluorescencia por DCFH-DA demostró que inmediatamente después de la infección (0 dpi) los niveles de ROS eran dos veces más altos en las hojas infiltradas con la cepa que forma constitutivamente OLS en comparación con la cepa tipo. Los valores eran significativamente diferentes (*) según un análisis de prueba t con un valor P: 0,0263 a 0 dpi. La concentración de ROS fue menor en tiempos posteriores a los 3, 7 y 15 dpi, y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3).

5.10 La formación constitutiva de OLs no modifica la progresión de la infección causada por *Robbsia andropogonis* en plantas de maíz.

Basado en el aumento de la acumulación de ROS causada por la formación constitutiva de OLs en cepas de *R. andropogonis* expresando *olsF* en las hojas de maíz (Figure 14), quisimos caracterizar si la síntesis de OLs modificaría la progresión de la infección de *R. andropogonis*. Se evaluaron los síntomas de la enfermedad (lesiones rojo oscuro y clorosis) y el número de bacterias vivas presentes en el interior de las hojas (Figura 15). Las hojas de maíz se inocularon con las cepas de *R. andropogonis* y tres días después de la inoculación (dpi) se observaron síntomas de la enfermedad en el punto de inoculación. Estas lesiones continuaron avanzando a lo largo de los haces vasculares durante los días siguientes, mientras que las plantas infiltradas con la solución de 10mM MgCl₂ se encontraban asintomáticas (Figura 15A).

Notablemente, las lesiones causadas por cepas que expresan constitutivamente OlsF y la cepa control de vector vacío fueron similares a las producidas por la cepa tipo *R. andropogonis* LMG2129 (Figure 15B, 15C, y 15D). Las bacterias se aislaron de las hojas y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) a 0, 3, 7 y 15 dpi. El número de bacterias aumentó con el tiempo, pero no se pudieron observar diferencias significativas entre ambas cepas (Figura 15E). Estos resultados sugieren que el aumento de la acumulación de ROS inducida por la sobreexpresión de OL no influyó en la progresión de la infección en el maíz.

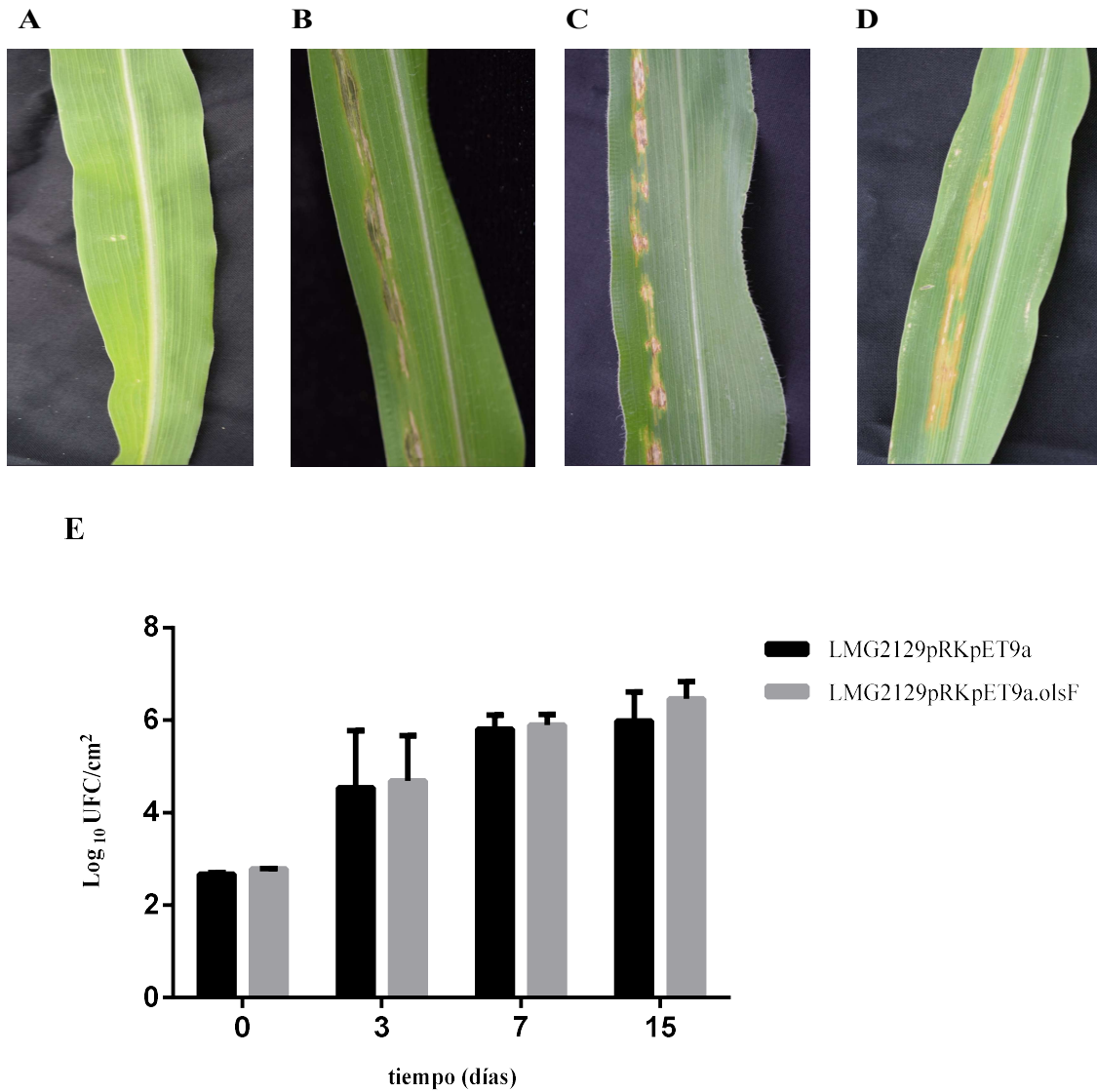


Figura 15. La presencia constitutiva de OLS no modifica la progresión de la infección por *R. andropogonis* en hojas de maíz.

Después de la infiltración con las cepas de *R. andropogonis*, las hojas de maíz mostraron lesiones rojo oscuro y clorosis, mientras que las plantas control infiltradas con MgCl₂ fueron asintomáticas. (A) 10mM MgCl₂, (B) cepa tipo LMG2129, (C) LMG2129.pRK404.pET9a, y (D) LMG2129.pRK404.pET9a.olsF. (E) El número de bacterias aisladas de las hojas de maíz a 0, 3, 7 y 15 dpi aumentó con el tiempo en las plantas infectadas, pero no se pudieron observar diferencias significativas entre las cepas. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares utilizando treinta plantas de maíz en total para cada tratamiento. Imagen tomada del artículo Córdoba-Castro *et al* 2021 (Anexo 3).

6 DISCUSIÓN

El complejo *Burkholderia* s.l. contiene especies patógenas, fitopatógenas, simbióticas y de vida libre. Las especies de este complejo pueden encontrarse en diversos hábitats tanto ambientales (suelo, agua, plantas u hongos) o relacionadas a ambientes clínicos (animales, humanos) (Estrada-de Los Santos *et al.*, 2018). Una característica que se pensó que era única para el género *Burkholderia* era la presencia de los lípidos de membrana fosfatidiletanolamina y de lípidos de ornitina (OLs), tanto en su forma hidroxilado como no hidroxilado (Yabuuchi *et al.*, 1992). Aquí mostramos que solo las especies de *Burkholderia* s.s. que a menudo corresponden a patógenos de humanos, plantas o animales forman constitutivamente OLs y que estos lípidos no se forman de manera constitutiva en los géneros recientemente propuestos *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Trinickia*, y *Mycetohabitans*, las cuales son parte del complejo *Burkholderia* s.l. Estos géneros frecuentemente se han descrito como bacterias beneficiosas y no se han encontrado evidencias que causan patogenicidad en humanos. Sin embargo, la ausencia de OLs no se debe a la ausencia de una copia del gen *olsB*. Todas las especies analizadas poseían un gen que codificaba un homólogo de la enzima *N*-aciltransferasa OlsB (Bcal1281) responsable del primer paso en la síntesis de OLs en *B. cenocepacia* (González-Silva *et al.*, 2011). La presencia de un gen que codifica un homólogo de OlsB se considera un buen indicador de la capacidad de las bacterias para formar OL (Geiger *et al.*, 2010). Además, el contexto genómico alrededor de los genes respectivos generalmente se conservaba a lo largo de *Burkholderia* s.l.

En *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Serratia proteamaculans* y *Vibrio cholerae* la síntesis de OL se induce en bajas concentraciones de fosfato y está regulada por PhoB (Benning *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1999; Vences-Guzmán *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2018). En 21 de los 43 genomas de *Burkholderia* s.l. analizados se pudo predecir la presencia de cajas Pho (tabla 4) precediendo a los respectivos genes putativos *olsB*. Es posible que no hayamos detectado las cajas Pho en algunos genomas, debido a la distancia evolutiva entre α -proteobacterias y β - proteobacterias o, alternativamente, que los genes responsables de la formación de OL se regulen de forma diferente en las otras especies. La

presencia de una caja Pho frente a *olsB* en cepas que forman OL de manera constitutiva podría significar que la expresión de las respectivas copias de *olsB* aumentaría aún más en condiciones limitantes de fosfato y esto conduciría a un aumento en la formación de OLs. Una de las cepas que no formaba OLs creciendo en medio complejo, la cepa *P. xenovorans* LB400, reemplazó parcialmente los fosfolípidos PE y 2OH-PE por lípidos de OLs modificados y no modificados cuando se creció en medio mínimo BSE con 0.02 mM de fosfato. Se cree que este tipo de recambio sirve para minimizar el requerimiento de fosfato de la célula cuando ésta enfrenta condiciones limitantes para que éste sea utilizado en otras biomoléculas que contienen fósforo como la formación de ácidos nucleicos o ATP (Zavaleta-Pastor *et al.* 2010).

Los OLs pueden ser modificados por hidroxilación, ya sea en el grupo cabeza, en las cadenas de ácidos grasos o por *N*-metilaciones (Sohlenkamp and Geiger, 2016). Estas modificaciones pueden jugar un papel importante en la respuesta a estreses ambientales, y se ha observado que la cantidad de lípidos hidroxilados (2OH-PE y 2OH-OL) aumenta a altas temperaturas en *B. cepacia* (Taylor *et al.*, 1998) y que el OL NL1 hidroxilado se forma en condiciones de estrés ácido en *B. cenocepacia* (González-Silva *et al.*, 2011). En este estudio, notamos que la ausencia de OLs modificados y sin modificar en la cepa de *B. cenocepacia* NG1, afecta ligeramente el crecimiento a altas temperaturas y a pH ácido en comparación a la cepa tipo J2315 (Figuras 8C y 9B) y es posible que la ligera disminución del crecimiento podría deberse a la ausencia del OL NL1 hidroxilado. Esta observación es consistente con las observaciones anteriores en *R. tropici*, donde la presencia de OLs hidroxilados confería resistencia a las condiciones de estrés ácido y al aumento de temperaturas (Vences-Guzmán *et al.*, 2011), aunque el efecto observado en *B. cenocepacia* claramente no es tan fuerte como en *R. tropici*. Una posible explicación es que la presencia o ausencia de OLs en *B. cenocepacia* no es uno de los factores principales para la resistencia al estrés como parece ser el caso en *R. tropici*, sino un factor secundario que contribuye en menor escala a la resistencia a las condiciones de estrés estudiadas. En el caso de las cepas de *R. andropogonis*, la cepa que expresa OlsF constitutivamente crece más lento en todas las condiciones y no contribuye a una mayor resistencia a las condiciones de estrés abiótico en las condiciones de

expresión evaluadas. Esto podría estar relacionado a que la cepa le cueste energía sintetizar estos lípidos que normalmente no sintetiza de forma constitutiva.

Los cambios en la composición de la membrana podrían afectar la permeabilidad de la membrana, haciéndola más o menos permeable a ciertos químicos. Como consecuencia, la cepa, por ejemplo, podría ser más o menos sensible a los detergentes y a algunos antibióticos, como la polimixina B, que son compuestos bien conocidos que generan daño en la membrana en bacterias Gram-negativas (Begley *et al.*, 2005; Ruiz, *et al.* 2005; Welander, *et al.*, 2009; Schmerk, *et al.*, 2011). Al evaluar la sensibilidad de las cepas de *R. andropogonis* y *B. cenocepacia* frente a un grupo de antibióticos seleccionados vimos que no había diferencias entre ellas por la presencia o ausencia de OLs. Este resultado coincide con lo observado en el trabajo de Gonzales-Silva y colaboradores (2011) quienes evaluaron la sensibilidad a antibióticos de cepas de *B. cenocepacia*. Para otros estudios de la permeabilidad de la membrana nos basamos en la metodología Schmerk y colaboradores (Schmerk *et al.*, 2011). Ellos vieron que la cepa de *B. cenocepacia* K12 que no acumulaba hopanoides mostró una mayor sensibilidad a eritromicina, polimixina B y SDS, concluyendo que la ausencia de estos lípidos afectaba la estabilidad y permeabilidad de sus membranas. Sin embargo, en el presente estudio bajo las condiciones evaluadas no se observaron diferencias en la susceptibilidad comparando la cepa silvestre y la mutante deficiente en la formación de OLs. Por lo que concluimos que al menos en nuestras condiciones experimentales la ausencia de estos lípidos no afecta la estabilidad y permeabilidad de las membranas.

Los lípidos de la membrana pueden desempeñar un papel en las interacciones entre las bacterias y sus huéspedes durante la patogenicidad. Bartholomew y colaboradores (2019), describieron que una 2-hidroxilación en el lípido A contribuye a la virulencia en *Acinetobacter baumannii* usando a *G. mellonella* como modelo de infección. Ellos demostraron que solo el 10% de las larvas sobrevivieron cuando se les infectó con la cepa tipo y la mutante complementada. En contraste, el 50% de las larvas sobrevivieron cuando se inocularon con la mutante deficiente en *lpxO*. En un estudio reciente de Kim y colaboradores (2018), concluyeron que una mayor formación de OLs podría aumentar la

persistencia, pero al mismo tiempo reducir la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el insecto *Tenebrio molitor* y en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

En nuestro estudio observamos que la media de las mortalidades a los 5 días provocadas por la mutante de *B. cenocepacia* deficiente en OLs parece ser menor en diferentes densidades celulares probadas, pero se observó una reducción estadísticamente significativa de la mortalidad, en el modelo *G. mellonella*, sólo a una densidad celular de 3×10^5 UFC / ml. Una posible explicación es que los OLs no son el principal factor que contribuye a la mortalidad en este sistema experimental, y que un efecto más fuerte causado por la ausencia de OLs podría estar cubierto por otros factores desconocidos. Los estudios más antiguos de otros grupos sobre la inmunogenicidad de los OLs son contradictorios y una razón probable es que los OLs no son el único o principal factor en muchas de las bacterias estudiadas, aunque probablemente contribuyan a la inmunogenicidad al interferir o contribuir a los efectos de otros factores de virulencia. Sin embargo, aunque los OLs parecen afectar la interacción bacteria-huésped, claramente hay factores adicionales presentes en *B. cenocepacia* que afectan su virulencia.

Las plantas tienen elaborados mecanismos de defensa de múltiples capas para sobrevivir al ataque constante de patógenos. La primera línea de defensa es la inmunidad innata, que es desencadenada por componentes moleculares de microbios, llamados patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs por sus siglas en inglés), incluyendo componentes de la membrana bacteriana (Boller and Felix, 2009). Una vez que los MAMPs son reconocidos, se activan la inmunidad por patrones (PTI por sus siglas en inglés), induciendo una fuerte acumulación de ROS, cascadas de señalización tipo MAPK y activación transcripcional de genes de respuesta de defensa temprana (Tsuda and Somssich, 2015). Después de esta respuesta inicial, las plantas pueden inducir la inmunidad activada por efectores (ETI por sus siglas en inglés), que se basa en el reconocimiento específico de los efectores de patógenos por los genes *R* que conduce a una muerte celular programada local o una respuesta de hipersensibilidad (HR por sus siglas en inglés) (Boller and Felix, 2009). Los efectos combinados de PTI y ETI pueden bloquear la invasión de patógenos, tanto localmente en el sitio de infección como sistémicamente en las hojas no infectadas (Craig *et*

al., 2009; Tsuda and Somssich, 2015). Sin embargo, aunque PTI y ETI comparten elementos de respuesta de defensa molecular similares, tienen diferentes dinámicas en la activación e intensidad (Katagiri and Tsuda, 2010) Se demostró que los lípidos polares bacterianos pueden estimular respuestas inmunitarias específicas en el huésped (Melian et al., 2000; Roura-Mir et al., 2005) Por ejemplo, los lípidos polares de *B. pseudomallei*, OLS y los ramnolípidos, inducen la producción de anticuerpos y varios lípidos polares estimulan las respuestas inmunitarias celulares (González-Juarrero *et al.*, 2013). Aquí, nosotros mostramos que una cepa de *R. andropogonis* que sintetiza constitutivamente OLS causa un incremento de la formación de ROS directamente después de la infección de las hojas de maíz (Figura 14). Esto que sugiere que las plantas pueden reconocer a OLS como MAMP, induciendo la PTI. Se ha descrito que las ROS desempeñan múltiples funciones durante la vida de las plantas, incluida la modulación del crecimiento y el desarrollo y la respuesta a estímulos abióticos y bióticos (Camejo *et al.*, 2016). Además, vimos que la presencia constitutiva de OL en *R. andropogonis* no afecta el número de bacterias que crecen dentro de las hojas (Figura 15), lo que sugiere que un posible reconocimiento de OL y la posterior acumulación de ROS no son suficientes para detener la infección. Una posibilidad para explicar este fenómeno es que la infección infligida por *R. andropogonis* puede inhibirse activando ETI, pero no PTI. Esto concuerda con la observación de que la expresión del gen *R. Rxo1* controla la resistencia contra *R. andropogonis* en maíz y arroz (Zhao *et al.*, 2005). Otra posibilidad es que, durante la infección, *R. andropogonis* pueda producir moléculas depuradoras o enzimas desintoxicantes que pueden inhibir ROS, lo que se ha descrito previamente como una estrategia en la infección de para múltiples patógenos vegetales (Lehmann *et al.*, 2015).

7 CONCLUSIONES

En este estudio se pudo esclarecer que solo el género de *Burkholderia* sensu stricto forma constitutivamente dos formas de PE y dos formas de OLs. En los géneros recientemente propuestos como *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Mycetohabitans* y *Trinickia*, solo se forman constitutivamente las dos formas de PE, pero no los OLs.

La ausencia de OLs en los nuevos géneros propuestos no se debe a la ausencia del gen *olsB* sino por una probable regulación por el sistema de dos componentes PhoRB. Los genes codificando los homólogos de OlsB son precedidos por cajas Pho en estos géneros. En el caso de la cepa *P. xenovorans* LB400 la síntesis de estos lípidos se pudo inducir en condiciones bajas de fosfato reemplazando las dos formas de PE por OLs.

La expresión del gen *olsF* y la ganancia de función de la síntesis de OLs en *R. andropogonis* no afectaron la sensibilidad de la cepa frente a condiciones de estrés abiótico evaluadas en comparación con la cepa tipo LMG2129. Sin embargo, la pérdida de función en *B. cenocepacia* alteró ligeramente la tolerancia a altas temperaturas y pH ácido en comparación a su respectiva cepa tipo J2315.

Finalmente se pudo concluir que la presencia de OLs en ambas interacciones bacteria-huésped que estudiamos afecta cómo se percibe el patógeno y puede afectar en algunos casos el resultado de la infección.

8 PERSPECTIVAS

Se considera importante seguir trabajando en determinar el papel de los OLs en *Burkholderiales* durante las interacciones planta-patógeno y animal-patógeno enfocándose en los siguientes aspectos:

:

- Comprobar si en las larvas de *G. mellonella* hay un incremento o disminución de la formación de ROS frente a la presencia o ausencia de OLs como se observó en las plantas de maíz.
- Identificar gen(es) responsable(s) de los lípidos hidroxilados 2-OH-OL y 2-OH-PE y mediante mutantes estudiar la función que pueden desempeñar en la membrana la ausencia de estos lípidos hidroxilados en algunas especies de *Burkholderia* s.l. Se podría ver si son un factor principal para la resistencia a estrés abiótico, si se generan cambios en la permeabilidad de la membrana y a su vez si hay mayores efectos en la patogenicidad de las cepas frente a hospederos eucariotas.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M.H., and Heulin, T. (1999). *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2, 787-794. doi: 10.1099/00207713-49-2-787.
- Antelmann, H., Scharf, C., and Hecker, M. (2000). Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *Journal of bacteriology*, 182(16), 4478-4490.
- Angus, A. A., Agapakis, C. M., Fong, S., Yerrapragada, S., Estrada-de los Santos, P., Yang, P., Song, N., Kano, S., Caballero-Mellado, J., de Faria, S. M., Dakora, F. D., Weinstock, G., and Hirsch, A. M. (2014). Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. *PloS one*, 9(1), e83779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083779>
- Alghoribi, M.F., Gibreel, T.M., Dodgson, A.R., Beatson, S.A., and Upton, M. (2014). *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One* 9(7), e101547. doi: 10.1371/journal.pone.0101547.
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A., and Fukazawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the Causal Agent of Rice Seedling Blight *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(2), 144-152. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-37-2-144>.
- Bailey, T. L., and Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(1), 48-54.
- Barbosa, L.C., Goulart, C.L., Avellar, M.M., Bisch, P.M., and von Kruger, W.M.A. (2018). Accumulation of ornithine lipids in *Vibrio cholerae* under phosphate deprivation is dependent on VC0489 (OlsF) and PhoBR system. *Microbiology (Reading)* 164(3), 395-399. doi: 10.1099/mic.0.000607.
- Barka, E.A., Nowak, J., and Clément, C. (2006). Enhancement of Chilling Resistance of Inoculated Grapevine Plantlets with a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11), 7246-7252. doi: DOI: 10.1128/AEM.01047-06.

- Bartholomew, T.L., Kidd, T.J., Sa Pessoa, J., Conde Alvarez, R., and Bengoechea, J.A. (2019). 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* Lipid A Contributes to Virulence. *Infect Immun* 87(4). doi: 10.1128/IAI.00066-19.
- Begley, M., Gahan, C. G. and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 625-651
- Behrends, V., Bundy, J.G., and Williams, H.D. (2011). Differences in strategies to combat osmotic stress in *Burkholderia cenocepacia* elucidated by NMR-based metabolic profiling. *Lett Appl Microbiol* 52(6), 619-625. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03050.x.
- Benikhlef, L., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E., Serrano, M., Binda, M., Costa, A., Lehmann S., and Métraux J. P. (2013). Perception of soft mechanical stress in *Arabidopsis* leaves activates disease resistance. *BMC Plant Biol* 13, 133. doi: 10.1186/1471-2229-13-133.
- Bernier S.P., Silo-Suh L., Woods D.E., Ohman D.E., and Sokol P.A. Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):5306-13. doi: 10.1128/IAI.71.9.5306-5313.2003. PMID: 12933878; PMCID: PMC187319.
- Benning, C., Huang, Z.H., and Gage, D.A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys* 317(1), 103-111. doi: 10.1006/abbi.1995.1141.
- Bielecki RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24:225–252
- Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant*, 8(4), 521-539.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8), 911-917. doi: 10.1139/o59-099.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379-406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- Bosak, T., Schubotz, F., de Santiago-Torio, A., Kuehl, J.V., Carlson, H.K., Watson, N., Daye M., Summons R. E., Arkin A. P., Deutschbauer A. M., (2016). System-Wide

- Adaptations of *Desulfovibrio alaskensis* G20 to Phosphate-Limited Conditions. *PLoS One* 11(12), e0168719. doi: 10.1371/journal.pone.0168719.
- Brämer, C.O., Vandamme, P., da Silva, L.F., Gómez, J.G., and Steinbüchel, A. (2001). Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 5), 1709-1713. doi: 10.1099/00207713-51-5-1709.
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., and Santos, P.E.L. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 4), 1165-1172. doi: 10.1099/ijs.0.02951-0.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., and Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5308-5319
- Camejo, D., Guzman-Cedeno, A., and Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* 103, 10-23. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.035.
- Cash H.A., Woods D.E., McCullough B., Johanson W.G. Jr. and Bass J.A. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis*. 1979 Mar;119(3):453-9. doi: 10.1164/arrd.1979.119.3.453. PMID: 109021.
- Castonguay-Vanier J, Vial L, Tremblay J, Déziel E. *Drosophila melanogaster* as a model host for the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS One*. 2010 Jul 12;5(7):e11467. doi: 10.1371/journal.pone.0011467. PMID: 20635002; PMCID: PMC2902503.
- Chadwick, J. S., Caldwell, S. S., and Chadwick, P. (1990). Adherence patterns and virulence for *Galleria mellonella* larvae of isolates of *Serratia marcescens*. *Journal of invertebrate pathology*, 55(1), 133–134. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90044-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90044-7)
- Chen, W.M., de Faria, S.M., James, E.K., Elliott, G.N., Lin, K.Y., Chou, J.H., Sheu S.Y., Cnockaert M., Sprent J. I., and Vandamme P.(2007). *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 5), 1055-1059. doi: 10.1099/ijs.0.64873-0.

- Chen, W.M., James, E.K., Chou, J.H., Sheu, S.Y., Yang, S.Z., and Sprent, J.I. (2005). Beta-rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol* 168(3), 661-675. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01533.x.
- Chu KK, Davidson DJ, Halsey TK, Chung JW, Speert DP. Differential persistence among genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in a murine model of pulmonary infection. *Infect Immun*. 2002 May;70(5):2715-20. doi: 10.1128/IAI.70.5.2715-2720.2002. PMID: 11953418; PMCID: PMC127911.
- Clode, F.E., Metherell, L.A., and Pitt, T.L. (1999). Nosocomial Acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160(1), 374-375. doi: 10.1164/ajrccm.160.1.16011.
- Coenye, T., Laevens, S., Willems, A., Ohlen, M., Hannant, W., Govan, J.R., Gillis M., Falsen E., and Vandamme P. (2001). *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 3), 1099-1107. doi: 10.1099/00207713-51-3-1099.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., and Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 607-626.
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl Environ Microbiol* 79(24), 7696-7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13.
- Cother, E.J., Noble, D., Peters, B.J., Albiston, A., and Ash, G.J. (2004). A new bacterial disease of jojoba (*Simmondsia chinensis*) caused by *Burkholderia andropogonis*. *Plant Pathology* 53(2), 129-135. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.00982.x>.
- Cotter, G., Doyle, S., and Kavanagh, K. (2000). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS immunology and medical microbiology*, 27(2), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01427.x>
- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A. (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J Exp Bot* 60(4), 1123-1132. doi: 10.1093/jxb/erp059.

- Crépin, S., Chekabab, S.M., Le Bihan, G., Bertrand, N., Dozois, C.M., and Harel, J. (2011) The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 153: 82–88.
- Defrance, M., and van Helden, J. (2009). Info-gibbs: a motif discovery algorithm that directly optimizes information content during sampling. *Bioinformatics* 25(20), 2715-2722. doi: 10.1093/bioinformatics/btp490.
- Deng, Y., Boon, C., Eberl, L., and Zhang, L. H. (2009). Differential modulation of *Burkholderia cenocepacia* virulence and energy metabolism by the quorum-sensing signal BDSF and its synthase. *Journal of bacteriology*, 191(23), 7270–7278. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-09>
- Depoorter, E., Bull, M.J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., and Mahenthiralingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(12), 5215-5229. doi: 10.1007/s00253-016-7520-x.
- Dobritsa, A.P., and Samadpour, M. (2016). 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* 66(8), 2836-2846. doi: 10.1099/ijsem.0.001065.
- Duan, Y. P., Sun, X., Zhou, L. J., Gabriel, D. W., Benyon, L. S., and Gottwald, T. (2009). Bacterial brown leaf spot of citrus, a new disease caused by *Burkholderia andropogonis*. *Plant disease*, 93(6), 607-614.
- Eberl, L., and Vandamme, P. (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research*, 5.
- Elliott, G. N., Chen, W. M., Bontemps, C., Chou, J. H., Young, J. P. W., Sprent, J. I., and James, E. K. (2007). Nodulation of *Cyclopia* spp.(Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. *Annals of Botany*, 100(7), 1403-1411.
- Eloy, M., and Cruz, L. (2008). A new bacterial disease of carnation in Portugal caused by *Burkholderia andropogonis*. *Revista de Ciências Agrárias* 31(2), 89-95.
- Escobedo-Hinojosa, W. I., Vences-Guzmán, M. Á., Schubotz, F., Sandoval-Calderón, M., Summons, R. E., López-Lara, I. M., Geiger O., and Sohlenkamp, C. (2015). OlsG

- (Sinac_1600) is an ornithine lipid *N-methyltransferase* from the planctomycete *Singulisphaera acidiphila*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 15102-15111.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., and Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* 67(6), 2790-2798. doi: 10.1128/AEM.67.6.2790-2798.2001.
- Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., and Caballero-Mellado, J. (2002). A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian journal of microbiology*, 48(4), 285-294.
- Estrada-de Los Santos, P., Palmer, M., Chavez-Ramirez, B., Beukes, C., Steenkamp, E.T., Briscoe, L., Khan N., Maluk M., Lafos M., Humm E., Arrabit M., Crook M., Gross E., Simon M.F., Dos-Reis J. F.B., Whitman W.B., Shapiro N., Poole P. S., Hirsch A. M., Venter S. N., and James E. K. (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 (Basel)* 9(8). doi: 10.3390/genes9080389.
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16(2), 374-381. doi: 10.1099/00221287-16-2-374.
- Fedhila, S., Buisson, C., Dussurget, O., Serror, P., Glomski, I.J., Liehl, P., Lereclus D., and Nielsen-LeRoux C. (2010). Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 103(1), 24-29. doi: 10.1016/j.jip.2009.09.005.
- Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., and Nielsen-LeRoux, C. (2006). Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Molecular microbiology*, 62(2), 339–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05362.x>
- Gao, J.L., Weissenmayer, B., Taylor, A.M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2004). Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid,

- an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Mol Microbiol* 53(6), 1757-1770. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04240.x.
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I.M., and Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog Lipid Res* 49(1), 46-60. doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.002.
- Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., and Thomas-Oates, J.E. (1999). The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol* 32(1), 63-73. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x.
- Geske, T., Vom Dorp, K., Dörmann, P., and Hölzl, G. (2013). Accumulation of glycolipids and other non-phosphorous lipids in *Agrobacterium tumefaciens* grown under phosphate deprivation. *Glycobiology* 23(1), 69-80. doi: 10.1093/glycob/cws124.
- Ghosh, S., Malukani, K.K., Chandan, R.K., Sonti, R.V., and Jha, G. (2019). "How Plants Respond to Pathogen Attack: Interaction and Communication" in *Sensory Biology of Plants*, ed. S. S. (Singapore: Springer).
- Gillis, M., Van, T.V., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers P., Kersters K., Heulin T., and Fernandez M. P. (1995). Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45(2), 274-289. doi: doi.org/10.1099/00207713-45-2-274.
- Glagoleva, O.B., Kovalskaya, N.U., and Umarov, M.M. (1996). Endosymbiosis formation between nitrogen-fixing bacteria *pseudomonas caryophylli* and rape root cells. *Endocytobiosis and Cell Research* 11, 147-158.
- González-Juarrero, M., Mima, N., Trunck, L.A., Schweizer, H.P., Bowen, R.A., Dascher, K., Mwangi W., Eckstein T. M. (2013). Polar lipids of *Burkholderia pseudomallei* induce different host immune responses. *PLoS One* 8(11), e80368. doi: 10.1371/journal.pone.0080368.
- González-Silva, N., López-Lara, I.M., Reyes-Lamothe, R., Taylor, A.M., Sumpton, D., Thomas-Oates, J., and Geiger O (2011). The dioxygenase-encoding *olsD* gene from *Burkholderia cenocepacia* causes the hydroxylation of the amide-linked fatty acyl

- moiety of ornithine-containing membrane lipids. *Biochemistry* 50(29), 6396-6408. doi: 10.1021/bi200706v.
- Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J.F., Tiedje J. M., Vandamme P. (2004). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 5), 1677-1681. doi: 10.1099/ij.s.0.63101-0.
- Goris, J., Dejonghe, W., Falsen, E., De Clerck, E., Geeraerts, B., Willems, A., Top E. M., Vandamme P. De Vos P.a (2002). Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 25(3), 340-352. doi: 10.1078/0723-2020-00134.
- Govindarajan, M., Balandreau, J., Muthukumarasamy, R., Revathi, G., and Lakshminarasimhan, C. (2006). Improved Yield of Micropropagated Sugarcane Following Inoculation by Endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil* 280, 239-252. doi: doi.org/10.1007/s11104-005-3223-2.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59(3), 307-321. doi: 10.1093/sysbio/syq010.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4), 557-580.
- Hendrickson, E. L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G., and Ausubel, F. M. (2001). Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7126–7134. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7126-7134.2001>
- Hendry, S., Steinke, S., Wittstein, K., Stadler, M., Harmrolfs, K., Adewunmi, Y., Sahukhal, G., Elasri, M., Thomashow, L., Weller, D., Mavrodi, O., Blankenfeldt, W., and Mavrodi, D. (2021). Functional Analysis of Phenazine Biosynthesis Genes in *Burkholderia* spp. *Applied and environmental microbiology*, 87(11), e02348-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02348-20>

- Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*. 1995 Feb;7(1):4-10. doi: 10.1016/0952-7915(95)80022-0. PMID: 7772280
- Hölzl, G., Sohlenkamp, C., Vences-Guzmán, M. A., and Gisch, N. (2018). Headgroup hydroxylation by *OlsE* occurs at the C4 position of ornithine lipid and is widespread in proteobacteria and bacteroidetes. *Chemistry and physics of lipids*, 213, 32-38.
- Huber, B., Feldmann, F., Köthe, M., Vandamme, P., Wopperer, J., Riedel, K., and Eberl, L. (2004). Identification of a novel virulence factor in *Burkholderia cenocepacia* H111 required for efficient slow killing of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and immunity*, 72(12), 7220–7230. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7220-7230.2004>
- Ibrahim, M., Tang, Q., Shi, Y., Almoneafy, A., Fang, Y., Xu, L., Wen L., Bin L and 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>
- Jacobs, J. L., Fasi, A. C., Ramette, A., Smith, J. J., Hammerschmidt, R., and Sundin, G. W. (2008). Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3121–3129. <https://doi.org/10.1128/AEM.01941-07>
- Jander, G., Rahme, L. G., and Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of bacteriology*, 182(13), 3843–3845. <https://doi.org/10.1128/JB.182.13.3843-3845.2000>
- Jonsson, R., Struve, C., Jenssen, H., and Krogfelt, K.A. (2017). The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Virulence* 8(8), 1894-1899. doi: 10.1080/21505594.2016.1256537.
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Arabidopsis Book* 1, e0039. doi: 10.1199/tab.0039.
- Katagiri, F., and Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Mol Plant Microbe Interact* 23(12), 1531-1536. doi: 10.1094/MPMI-04-10-0099.
- Kim, S.K., Park, S.J., Li, X.H., Choi, Y.S., Im, D.S., and Lee, J.H. (2018). Bacterial ornithine lipid, a surrogate membrane lipid under phosphate-limiting conditions, plays

- important roles in bacterial persistence and interaction with host. *Environ Microbiol* 20(11), 3992-4008. doi: 10.1111/1462-2920.14430.
- Kim, H.B., Park, M.J., Yang, H.C., An, D.S., Jin, H.Z., and Yang, D.C. (2006). *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 11), 2529-2533. doi: 10.1099/ijs.0.64387-0.
- Köthe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetz, I., and Eberl, L. (2003). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cellular microbiology*, 5(5), 343–351. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00280.x>
- L'Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Balet, F., et al. (2011). A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog* 7(7), e1002148. doi: 10.1371/journal.ppat.1002148.
- Lamarche, M.G., Wanner, B.L., Crépin, S., and Harel, J. (2008b) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 32: 461– 473.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., and Métraux, J.P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54-62. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.08.027.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*, 25, 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Lery, L. M., Goulart, C. L., Figueiredo, F. R., Verdoorn, K. S., Einicker-Lamas, M., Gomes, F. M., Machado E. A., Bisch P. M., and von Kruger, W. M. (2013). A comparative proteomic analysis of *Vibrio cholerae* O1 wild-type cells versus a *phoB* mutant showed that the PhoB/PhoR system is required for full growth and *rpoS* expression under inorganic phosphate abundance. *Journal of proteomics*, 86, 1-15.
- Lewenza, S., Falsafi, R., Bains, M., Rohs, P., Stupak, J., Sprott, G.D., and Hancock R. E.W. (2011). The *olsA* gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in

- antimicrobial peptide susceptibility. *FEMS Microbiol Lett* 320(2), 95-102. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02295.x.
- Li, X., and De Boer, S.H. (2005). First Report of *Burkholderia andropogonis* Causing Leaf Spots of *Bougainvillea* sp. in Hong Kong and Clover in Canada. *Plant Disease* 89, 1132. doi: doi.org/10.1094/PD-89-1132A.
- Lim, Y.W., Baik, K.S., Han, S.K., Kim, S.B., and Bae, K.S. (2003). *Burkholderia sordidicola* sp. nov., isolated from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 5), 1631-1636. doi: 10.1099/ij.s.0.02456-0.
- Lin, Q. H., Lv, Y. Y., Gao, Z. H., and Qiu, L. H. (2020). *Pararobbsia silviterrae* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil and reclassification of *Burkholderia alpina* as *Pararobbsia alpina* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 1412–1420. doi: 10.1099/ijsem.0.003932
- Lopes-Santos, L., Castro, D., Ferreira-Tonin, M., Corrêa, D., Weir, B., Park, D., and Destéfano, S. (2017). Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(6).
- López-Lara, I.M., Gao, J.L., Soto, M.J., Solares-Pérez, A., Weissenmayer, B., Sohlenkamp, C., Verroios G. P., Thomas-Oates J., and Geiger O. (2005). Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol Plant Microbe Interact* 18(9), 973-982. doi: 10.1094/MPMI-18-0973.
- López-Lara, I. M., and Geiger, O. (2017). Bacterial lipid diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(11), 1287-1299.)
- Lundgren, J. G., Lehman, R. M., and Chee-Sanford, J. (2007). Bacterial communities within digestive tracts of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 100(2), 275-282.
- Martinez-Guerrero, C. E., Ciria, R., Abreu-Goodger, C., Moreno-Hagelsieb, G., and Merino, E. (2008). GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W176–W180. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn330>

- Matus-Acuña, V., Caballero-Flores, G., Reyes-Hernández, B.J., and Martínez-Romero, E. (2018). Bacterial preys and commensals condition the effects of bacteriovirus nematodes on *Zea mays* and *Arabidopsis thaliana*. *Applied Soil Ecology* 132, 99-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.012>.
- McCloskey, A.P., Lee, M., Megaw, J., McEvoy, J., Coulter, S.M., Pentlavalli, S., and Lavery G. (2019). Investigating the In Vivo Antimicrobial Activity of a Self-Assembling Peptide Hydrogel Using a *Galleria mellonella* Infection Model. *ACS Omega* 4(2), 99-106. doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03578>.
- Melian, A., Watts, G.F., Shamshiev, A., De Libero, G., Clatworthy, A., Vincent, M., Brenner M. B., Behar S., Niazi K., Modlin R. L., Almo S., Ostrov D., Nathenson S. G. and Porcelli S. A.(2000). Molecular recognition of human CD1b antigen complexes: evidence for a common pattern of interaction with alpha beta TCRs. *J Immunol* 165(8), 4494-4504. doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4494.
- Merry, C. R., Perkins, M., Mu, L., Peterson, B. K., Knackstedt, R. W., and Weingart, C. L. (2015). Characterization of a novel two-component system in *Burkholderia cenocepacia*. *Current microbiology*, 70(4), 556-561.
- Miller, J. (1972). "Experiments in Molecular Genetics," in *Experiments in Molecular Biology*, ed. J. Miller, Miller, JB. Cold Spring Harbor Laboratory), 431-433.
- Minnikin, D.E., and Abdolrahimzadeh, H. (1974). The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett* 43(3), 257-260. doi: 10.1016/0014-5793(74)80655-1.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M., **and** Drenkard, E. (2003). Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and immunity*, 71(5), 2404–2413. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2404-2413.2003>
- Moffett, M.L., Hayward, A.C., and Fahy, P.C. (1986). Five new hosts of *Pseudomonas andropogonis* occurring in eastern Australia: host range and characterization of isolates. *Plant pathology* 35, 34-43. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1986.tb01978.x>.

- Moore, E. K., Hopmans, E. C., Rijkstra, W. I. C., Villanueva, L., Dedysh, S. N., Kulichevskaya, I. S., Wienk H., Schoutsen F., Sinninghe and Damsté, J. S. (2013). Novel mono-, di-, and trimethylornithine membrane lipids in northern wetland planctomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 79(22), 6874-6884.
- Nandakumar, R., Bollich, P. A., Shahjahan, A. K. M., Groth, D. E., and Rush, M. C. (2008). Evidence for the soilborne nature of the rice sheath rot and panicle blight pathogen, *Burkholderia gladioli* 1. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(1), 148-154.
- Palleroni, N.J. (2015). "*Burkholderia*," in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, ed. S.D. M.E. Trujillo, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman.), 1-50.
- Palleroni, N.J., and Holmes, B. (1981). *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31(4), 479-481. doi: doi.org/10.1099/00207713-31-4-479.
- Peeters, C., Meier-Kolthoff, J. P., Verheyde, B., De Brandt, E., Cooper, V. S., and Vandamme, P. (2016). Phylogenomic study of *Burkholderia glathei*-like organisms, proposal of 13 novel *Burkholderia* species and emended descriptions of *Burkholderia sordidicola*, *Burkholderia zhejiangensis*, and *Burkholderia grimmiae*. *Frontiers in microbiology*, 7, 877.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J.I., Estrada-de Los Santos, P., Reis, V.M., and Caballero-Mellado J.(2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 8), 1931-1937. doi: 10.1099/ij.s.0.64362-0.
- Reis, V.M., Santos, P.E.L., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., Mavingui P., Baldani V. L. D., Schmid M., Baldani J. I., Balandreau J., Hartmann A., Caballero-Mellado J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 6), 2155-2162. doi: 10.1099/ij.s.0.02879-0.
- Riera-Ruiz C., Castro-Lara J, Jimenez-Feijoó M. I and Cevallos-Cevallos J.M. 2018 Interactions of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* in symptom development in rice seeds and seedlings, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40:3, 347-357, DOI: 10.1080/07060661.2018.1478884

- Rojas-Jiménez, K., Sohlenkamp, C., Geiger, O., Martínez-Romero, E., Werner, D., and Vinuesa, P. (2005). A ClC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance. *Mol Plant Microbe Interact* 18(11), 1175-1185. doi: 10.1094/MPMI-18-1175.
- Rojas-Rojas, F.U., López-Sánchez, D., Meza-Radilla, G., Méndez-Canarios, A., Ibarra, J.A., and Estrada-de Los Santos, P. (2019). The controversial *Burkholderia cepacia* complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens. *Rev Argent Microbiol* 51(1), 84-92. doi: 10.1016/j.ram.2018.01.002.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., **and** Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (70), e4392. <https://doi.org/10.3791/4392>
- Roura-Mir, C., Wang, L., Cheng, T.Y., Matsunaga, I., Dascher, C.C., Peng, S.L., Fenton M. J., Kirschning C., and Moody D. B. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2. *J Immunol* 175(3), 1758-1766. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1758.
- Ruiz, N., Falcone, B., Kahne, D., and Silhavy, T. J. (2005). Chemical conditionality: A genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell*, 121(2), 307-317.
- Sajjan, U., Thanassoulis, G., Cherapanov, V., Lu, A., Sjolín, C., Steer, B., Wu, Y. J., Rotstein, O. D., Kent, G., McKerlie, C., Forstner, J., and Downey, G. P. (2001). Enhanced susceptibility to pulmonary infection with *Burkholderia cepacia* in Cfr(-/-) mice. *Infection and immunity*, 69(8), 5138–5150. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5138-5150.2001>
- Sambrook J and Russell DR. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory
- Santos-Beneit, F. (2015) The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6: 402.
- Sawana, A., Adeolu, M., and Gupta, R.S. (2014). 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* 5, 429. doi: 10.3389/fgene.2014.00429.
- Schmerk, C. L., Bernards, M. A., and Valvano, M. A. (2011). Hopanoid production is required for low-pH tolerance, antimicrobial resistance, and motility in *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of Bacteriology*, 193(23), 6712-6723.
- Schwager, S., Agnoli, K., Köthe, M., Feldmann, F., Givskov, M., Carlier, A., and Eberl, L. (2013). Identification of *Burkholderia cenocepacia* strain H111 virulence factors using nonmammalian infection hosts. *Infection and immunity*, 81(1), 143–153. <https://doi.org/10.1128/IAI.00768-12>
- Seed, K. D., and Dennis, J. J. (2008). Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infection and immunity*, 76(3), 1267–1275. <https://doi.org/10.1128/IAI.01249-07>
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E. A., Salles, J. F., Van Elsas J. D., Faure D., Reiter B., Glick B. R., Wang-Pruski G., and Nowak, J. (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1187-1192.
- Shropshire, H., Jones, R. A., Aguilo-Ferretjans, M. M., Scanlan, D. J., and Chen, Y. (2021). Proteomics insights into the *Burkholderia cenocepacia* phosphorus stress response. *Environmental Microbiology*
- Simmons, J.S. (1926). A Culture Medium for Differentiating Organisms of Typhoid-Colon Aerogenes Groups and for Isolation of Certain Fungi: With Colored Plate. *The Journal of Infectious Diseases* 39(3), 209-214. doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/39.3.209>.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for in vivo Genetic Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Bio-Technology* 1(9), 784-791. doi: DOI 10.1038/nbt1183-784.
- Smith, E. F. (1911). *Bacteria in relation to plant diseases* (Vol. 27). Carnegie institution of Washington.

- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85(2), 229-236. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81099-5.
- Sohlenkamp C. (2019) Ornithine Lipids and Other Amino Acid-Containing Acyloxyacyl Lipids. In: Geiger O. (eds) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_13
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev* 40(1), 133-159. doi: 10.1093/femsre/fuv008.
- Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitão JH, Meisner C, Eberl L, Sá-Correia I, Döring G. Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91phox^{-/-} mice. *Cell Microbiol*. 2007 Dec;9(12):2817-25. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00998.x. Epub 2007 Jul 11. PMID: 17627623.
- Staden, R. (1989). Methods for calculating the probabilities of finding patterns in sequences. *Bioinformatics*, 5(2), 89-96.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb Ecol*. 2012 Feb;63(2):249-66. doi: 10.1007/s00248-011-9929-1. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21850446.
- Tahara, Y., and Fujiyoshi, Y. (1994). A new method to measure bilayer thickness: cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation. *Micron* 25(2), 141-149. doi: 10.1016/0968-4328(94)90039-6.
- Taylor, C.J., Anderson, A.J., and Wilkinson, S.G. (1998). Phenotypic variation of lipid composition in *Burkholderia cepacia*: a response to increased growth temperature is a greater content of 2-hydroxy acids in phosphatidylethanolamine and ornithine amide lipid. *Microbiology (Reading)* 144 (Pt 7), 1737-1745. doi: 10.1099/00221287-144-7-1737.
- Tomich M, Griffith A, Herfst CA, Burns JL, Mohr CD. Attenuated virulence of a *Burkholderia cepacia* type III secretion mutant in a murine model of infection. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1405-15. doi: 10.1128/IAI.71.3.1405-1415.2003. PMID: 12595458; PMCID: PMC148827.

- Tsuda, K., and Somssich, I.E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol* 206(3), 932-947. doi: 10.1111/nph.13286.
- Turatsinze, J.V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., and van Helden, J. (2008). Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc* 3(10), 1578-1588. doi: 10.1038/nprot.2008.97.
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K.-I., and Komagata, K. (1994). Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and Description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44(2), 235-245. doi: doi.org/10.1099/00207713-44-2-235.
- Valverde, A., Delvasto, P., Peix, A., Velazquez, E., Santa-Regina, I., Ballester, A., Rodríguez-Barrueco C., García-Balboa C., Igual J. M.(2006). *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 10), 2421-2425. doi: 10.1099/ijs.0.64498-0.
- Van Bogelen, R.A., Olson, E.R., Wanner, B.L., and Neidhardt, F.C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178: 4344–4366.
- Vandamme, P., De Brandt, E., Houf, K., Salles, J. F., van Elsas, J. D., Spilker, T., and LiPuma, J. J. (2013). *Burkholderia humi* sp. nov., *Burkholderia choica* sp. nov., *Burkholderia telluris* sp. nov., *Burkholderia terrestris* sp. nov. and *Burkholderia udeis* sp. nov.: *Burkholderia glathei*-like bacteria from soil and rhizosphere soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_12), 4707-4718.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., de Vos, P., and Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol* 25(4), 507-512. doi: 10.1078/07232020260517634.
- Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthalingam, E., LiPuma, J.J., et al. (2003). *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol* 154(2), 91-96. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00026-3.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets H., Lauwers S., Gillis M., Kersters K., and Govan J. R. W.. (1997). Occurrence of

- multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47(4), 1188-1200. doi: 10.1099/00207713-47-4-1188.
- Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., Henry D., and Speert D.P.(2000). Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol* 38(3), 1042-1047. doi: 10.1128/JCM.38.3.1042-1047.2000.
- Vandamme, P., Opelt, K., Knochel, N., Berg, C., Schonmann, S., De Brandt, E., Eber L., Falsen E., and Berg G. (2007). *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 10), 2228-2235. doi: 10.1099/ij.s.0.65142-0.
- Vanlaere, E., Lipuma, J.J., Baldwin, A., Henry, D., De Brandt, E., Mahenthiralingam, Speert D., Dowson C., and Vandamme P. al. (2008a). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 7), 1580-1590. doi: 10.1099/ij.s.0.65634-0.
- Vanlaere, E., van der Meer, J.R., Falsen, E., Salles, J.F., de Brandt, E., and Vandamme, P. (2008b). *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 2), 420-423. doi: 10.1099/ij.s.0.65451-0.
- Vences-Guzmán, M.A., Guan, Z., Escobedo-Hinojosa, W.I., Bermúdez-Barrientos, J.R., Geiger, O., and Sohlenkamp, C. (2015). Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environ Microbiol* 17(5), 1487-1496. doi: 10.1111/1462-2920.12562.
- Vences-Guzmán, M.A., Guan, Z., Ormeno-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I.M., Martínez-Romero, E., Geiger O., and Sohlenkamp C.,(2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol Microbiol* 79(6), 1496-1514. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x.

- Vermis, K., Coenye, T., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Nelis, H.J., and Vandamme, P. (2004). Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 3), 689-691. doi: 10.1099/ijs.0.02888-0.
- Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-Keller, K., and Balandreau J. (1998). *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 2, 549-563. doi: 10.1099/00207713-48-2-549.
- Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L.E., and Contreras-Moreira, B. (2018). GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. *Front Microbiol* 9, 771. doi: 10.3389/fmicb.2018.00771.
- Von Krüger, W. M. A., Humphreys, S., and Ketley, J. M. (1999). A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF043352. *Microbiology*, 145(9), 2463-2475.
- Von Krueger, W. M. A., Santos Lery, L. M., Soares, M. R., Saloum de Neves-Manta, F., Batista e Silva, C. M., da Costa Neves-Ferreira, A. G., Perales J., and Bisch, P. M. (2006). The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: Disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics*, 6(5), 1495-1511.
- Wanner, B.L. (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, pp. 1357– 1381. Washington, DC: ASM Press
- Weissenmayer, B., Gao, J.L., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2002). Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Mol Microbiol* 45(3), 721-733. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03043.x.

- Welander, P. V., Hunter, R. C., Zhang, L., Sessions, A. L., Summons, R. E., and Newman, D. K. (2009). Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of bacteriology*, 191(19), 6145-6156.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki T., Arakawa M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36(12), 1251-1275. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x.
- Yuan, Z.C., Zaheer, R., Morton, R., and Finan, T.M. (2006). Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 34(9), 2686-2697. doi: 10.1093/nar/gkl365.
- Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J. L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T. M., Raetz, C. R. H., López-Lara, I. M. and Geiger, O. (2010). *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 302-307
- Zhao, B., Lin, X., Poland, J., Trick, H., Leach, J., and Hulbert, S. (2005). A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43), 15383-15388. doi: 10.1073/pnas.0503023102.

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1: Lista de cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa usada como un control negativo en ensayos de virulencia con larvas de <i>G. mellonella</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> S17-1	Cepa usada para movilizar plásmidos conjugativos	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>B. cenocepacia</i> NG1	Mutante en el gen <i>olsB</i> con casete de resistencia a cloranfenicol <i>olsB::cat</i>	(González-Silva <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. cenocepacia</i> J2315	Miembro del complejo de <i>Burkholderia cepacia</i> (Bcc por sus siglas en inglés) patógeno oportunista de humanos con fibrosis quística	(Vandamme <i>et al.</i> , 2003)
<i>R. andropogonis</i> LMG2129	Patógeno de plantas	(Gillis <i>et al.</i> , 1995) (Compant <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. xenovorans</i> LB400	Biorremediación, producción de sideróforos, rizobacteria promotora de crecimiento, fijadora de nitrógeno	(Goris <i>et al.</i> , 2004) Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007).
<i>B. cepacia</i> LMG25416	Miembro de Bcc, patógenos de plantas	(Palleroni and Holmes, 1981) (Compant <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. vietnamiensis</i> TVV75	Miembro de Bcc y fijadora de nitrógeno	(Govindarajan <i>et al.</i> , 2006) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. unamae</i> MTI641	Biorremediación, producción de sideróforos, rizobacteria promotora de crecimiento, fijadora de nitrógeno	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004 and 2007)
<i>P. silvatlantica</i> SRMrh-20	Bacteria fijadora de nitrógeno	(Perin <i>et al.</i> , 2006) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. kururiensis</i> Kp23	Bacteria fijadora de nitrógeno y promotora de crecimiento de plantas	(Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. tropica</i> Ppe8	Bacteria fijadora de nitrógeno, producción de sideróforos, rizobacteria promotora de crecimiento, solubilización de fosfato	(Reis <i>et al.</i> , 2004) (Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. ferrariae</i> FeG101	Bacteria fijadora de nitrógeno	(Valverde <i>et al.</i> , 2006) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2015)

Continuación: Lista de cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
<i>P. ferrariae</i> FeG101	Bacteria fijadora de nitrógeno	(Valverde <i>et al.</i> , 2006) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. sordidicola</i> LMG22029	Endosimbionte del hongo fitopatógeno <i>Phanerochaete sordida</i> ,	(Lim <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. phymatum</i> STM815	Bacteria fijadora de nitrógeno y formadora de nódulos en leguminosas	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. tuberum</i> STM678	Formador de nódulos y fijación de nitrógeno en <i>Cyclopia genistoides</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002) Elliott <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. nodosa</i> Br3437	Bacteria fijadora de nitrógeno	(Chen <i>et al.</i> , 2005 and 2007) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. graminis</i> C4D1MT	Miembro del grupo de bacterias beneficiosas para las plantas y el medio ambiente (PBE por sus siglas en inglés)	(Viallard <i>et al.</i> , 1998) Suárez-Moreno <i>et al.</i> , 2012
<i>P. sacchari</i> LMG19450	Miembro del grupo PBE, degrada compuestos aromáticos polihidroxicanoatos (PHA)	(Brämer <i>et al.</i> , 2001) Suárez-Moreno <i>et al.</i> , 2012
<i>P. caribensis</i> MWAP64T	Miembro del grupo PBE, simbiote de leguminosas y formadora de nódulos	(Achouak <i>et al.</i> , 1999) Suárez-Moreno <i>et al.</i> , 2012
<i>P. phytofirmans</i> PsJN	Promotora de crecimiento de plantas, incrementa la resistencia a estrés abióticos en plantas y control biológico de patógenos	(Barka <i>et al.</i> , 2006) (Sessitsch <i>et al.</i> , 2005) (Eberl and Vandamme, 2016)
<i>C. glathei</i> LMG14190	Bacteria del suelo y de la rizosfera	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997) Vandamme <i>et al.</i> , 2013) Peeters <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. fungorum</i> LMG16225	Endosimbionte del escarabajo <i>Harpalus pensylvanicus</i> biocontrolador de plagas de plantas; endosimbionte del hongo fitopatógeno <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Coenye <i>et al.</i> , 2001) Lundgren <i>et al.</i> (2007)
<i>P. caledonica</i> LMG19076	Miembro del grupo PBE	(Coenye <i>et al.</i> , 2001) Suárez-Moreno <i>et al.</i> , 2012
<i>P. hospita</i> LMG20598	Grupo de beneficiosos para las plantas y el medio ambiente (PBE)	(Goris <i>et al.</i> , 2002)

Continuación: Lista de cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
<i>B. stabilis</i> LMG14294	Miembro de Bcc y fijadora de nitrógeno	(Vandamme <i>et al.</i> , 2000) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. dolosa</i> LMG18943	Miembro de Bcc	(Vermis <i>et al.</i> , 2004) (Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018)
<i>B. gladioli</i> LMG2216	Patógeno de plantas	(Clode <i>et al.</i> , 1999) (Compant <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. ginsengisoli</i> LMG24044	Miembro del grupo PBE	(Kim <i>et al.</i> , 2006) (Suárez-Moreno <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. multivorans</i> LMG13010	Miembro de Bcc y fijadora de nitrógeno	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. briophila</i> LMG23644	Actividad antifúngica contra fitopatógenos y promotoras del crecimiento de las plantas	(Vandamme <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. latens</i> LMG24064	Miembro de Bcc	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008a)
<i>P. megapolitana</i> LMG23650	Actividad antifúngica contra fitopatógenos y promotoras del crecimiento de las plantas	(Vandamme <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. sartisoli</i> LMG24000	Miembro del grupo PBE, degrada compuestos aromáticos polihidroxicanoatos (PHA)	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008b) (Suárez-Moreno <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. seminalis</i> LMG24067	Miembro de Bcc	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008a)
<i>T. caryophylli</i> LMG2155	Patógeno de plantas	(Glagoleva <i>et al.</i> , 1996) (Compant <i>et al.</i> , 2008) (Estrada-De Los Santos <i>et al.</i> , 2018)
<i>B. plantarii</i> LMG9035	Patógeno de plantas	(Azegami <i>et al.</i> , 1987; Urakami <i>et al.</i> , 1994) (Compant <i>et al.</i> , 2008)
Plásmidos		
pRK404.pET9a	Vector vacío, plásmido pRK404 de amplio rango de hospederos fusionado con el vector de expresión pET9a	Este trabajo
pRK404.pET9a.olsF	Vector con el gen <i>olsF</i> de <i>Serratia proteamaculans</i>	En este trabajo

10.2 Anexo 2: Proteínas homólogas a *N*-aciltransferasa OlsB probablemente responsable del primer paso de la síntesis de OLs en *Burkholderia* s.l

Especie	Proteína	Anotación	% identidad	% cobertura
<i>Paraburkholderia</i>				
<i>P. xenovorans</i>	WP_011489239.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	81.34	100
<i>P. phymatum</i>	WP_012400299.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	83.58	100
<i>P. phytofirmans</i>	WP_012433830.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.60	100
<i>P. graminis</i>	WP_006051995.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	81.72	100
<i>P. nodosa</i>	WP_069262530.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	81.72	100
<i>P. ferrariae</i>	WP_028228840.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	79.85	100
<i>P. fungorum</i>	WP_074764827.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.60	100
<i>P. sacchari</i>	WP_035522790.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	81.34	100
<i>P. caribensis</i>	WP_035990234.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	81.34	100
<i>P. tropica</i>	WP_065061356.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	79.85	100
<i>P. unamae</i>	WP_112171208.1	ornithine-acyl[acyl carrier protein] <i>N</i> -acetyltransferase	82.84	100
<i>P. caledonica</i>	WP_087754221.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	82.46	100
<i>P. tuberum</i>	WP_018421228.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	82.84	100
<i>P. sartisoli</i>	WP_090529352.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	83.96	100
<i>P. megapolitana</i>	WP_091020402.1	ornithine-acyl[acyl carrier protein] <i>N</i> -acetyltransferase	83.58	100
<i>P. kururiensis</i>	WP_017776192.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	81.34	100
<i>P. ginsengisoli</i>	WP_042322181.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.97	100

Continuación tabla: Proteínas homólogas a *N*-aciltransferasa OlsB probablemente responsable del primer paso de la síntesis de Ols en *Burkholderia* s.l

Especie	Proteína	Anotación	% identidad	% cobertura
<i>Caballeronia</i>				
<i>C. jiangsuensis</i>	KAK42840.1	hypothetical protein	79.63	100
<i>C. grimmiae</i>	WP_035959540.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	79.10	100
<i>C. zhejiangensis</i>	WP_008342022.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.74	100
<i>C. zhejiangensis</i>	WP_008342022.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.74	100
<i>C. glathei</i>	WP_035925297.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	78.52	100
<i>C. cordobensis</i>	WP_014191907.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.00	100
<i>C. sordidicola</i>	WP_075357129.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.00	100
<i>C. humi</i>	WP_087667467.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.95	100
<i>C. choica</i>	WP_087642766.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	80.08	96
<i>C. udeis</i>	TWG58748.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	77.42	92
<i>Robbsia</i>				
<i>R. andropogonis</i>	WP_024901431.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	62.88	85
<i>Trinickia</i>				
<i>T. caryophylli</i>	WP_085224495.1	GNAT family <i>N</i> -acetyltransferase	83.96	100

10.3 Anexo 3: Artículo “Ornithine lipids role in *Burkholderia* spp pathogenicity”

Córdoba-Castro, L. A., Salgado-Morales, R., Torres, M., Martínez-Aguilar, L., Lozano, L., Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Dantán-González, E., Serrano, M., and Sohlenkamp, C. (2021). *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 610932.

<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.610932>



Ornithine Lipids in *Burkholderia* spp. Pathogenicity

Luz América Córdoba-Castro^{1,2}, Rosalba Salgado-Morales³, Martha Torres¹, Lourdes Martínez-Aguilar¹, Luis Lozano¹, Miguel Ángel Vences-Guzmán¹, Ziqiang Guan⁴, Edgar Dantán-González³, Mario Serrano¹ and Christian Sohlenkamp^{1*}

¹ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ² Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas, Cuernavaca, Mexico, ³ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, NC, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Heidi Vitrac,
University of Texas Health Science
Center at Houston, United States

Reviewed by:

Surasakdi Wongratanacheewin,
Khon Kaen University, Thailand
Dwijendra K. Gupta,
Jai Prakash Vishwavidyalaya, India

*Correspondence:

Christian Sohlenkamp
chsohlen@ccg.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 27 September 2020

Accepted: 07 December 2020

Published: 05 January 2021

Citation:

Córdoba-Castro LA, Salgado-Morales R, Torres M, Martínez-Aguilar L, Lozano L, Vences-Guzmán MÁ, Guan Z, Dantán-González E, Serrano M and Sohlenkamp C (2021) Ornithine Lipids in *Burkholderia* spp. Pathogenicity. *Front. Mol. Biosci.* 7:610932. doi: 10.3389/fmolb.2020.610932

The genus *Burkholderia* sensu lato is composed of a diverse and metabolically versatile group of bacterial species. One characteristic thought to be unique for the genus *Burkholderia* is the presence of two forms each (with and without 2-hydroxylation) of the membrane lipids phosphatidylethanolamine (PE) and ornithine lipids (OLs). Here, we show that only *Burkholderia* sensu stricto strains constitutively form OLs, whereas all other analyzed strains belonging to the *Burkholderia* sensu lato group constitutively form the two forms of PE, but no OLs. We selected two model bacteria to study the function of OL in *Burkholderia* sensu lato: (1) *Burkholderia cenocepacia* wild-type which constitutively forms OLs and its mutant deficient in the formation of OLs and (2) *Robbsia andropogonis* (formerly *Burkholderia andropogonis*) which does not form OL constitutively, and a derived strain constitutively forming OLs. Both were characterized under free-living conditions and during pathogenic interactions with their respective hosts. The absence of OLs in *B. cenocepacia* slightly affected bacterial growth under specific abiotic stress conditions such as high temperature and low pH. *B. cenocepacia* lacking OLs caused lower mortality in *Galleria mellonella* larvae while *R. andropogonis* constitutively forming OLs triggers an increased formation of reactive oxygen species immediately after infection of maize leaves, suggesting that OLs can have an important role during the activation of the innate immune response of eukaryotes.

Keywords: pathogenicity, reactive oxygen species, *Burkholderia cenocepacia*, ornithine lipids, *Robbsia andropogonis*

INTRODUCTION

One major function of amphiphilic lipids is to form the lipid bilayer of membranes which serve as semipermeable barriers and limit a cell. The best-known examples are glycerophospholipids such as phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL), and phosphatidylcholine (PC). However, depending on the class of organism and the growth conditions, other lipids such as cholesterol, hopanoids, sphingolipids, sulpholipids, glycolipids, betaine lipids, or ornithine lipids (OLs), can be present in membranes in different concentrations. Especially prokaryotic membranes have been shown to contain a large diversity of lipids, some of which are only formed by specific groups of bacteria or under specific stress conditions (Geiger et al., 2010; Sohlenkamp and Geiger, 2016). OLs are phosphorus-free acyloxyacyl aminolipids

which have been found only in bacteria and are apparently absent in eukaryotes or archaea. Their basic structure is composed of a 3-hydroxylated fatty acid linked by an amide bond to the α -amino group of ornithine and a second fatty acid linked by an ester bond to the 3-hydroxyl group of the first fatty acid (Geiger et al., 2010; Sohlenkamp and Geiger, 2016). These lipids can be formed by the OlsBA acyltransferases originally described in *Sinorhizobium meliloti* (Weissenmayer et al., 2002; Gao et al., 2004) or by the bifunctional acyltransferase OlsF first described in *Serratia proteamaculans* (Vences-Guzmán et al., 2015). The OlsBA pathway is present in several α - and β -proteobacteria, in a few γ -proteobacteria and several actinomycetes. Genes encoding OlsF are present in a few γ -proteobacteria, δ - and ϵ -proteobacteria and in bacteria belonging to the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) group. Based on the analysis of genomic DNA sequences, it has been estimated that about 50% of the bacterial species can form OLs at least under specific growth conditions (Vences-Guzmán et al., 2015; Sohlenkamp and Geiger, 2016). Interestingly, in some bacteria, for example *S. meliloti* or *Pseudomonas* sp., OLs are only formed under phosphate-limiting conditions (Minnikin and Abdollahzadeh, 1974; Geiger et al., 1999; López-Lara et al., 2005), while in other bacteria, like many species of the genus *Burkholderia* or in *Rhizobium tropici* CIAT899, OLs are formed constitutively (Rojas-Jiménez et al., 2005; González-Silva et al., 2011). In some examples, the presence of OLs or an increased accumulation of OLs have been related to resistance to abiotic stress conditions or to a function during interactions with eukaryotic hosts like an increased persistence (Kim et al., 2018).

The genus *Burkholderia* sensu lato (s.l.) contains more than 100 diverse and versatile bacterial species, which can be found in different environments such as soil or fresh water, but also frequently in association with a number of eukaryotic hosts including humans, animals (vertebrates and invertebrates), plants or fungi. These bacteria-host interactions can be beneficial, pathogenic or both (Depoorter et al., 2016; Estrada-de Los Santos et al., 2018). In recent years, *Burkholderia* s.l. was divided into several genera and it is currently classified into *Burkholderia sensu stricto* (s.s.), *Paraburkholderia* (Sawana et al., 2014), *Caballeronia* (Dobritsa and Samadpour, 2016), *Robbsia* (Rojas-Rojas et al., 2019) and the recently proposed additional genera *Mycetohabitans* and *Trinickia* (Estrada-de Los Santos et al., 2018).

One characteristic that was thought to be unique and common to the species of the genus *Burkholderia* s.l. was the presence of two forms of PE and OLs (Yabuuchi et al., 1992). However, when the membrane lipids of a few strains were examined in detail, OLs were present only in some species of the genus (Palleroni, 2015), but were absent in others such as *B. andropogonis* (now classified as *R. andropogonis*). The latter synthesizes PE and hydroxylated PE (2-OH-PE), but lacks OLs and hydroxylated OL (2-OH-OL). The biological roles played by OLs in the genus *Burkholderia* s.l. are not clear yet. As in other bacterial groups, the presence of hydroxylated OLs might be part of the response to environmental stresses. The amount of hydroxylated lipids (2OH-PE and 2OH-OL) was increased in *B. cepacia* strain NCTC 10661 when exposed to a temperature of 42°C, which can be interpreted as a response to thermal stress (Taylor et al., 1998).

B. cenocepacia J2315 formed a new hydroxylated OL when the strain was exposed to pH 4.0 (González-Silva et al., 2011). Also, rhamnolipids and OLs from *B. pseudomallei* strain K96243 induced an immune response in goats, inducing IFN- γ required for the expression of secreted cytokines (González-Juarrero et al., 2013). Finally, antibacterial activity against *Bacillus megaterium* and *Escherichia coli* has been ascribed to OLs in *B. gladioli* pv. *agaricola* strain ICMP 11096 (Elshafie et al., 2017).

In this study, we wanted to understand the function of OLs in the genus *Burkholderia* s.l. First, we studied the membrane lipid compositions of a representative set of bacterial species of this group to find out how widespread the presence of OLs and the hydroxylated forms of PE and OL is. *B. cenocepacia* and *R. andropogonis* were selected as models for the second part of this study. *B. cenocepacia* wild-type forms OLs in a constitutive manner and was compared to a mutant unable to synthesize OLs. *R. andropogonis* does not form OLs when grown in normal complex medium and we compared it to a constructed *R. andropogonis* strain constitutively forming OLs. The absence of OLs affected the growth of *B. cenocepacia* under acid stress conditions and it decreased its virulence in a *Galleria mellonella* L (Lepidoptera: Pyralidae) model. The constitutive presence of OLs in *R. andropogonis* caused a stimulation of the plant innate immune response by increasing the production of reactive oxygen species. Both observations highlight the importance of OLs during the interactions between bacteria and their hosts.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in the Supporting Material (**Supplementary Table 1**). Bacteria were grown in Luria-Bertani broth (LB; 5 g yeast extract, 10 g peptone, 10 g NaCl per liter and adding 1.5 % agar (w/v) for solid medium) or in a minimal medium designed for growth under phosphate-limiting conditions. The composition of the latter was based on M9 medium (Miller, 1972) and sodium citrate medium (Simmons, 1926) (2 g Sodium succinate dibasic hexa-hydrated, 1 g NH₄Cl, 0.2 g MgSO₄ × 7H₂O, 0.5 g NaCl and 0.1 M K-phosphate buffer prepared with K₂HPO₄ and KH₂PO₄). Bacterial growth was determined by measuring the optical density of the cultures at 620 nm (OD₆₂₀). When required, antibiotics were added to the medium at the following concentrations: 20 μ g/ml tetracycline and 50 μ g/ml kanamycin for *R. andropogonis* (LMG2129.pRK404.pET9a and LMG2129.pRK404.pET9a.olsF) and 300 μ g/ml chloramphenicol for *B. cenocepacia* mutant NG1.

Construction of the Phylogenetic Tree

The GET_HOMOLOGUES program (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) was used to obtain families of orthologs from 43 *Burkholderia* s.l. genomes that were downloaded from the NCBI RefSeq database (**Supplementary Table 2**). In this analysis, each ortholog family had 43 genes. Subsequently, with the help of the GET_PHYLOMARKERS program (Vinuesa et al., 2018), the families of orthologs were analyzed to obtain optimal markers for

phylogenomic reconstruction. Finally, with the PHYML program (Guindon et al., 2010), the phylogenetic tree was constructed based on the concatenated alignments of ortholog gene families using the GTR + G evolutionary model.

Determination of the Membrane Lipid Composition

The lipid compositions of bacterial strains were determined following labeling with [^{14}C]acetate (Amersham Biosciences). Cultures (1 ml) of *Burkholderia* s.l. strains were inoculated from precultures grown in the same medium. After addition of 1 μCi of [^{14}C]acetate (60 mCi mmol $^{-1}$) to each culture, the cultures were incubated overnight. Cells were harvested by centrifugation, washed with 500 μl water once, resuspended in 100 μl water, and then lipids were extracted according to Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Aliquots of the lipid extracts were spotted on high performance TLC silica gel 60 plates (Merck, Poole, UK) and separated in two dimensions using chloroform/methanol/water (16:4:1, v/v/v) as a mobile phase for the first dimension and chloroform/methanol/acetic acid (15:3:2, v/v/v) as a mobile phase for the second dimension (Tahara and Fujiyoshi, 1994). To visualize membrane lipids, developed two-dimensional TLC plates were exposed to autoradiography film (Kodak) or to a PhosphorImager screen (Amersham Biosciences). The individual lipids were quantified using ImageQuant software (Amersham Biosciences) (Vences-Guzmán et al., 2011).

Construction of a *R. andropogonis* Strain Constitutively Producing Ornithine Lipids

The bifunctional acyltransferase OlsF was expressed in the type strain *R. andropogonis* LMG2129. The plasmid pRK404.pET9a.OlsF containing the *olsF* gene from *S. proteamaculans* was mobilized by conjugal transfer from *E. coli* S17-1 into the recipient strain *R. andropogonis* LMG2129 (Simon et al., 1983). Precultures with an OD₆₂₀ of 0.5 of donor and recipient cells were harvested by centrifugation and washed twice with LB medium to remove residual antibiotics. Subsequently, the cell suspensions were mixed, dropped onto LB agar plates without antibiotics and incubated overnight at 30°C. The cells were scraped from the plates, suspended, and serial aliquots were plated on sodium citrate agar (Simmons, 1926) supplemented with tetracycline and kanamycin. Incubation continued for 2–5 days to select for the presence of the plasmid in the transconjugants. Transconjugant colonies were transferred to plates with LB medium supplemented with tetracycline and kanamycin and were grown at 30°C for 3 days. Strains were conserved in glycerol at a final concentration of 30% (w/v) and were stored at –80°C.

Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis of Lipid Samples

The three different *R. andropogonis* strains (LMG2129.pRK404.pET9a.olsF-expressing the acyltransferase OlsF, LMG2129-wild-type, and LMG2129.pRK404.pET9a-empty vector control) were grown to an OD of 1.2 at 620 nm in LB medium or in LB medium with tetracycline in case of the

plasmid-harboring strains. Cells were harvested by centrifugation and lipids were extracted according to Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Normal phase LC-ESI MS of the lipid extracts was performed using an Agilent 1200 Quaternary LC system coupled to a high resolution TripleTOF5600 mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA). Chromatographic separation was performed on an Ascentis Silica HPLC column, 5 μm , 25 cm \times 2.1 mm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Lipids were eluted with mobile phase A, consisting of chloroform/methanol/aqueous ammonium hydroxide (800:195:5, v/v/v), mobile phase B, consisting of chloroform/methanol/water/aqueous ammonium hydroxide (600:340:50:5, v/v/v/v) and mobile phase C, consisting of chloroform/methanol/water/aqueous ammonium hydroxide (450:450:95:5, v/v/v/v), over a 40 min-long run, performed as follows: 100% mobile phase A was held isocratically for 2 min and then linearly increased to 100% mobile phase B over 14 min and held at 100% B for 11 min. The mobile phase composition was then changed to 100% mobile phase C over 3 min and held at 100% C for 3 min, and finally returned to 100% A over 0.5 min and held at 100% A for 5 min. The LC eluent (with a total flow rate of 300 $\mu\text{l}/\text{min}$) was introduced into the ESI source of the high resolution TF5600 mass spectrometer. MS and MS/MS were performed in negative ion mode, with the full-scan spectra being collected in the m/z 200–2,000 range. The MS settings are as follows: ion spray voltage (IS) = –4,500 V (negative ion mode), curtain gas (CUR) = 20 psi, ion source gas 1 (GS1) = 20 psi, de-clustering potential (DP) = –55 V, and focusing potential (FP) = –150 V. Nitrogen was used as the collision gas for tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments. Data analysis was performed using Analyst TF1.5 software (Sciex, Framingham, MA).

Identification of Putative Pho Boxes in *Burkholderia sensu lato*

The program INFO-GIBBS (Defrance and van Helden, 2009) was used for the construction of a position specific scoring matrix (PSSM) matrix. Pho box sequences from *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, and *Mesorhizobium loti* identified in the promoter sequences of genes involved in the biosynthesis of glycolipid and OL membrane lipids were used (**Supplementary Table 3**) (Yuan et al., 2006; Geske et al., 2013). The following parameters were used: Matrix length was fixed to 18 bp, the expected number of sites per sequence was one, and the number of motifs to extract was one. As background model the sequences upstream of genes in the *Burkholderiaceae* taxon were used and the Markov order used was one. Then the program MATRIX-SCAN (Turatsinze et al., 2008) was used to search for putative Pho boxes in the regions upstream of the genes encoding OlsB homologs in the genomes of the 43 *Burkholderia* s.l. species analyzed. This search was performed for both strands.

Growth Experiments Under Abiotic Stress Conditions

Pre-cultures of *R. andropogonis* and *B. cenocepacia* were grown at 30°C at 250 rpm overnight in LB medium supplemented with the respective antibiotics if required. Cells were harvested

by centrifugation at 6,000 rpm and washed with 1% NaCl (w/v) solution, except for the salinity tests for which cells were washed in LB medium without salt. The optical density data collection was measured in the Synergy 2.0 Biotek, measuring every 3 h for 24 h, performing 3 independent repetitions. For temperature stress experiments, the cultures were grown in LB medium in 96-well microplates, inoculated with an OD₆₂₀ of 0.05 and incubated at 30, 37, or 42°C. For acid stress experiments, the cultures were grown in 96-well microplates in LB medium adjusted to pH 4 buffered with 50 mM Homopipes [Homopiperazine-*N,N'*-bis-2-(ethanesulfonic acid)] or to pH 7 with 50 mM Pipes [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)]. Cultures were inoculated at an OD₆₂₀ of 0.05 and incubated at 30°C with medium shaking. For salinity stress experiments, the cultures were grown in 96-well microplates in LB medium with salt concentrations of 0.05, 0.5, and 1 M NaCl. Cultures were inoculated at an OD₆₂₀ of 0.05 and incubated at 30°C with medium shaking.

***B. cenocepacia* Virulence Assays Using *Galleria mellonella* Larvae**

The virulence of the *B. cenocepacia* strains was evaluated in *G. mellonella* larvae. Starting from bacterial cultures grown to an OD₆₂₀ of 1, serial dilutions were made in 10 mM MgSO₄ that corresponded to 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , and 2×10^4 CFU/ml. As negative controls, a simple puncture of the larvae, the injection of saline solution, or the injection of *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) at 3×10^6 CFU/ml were used. This strain is innocuous for *G. mellonella* (Algoribi et al., 2014; Jonsson et al., 2017). Assays were carried out using the injection method with *G. mellonella* larvae in the sixth stage and 10 μ l bacterial suspensions were injected into the dorsal region of the third anterior abdominal segment of the larvae using insulin syringe of 31G (gauge). Each bacterial suspension was tested using 10 insect larvae placed individually in 55 mm petri dishes without diet and incubated at 30°C. The mortality was evaluated every 24 h for 5 days after injection. Five independent experiments were performed. For statistical testing, experimental data ($n = 50$) were plotted using the Kaplan-Meier method and differences in survival were calculated by using the log-rank test with a $p \leq 0.05$ indicating statistical significance. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Infiltration of Maize Plants With *R. andropogonis* Strains

R. andropogonis assays were carried out in corn plants using a native maize variety (“criollo de Hidalgo”). Seed sterilization and germination were performed as previously described (Matus-Acuña et al., 2018), and sterilized seeds were incubated for 48 h at 30°C in the dark. Subsequently, germinated seedlings were transplanted to pots containing sterile vermiculite and were grown under greenhouse conditions irrigating every 3 or 4 days with water or Fahraeus solution for 40 days before infection with the bacterial strains (Fahraeus, 1957). Maize leaves were infiltrated on the bottom of the leaves

with a 1 ml needleless syringe containing a 1×10^5 CFU/ml bacterial suspension (corresponding to an OD₆₂₀ of about 0.02) of the wild-type strain LMG2129 or the transconjugants (LMG2129.pRK404.pET9a, LMG2129.pRK404.pET9a.olsF). As mock control a 10 mM MgCl₂ solution was used. Approximately 10 μ l were infiltrated into the leaf at each site. Forty healthy 40 day-old maize plants were used. Ten potted plants were inoculated with each isolate and the development of symptoms was followed for 15 days. The bacteria were isolated using a methodology previously described (Katagiri et al., 2002). Briefly, treated maize leaves were macerated with pistil, washed with 10 mM MgCl₂ twice and finally resuspended in LB medium. The suspension was serially diluted, plated on LB medium and incubated at 30°C for 72 h. Colonies were counted and colony forming units determined. For statistical analyses the one-tailed *t*-test was used with a $p \leq 0.05$ indicating statistical significance. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

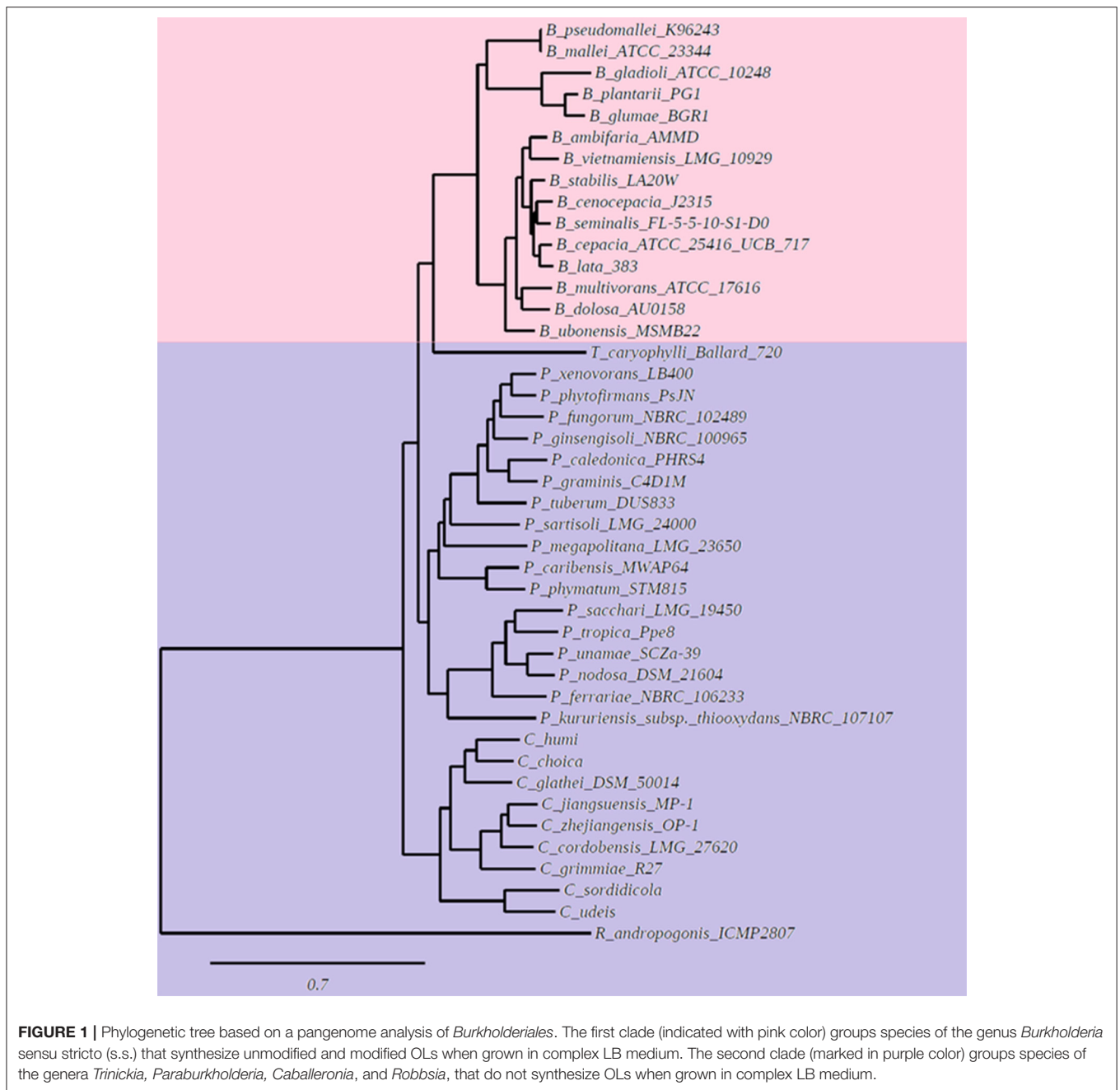
Detection of Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS were detected using the fluorescent probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com) as previously described (L'Haridon et al., 2011). Leaves were rapidly rinsed in DCFH-DA medium and observed under UV light with a LEICA DMR fluorescence microscope (Leica, www.leica.com). Microscope images were saved as TIFF files and processed for quantification of the pixels with Image J version 1.51 (NIH). For statistical analyses the one-tailed *t*-test was used with a $p \leq 0.05$ indicating statistical significance. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

***Burkholderia sensu lato* Strains and Their Membrane Lipid Compositions: Only *sensu strictu* Strains Form OL Constitutively**

We wanted to study if there is a correlation between the membrane lipid composition of the species and their phylogenetic positions within the *Burkholderia sensu lato* (s.l.) supergenus. An analysis performed with the genomes of 43 *Burkholderia* s.l. species indicated that 780 gene families, representing groups of orthologs, were present in each of the 43 genomes. Next, using the Get Phylomarkers software (Vinuesa et al., 2018), 411 families of orthologs were considered optimal markers for a phylogenomic reconstruction of the *Burkholderia* s.l. supergenus. The phylogeny showed that *Burkholderia* s.l. was separated into five different lineages (Figure 1). These corresponded to *Burkholderia s.s.*, *Trinickia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, and *Robbsia*. We analyzed the membrane lipid composition of 35 *Burkholderia* s.l. strains to which we had access in the laboratory when they were grown in complex medium. Liquid cultures of the selected strains were grown, lipids were labeled with [¹⁴C]acetate, extracted and separated by two dimensional



thin-layer chromatography (**Figure 2**, six representative strains are shown). In all strains, the lipids phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL), phosphatidylethanolamine (PE), and 2-hydroxylated PE (2OH-PE) were detected. However, under the evaluated growth condition OLs be it unmodified and/or modified were only detected in the strains of the genus *Burkholderia* s.s. (**Figures 2A,B**). The species included in the *Burkholderia* s.s. clade (indicated in pink, **Figure 1**), are generally species that correspond to pathogens of humans, plants or animals (Depoorter et al., 2016). The clade that groups the genera *Trinickia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, and *Robbsia* (marked

in purple, **Figure 1**) includes species that do not synthesize OLs when grown in complex medium, and several of these bacteria are plant beneficial and environmental bacteria, or can be involved in an N₂-fixing symbiosis with legume plants (Estrada-de Los Santos et al., 2018). An exception is the genus *Robbsia* which is formed by plant pathogens.

Bacterial species belonging to the genus *Burkholderia* form OLs by the OlsBA pathway. The presence of a gene encoding an OlsB homolog is considered a good indicator for the capacity of the bacteria to form OLs (Geiger et al., 2010). We wanted to know if the absence of OLs in the species classified as *Paraburkholderia*,

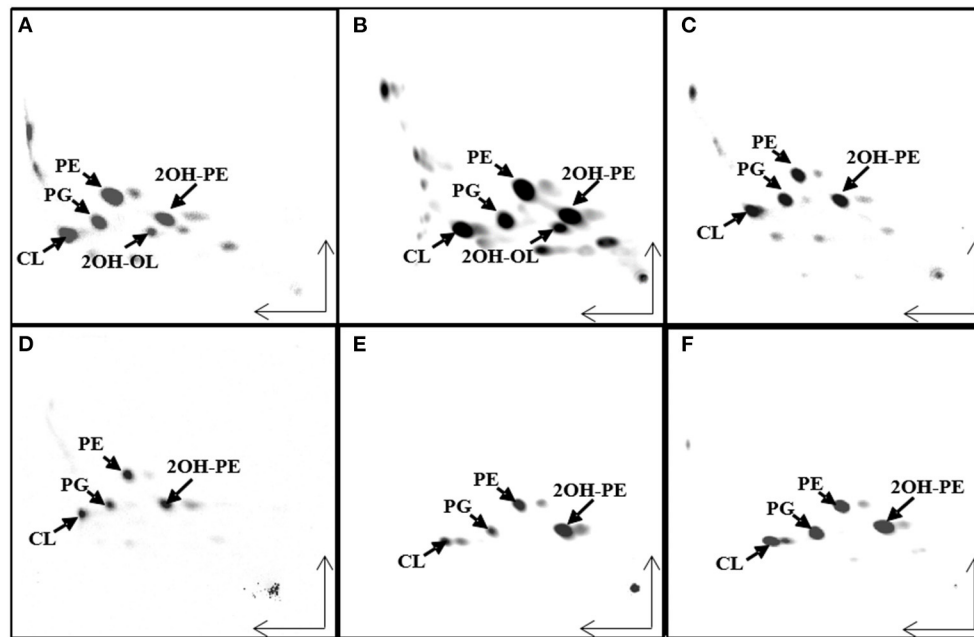
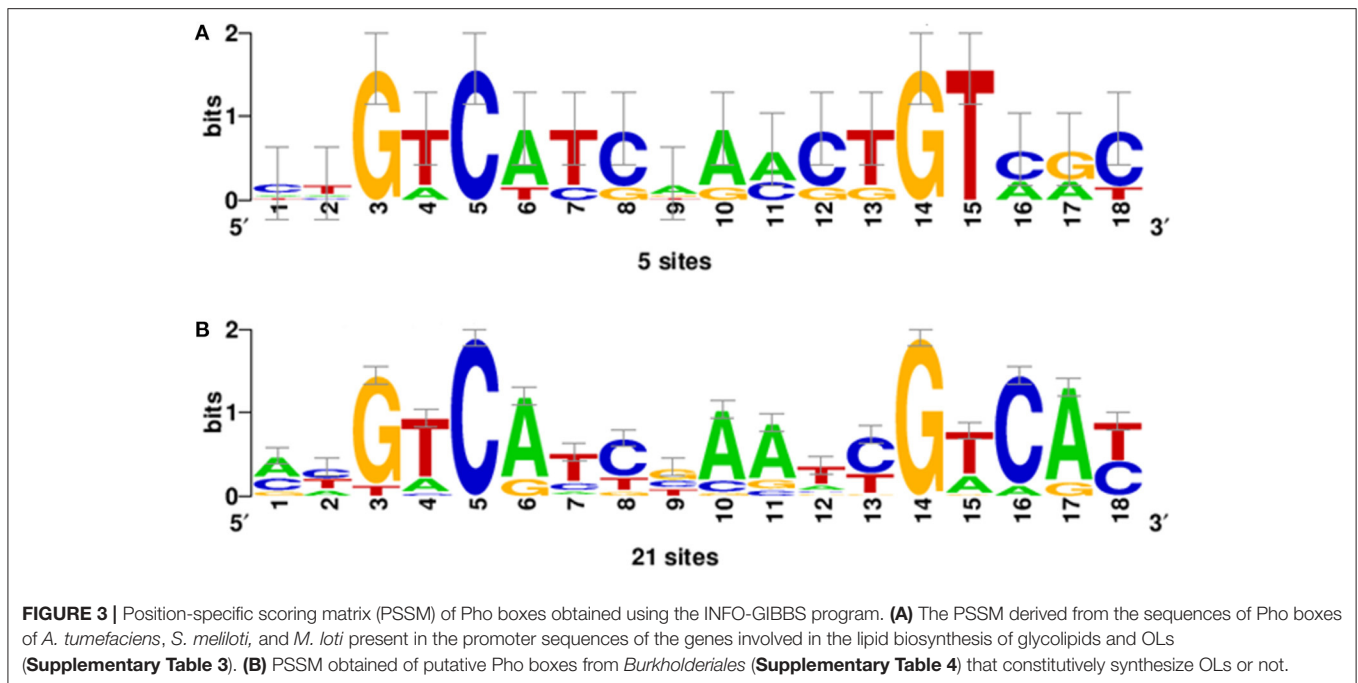


FIGURE 2 | Ornithine lipid (OL) synthesis is constitutive in strains belonging to the genus *Burkholderia* sensu stricto (s.s.), but not in the other analyzed strains. Separation of [^{14}C]acetate-labeled lipids by two dimensional thin-layer chromatography (TLC) from different *Burkholderia* sensu lato (s.l.) strains grown in LB medium at 30°C. (A) *Burkholderia cenocepacia* J2315, (B) *B. dolosa*, (C) *Paraburkholderia sortisoli*, (D) *P. xenovorans*, (E) *Caballeronia glathei*, and (F) *Robbsia andropogonis*. CL, cardiolipin; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; 2OH-PE, hydroxylated phosphatidylethanolamine; OL, unmodified ornithine lipid; 2OH-OL, ornithine lipid 2-hydroxylated within ester-bound fatty acid.

Caballeronia, *Robbsia*, *Mycetohabitans*, and *Trinickia* was caused by the absence of a gene encoding an OlsB homolog or if it was due to a difference in gene regulation. We searched the genomes of *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Mycetohabitans*, and *Trinickia* species for genes encoding homologs of the *N*-acyltransferase OlsB (Bcal1281) responsible for the first step in OL synthesis in *B. cenocepacia* (González-Silva et al., 2011). We found that all analyzed species possessed a gene coding for an OlsB homolog in their genome and that the genomic context around the respective genes was usually conserved in *Burkholderia* s.l. (data not shown). Bacterial species such as *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas diminuta*, *Desulfovibrio alaskensis*, *Serratia proteamaculans*, and *Vibrio cholerae* do not form OL when the bacteria are grown in complex media (which are usually rich in phosphate), but induce the synthesis of OLs or/and other phosphorus-free lipids under phosphate-limiting growth conditions and replace some of their membrane phospholipids (Minnikin and Abdolrahimzadeh, 1974; Benning et al., 1995; Geiger et al., 1999; Lewenza et al., 2011; Bosak et al., 2016; Barbosa et al., 2018). In some of these bacteria, gene expression in response to phosphate limitation is known to be regulated by the two-component system PhoBR. At low phosphate concentrations, the response regulator PhoB is phosphorylated and binds to a highly conserved nucleotide motif called the Pho box in the promoter region of regulated genes (Geske et al., 2013).

We would expect to find Pho boxes preceding the homologs of *olsB* genes if the synthesis of OLs can be induced at low phosphate concentrations and is regulated by PhoB. Using the sequences of identified Pho boxes from *Agrobacterium tumefaciens*, *S. meliloti*, and *Mesorhizobium loti* (Yuan et al., 2006; Geske et al., 2013) present in the promoter sequences of the genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of glycolipids and OLs formed under conditions of phosphate limitation (Supplementary Table 3), a consensus sequence was obtained (Figure 3A). The genomes of 43 *Burkholderia* s.l. species were searched for the presence of Pho boxes upstream of the genes encoding OlsB homologs. Putative Pho boxes were detected in 21 of the analyzed genomes (Supplementary Table 4) and corresponded to fourteen species of the genus *Paraburkholderia*, two species of the genus *Caballeronia* (both genera do not constitutively synthesize OLs), and five species corresponding to the genus *Burkholderia* s.s. that constitutively synthesize OLs. Due to the evolutionary distance between α -proteobacteria and β -proteobacteria it is possible that we missed the Pho boxes in some genomes, but alternatively, OL formation might be regulated differently in these species. Using the putative Pho boxes of *Burkholderiales* (Supplementary Table 4), a new matrix was obtained (Figure 3B). When searching with this new matrix, putative Pho boxes were detected in the upstream regions of the genes encoding OlsB homologs in all 43 *Burkholderia* s.l. genomes (data not shown).



OlsF Expression Causes Constitutive OL Formation in *Robbsia andropogonis*

OL synthesis is constitutive in the *Burkholderia* s.s., but probably inducible in the other genera forming part of *Burkholderia* s.l., and an open question is if the presence or absence of OL affects the abiotic stress resistance of the bacteria and if it affects how the bacteria interact or how they are perceived by their eukaryotic hosts. Therefore, we wanted to study two pairs of strains either forming OLs or not, under abiotic stress conditions and during interactions with their eukaryotic hosts: (1) *B. cenocepacia* J2315 (Vandamme et al., 2003), which forms OL constitutively and its corresponding mutant deficient in OL formation NG1 (González-Silva et al., 2011) and (2) *R. andropogonis* (formerly *B. andropogonis*) which does not form OL constitutively and *R. andropogonis* constitutively forming OLs due to the presence of a plasmid harboring the gene *olsF* from *S. proteamaculans* (Vences-Guzmán et al., 2015).

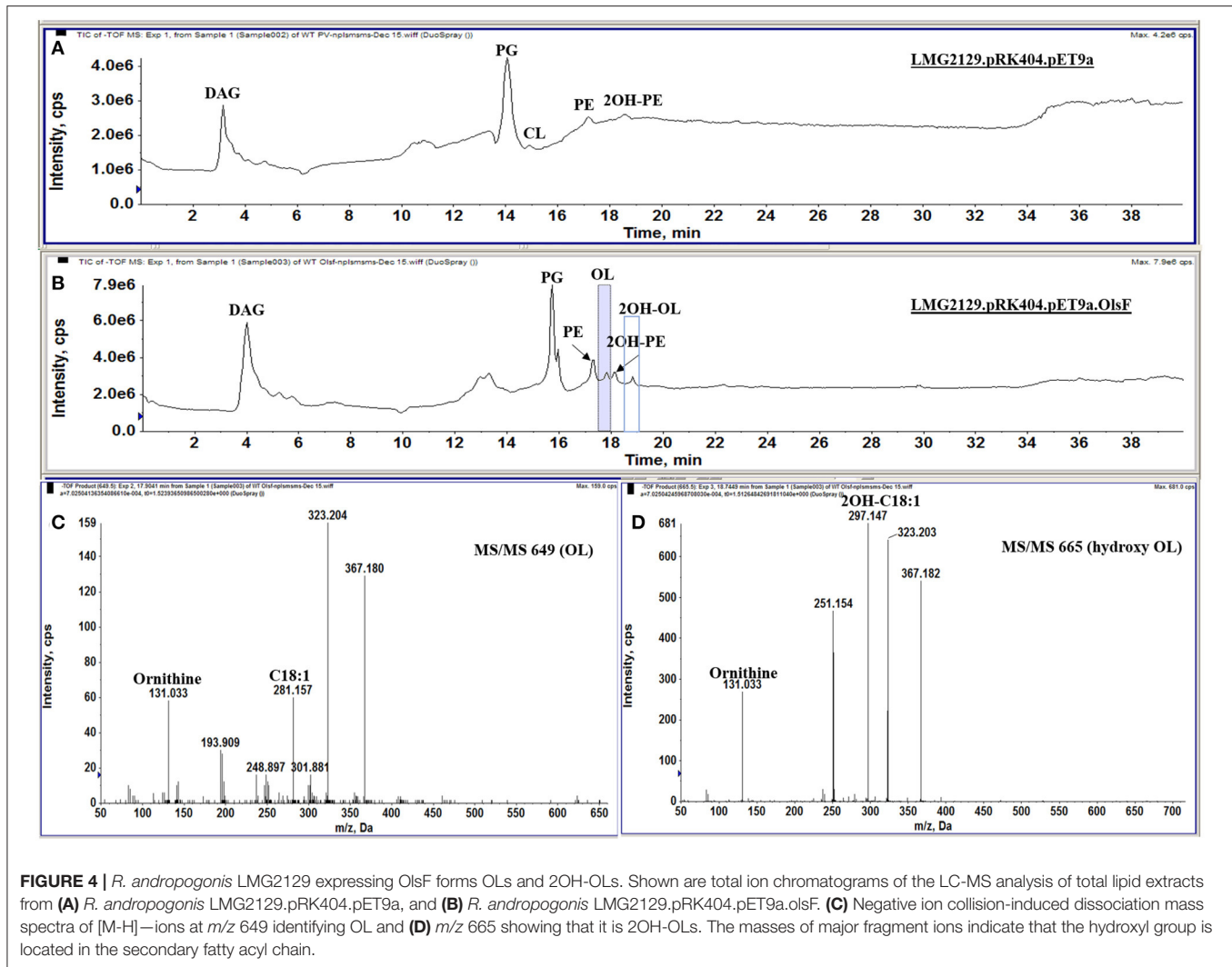
R. andropogonis contains both forms of PE but no OLS when grown in complex medium (Figure 2F). To create a *R. andropogonis* strain constitutively forming OL, the bifunctional acyltransferase OlsF from *S. proteamaculans* (Vences-Guzmán et al., 2015) was expressed in the type strain *R. andropogonis* LMG2129 (Gillis et al., 1995). When analyzing the lipid composition of the OlsF-expressing strain using LC-MS, we observed the formation of two new lipids that were absent in the vector control strain (Figures 4A,B) and the lipid profile of the vector control strain is similar to the wild-type strain. These new lipids were identified as unmodified and hydroxylated OLS (Figures 4C,D), with the [M-H]⁻ ions of their major species being observed at *m/z* 649.5 and 665.5, respectively. A comparison of the MS/MS spectra of *m/z* 649.5 and 665.5 (Figures 4C,D) indicates that the hydroxylation is located within

the secondary fatty acyl chain. Specifically, the carboxylic anion of C18:1 fatty acid is observed at *m/z* 281 (Figure 4C), and the carboxylic anion of hydroxylated C18:1 fatty acid is observed at *m/z* 297 (Figure 4D). This result suggests that the hydroxylase responsible for 2-hydroxylation of OL is constitutively expressed whereas OL synthesis is inducible in the wild-type strain.

The Absence of OLS Slows the Growth of *B. cenocepacia* Under Acid Stress Conditions

Earlier reports had shown that *B. cepacia* induces OL formation under conditions of heat stress (Taylor et al., 1998). An importance of the presence of OL for heat and acid stress resistance had been also described in *R. tropici* (Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011). We wondered if the absence of OL in *B. cenocepacia* NG1 (González-Silva et al., 2011) would negatively affect the stress tolerance of this strain in comparison with its respective wild-type J2315 or if the *R. andropogonis* strain constitutively forming OL would be more resistant to abiotic stress than the corresponding wild-type. Strains were exposed to various abiotic stresses such as variations in temperature (30, 37, or 42°C), in acidity (pH 4 or pH 7) or osmotic stress conditions (0.05 M, 0.5 M, or 1 M NaCl).

With respect to the temperature stress experiments, we observed that *R. andropogonis* strains grew best at 30°C (Figure 5A), and their growth was drastically affected at 37°C. The *R. andropogonis* strain constitutively forming OLS grows a little less than that of the wild-type strain at 37°C (Figure 5B). At 42°C, the *R. andropogonis* strains do not grow, apparently because they are lysed. No growth differences were observed between both *B. cenocepacia* strains at 30 and 37°C, but, at 42°C the absence of OL in *B. cenocepacia* NG1 apparently mildly



affected the growth of this strain compared to the wild-type J2315 (Figure 5C).

With respect to acid stress, we observed that the presence of OL did not affect the growth of the *R. andropogonis* strains. In contrast, the absence of OL in *B. cenocepacia* NG1 mildly affected the stress tolerance of this strain in comparison with its respective wild-type J2315. Also, it was observed that *R. andropogonis* strains were more resistant to pH 4 than the strains of *B. cenocepacia* (Figures 5D,E).

Osmotic stress is a common environmental stress for *B. cenocepacia*, to which it is exposed for example in the lungs of patients with cystic fibrosis (CF) or in soil (Smith et al., 1996). Behrends et al. (2011), investigated the tolerance to osmotic stress of five isolates of *B. cenocepacia* and elucidated the metabolic changes associated with osmotic stress when the isolates were exposed to 0.5 M NaCl. When exposing the strains to NaCl concentrations of 0.05, 0.5, and 1 M, we observed that there was no difference between the strains that synthesized OLs with those that did not (Figures 5F–H). *R. andropogonis* did not grow under osmotic stress conditions, whereas *B. cenocepacia* strains grow

well in medium supplemented with 0.5 M NaCl, but did not grow in medium supplemented with 1 M NaCl.

The Absence of OLs in *B. cenocepacia* Reduces Their Virulence in a *Galleria mellonella* Infection Model Under Specific Conditions

Non-mammalian model systems of infection such as *G. mellonella* have been used to study the virulence of human pathogens such as *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and species of the genus *Burkholderia* (Fedhila et al., 2010). *G. mellonella* is a relatively cheap infection model, small in size, and possesses a short life cycle, the organisms can be handled easily and only small quantities of test compounds are required for injection. It has been used as a model for clinical infections as it can be maintained at physiological temperatures (37°C) for up to 5 days and its innate response to infections is structurally and

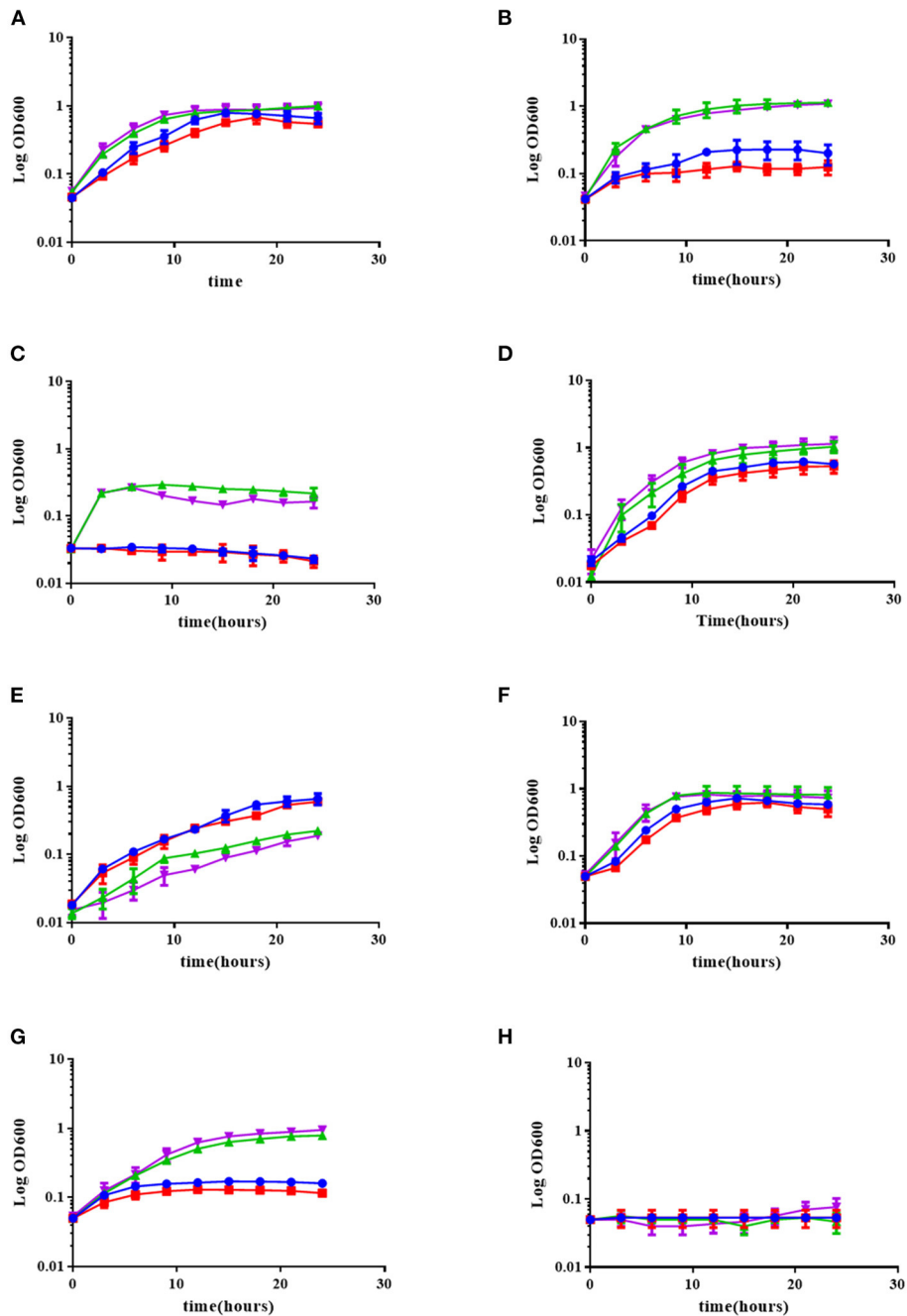


FIGURE 5 | The absence of OLs in the *B. cenocepacia* mutant deficient in *olsB* slightly affects its growth under low pH and temperature stress conditions, but the presence of OLs in *R. andropogonis* does not increase tolerance to environmental stress conditions. The strains were grown in complex LB medium at 30°C (**A**), 37°C (**B**), or 42°C (**C**), or in complex LB medium adjusted to pH 7.0 (**D**), or pH 4.0 (**E**), and in complex LB medium supplemented with 0.05 M NaCl (**F**), 0.5 M NaCl (**G**), or 1 M NaCl (**H**) at 30°C. Growth kinetics were determined in a Synergy 2.0 Biotek, with medium shaking in 96-well microplates measuring every 3 h for 24 h, performing three independent repetitions. ▲ (green triangle up) *B. cenocepacia* J2315, ▼ (purple triangle down) *B. cenocepacia* NG1, ● (blue circle) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a, ■ (red square) *R. andropogonis* LMG2129.pRK.pET9a.olsF.

functionally similar to that of mammals. The release of reactive oxygen species and antimicrobial peptides into the hemolymph is triggered by humoral responses. Hemolymph clotting, equivalent to mammalian blood clotting, is followed by melanization. The

cellular response results in the encapsulation of the infecting pathogen and phagocytosis (McCloskey et al., 2019). When control larvae were infiltrated with saline solution, with *E. coli* or simply picketed, they were asymptomatic and neither death

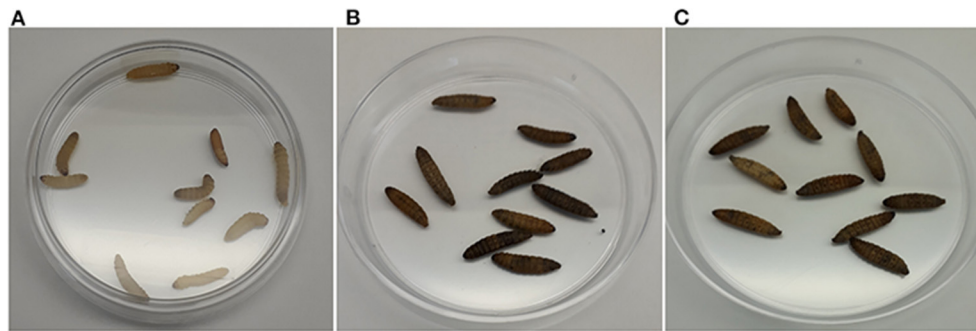


FIGURE 6 | Melanization in *Galleria mellonella* larvae infected with strains of *B. cenocepacia* occurs in the presence of the pathogen and does not depend on the presence of OLs. **(A)** Control larvae infiltrated with 10 mM $MgSO_4$, **(B)** Larvae infected with *B. cenocepacia* wild-type J2315, and **(C)** larvae infected with the *B. cenocepacia* mutant strain NG1. The pathogenicity assays were carried out using 10 insect larvae placed individually in 55 mm Petri dishes without diet and incubated at 30°C, evaluating mortality every 24 h after injection for 5 days before moving to the next larval growth stage. The melanization in *G. mellonella* larvae occurred along with larva death. Five independent experiments were performed.

nor melanization were observed until day 5 (**Figure 6A**). When evaluating the virulence of the *B. cenocepacia* wild-type J2315 and the mutant NG1 in larvae of *G. mellonella*, both strains caused the typical melanization (**Figures 6B,C**). When larvae of *G. mellonella* were infected with high concentrations of 3×10^7 CFU/ml and 3×10^6 CFU/ml, no differences between the larvae infected with the wild-type or the mutant strain were observed (**Figure 7**). However, at lower bacterial concentrations such as 3×10^5 CFU/ml, lower mortalities were observed in the case of the mutant lacking OLs. At this concentration, the wild-type strain *B. cenocepacia* J2315 caused a mortality rate of 44% after 5 days, while the mortality rate of the mutant strain NG1 was 28% after the same time. The minimum dose for larval mortality was 2×10^3 CFU/ml and only those larvae infected with the wild-type strain (2% mortality) presented larval death. Our results indicate that the presence of OLs causes an increase in mortality in the *G. mellonella* infection model under a cell density of 3×10^5 CFU/ml.

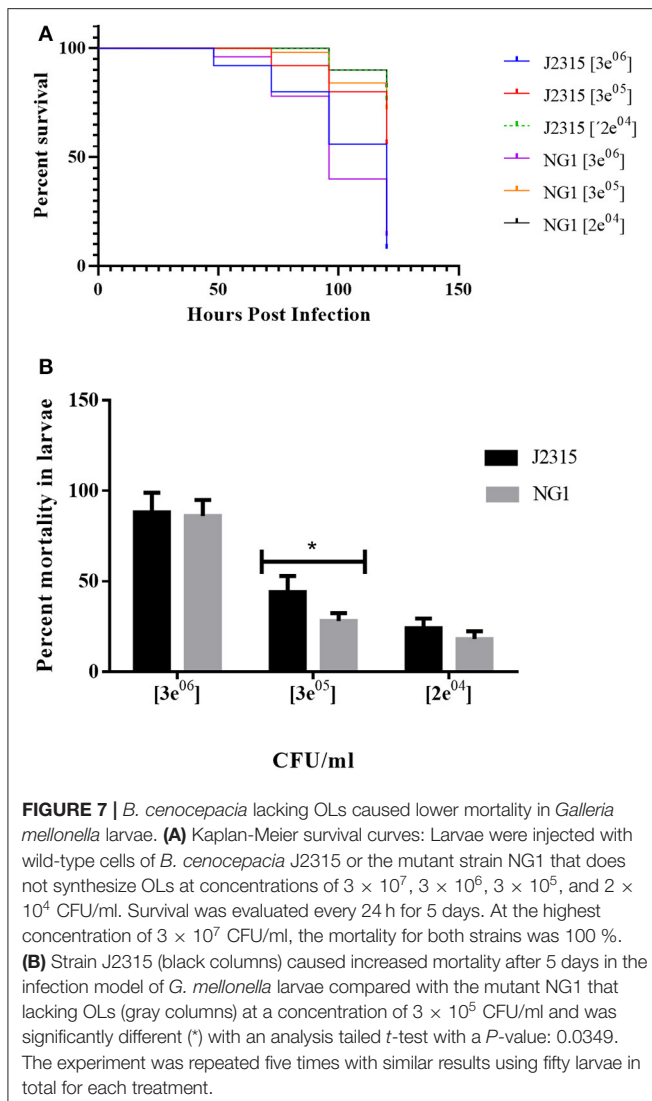
The Presence of OLs Induces an Increased Accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS)

Plant innate immunity is the first line of defense against multiple pathogens. An important part of these immune responses is the production of extracellular reactive oxygen species (ROS). ROS can be present as impermeable superoxide (O_2^-) or as permeable hydrogen peroxide (H_2O_2) and it can be readily translocated from one cell to another (Ghosh et al., 2019). *B. andropogonis* LMG2129 has been described as bacterial stripe pathogen in maize and other plants (Moffett et al., 1986; Cother et al., 2004; Li and De Boer, 2005; Eloy and Cruz, 2008). We wanted to study if the presence or absence of OLs could modify the plant immune responses, in particular the ROS production by the plant upon infection with *R. andropogonis*. ROS formation in infiltrated plant leaves was quantified using the fluorescence emitted by the compound diacetate 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH-DA) when it is oxidized by ROS (Lehmann et al., 2015). Directly after infection (0 days post infection (dpi) ROS formation is

detected in leaves infected with *R. andropogonis* (**Figure 8**). Interestingly, ROS production was much higher in leaves infected with the strain LMG2129.pRK.pET9a.olsF constitutively forming OLs compared to mock-treated samples ($MgCl_2$) and to the wild-type strain (**Figures 8A–C**). To study the progression of ROS accumulation over time, ROS was quantified at 0, 3, 7, and 15 dpi (**Figure 8D**). Immediately after infection (0 dpi), ROS levels were twice as high in the strain constitutively forming OLs than the wild-type strain. ROS levels decreased at 3, 7, and 15 dpi, and no significant differences were detected between the different treatments at the later time points. Wounding caused by infiltration has been also described to induce ROS accumulation (Benikhlef et al., 2013). We observed that the possible damage by infiltrating the mock solution only slightly induces ROS formation (**Figures 8A,D**). Our results indicate that the presence of OLs triggers a strong ROS accumulation.

Constitutive OL Formation Does Not Modify the Progression of Infection Caused by *Robbsia andropogonis* on Its Host Maize

Based on the increased accumulation of ROS caused by the OL-forming *R. andropogonis* strain on maize (**Figure 8**), we wanted to characterize if the presence of OLs would modify the progression of the infection of *R. andropogonis*. Disease symptoms (dark-red lesions and chlorosis) and the number of living bacteria present inside the leaves were evaluated (**Figure 9**). Maize leaves were inoculated with the *R. andropogonis* strains and 3 days post-inoculation (dpi) disease symptoms were observed at the point of inoculation. These lesions continued to advance along the veins during the following days, while control plants infiltrated with the mock solution were asymptomatic (**Figure 9A**). Remarkably, the lesions caused by strains constitutively expressing OlsF were similar to the ones produced by the wild-type strain *B. andropogonis* LMG2129 (**Figures 9B–D**). Bacteria were isolated from leaves and colony-forming units (CFU) were determined at 0, 3, 7, and 15



dpi. Bacterial numbers increased over time in infected plants and no significant differences could be observed between both strains (Figure 9E). These results suggest that the increased ROS accumulation induced by the overexpression of OLs did not influence the progression of the infection on maize.

DISCUSSION

The genus *Burkholderia* s.l. contains pathogenic, phytopathogenic, symbiotic and non-symbiotic species from a very wide range of environmental (soil, water, plants, fungi) and clinical (animal, human) habitats (Estrada-de Los Santos et al., 2018). One characteristic that was thought to be unique for the genus *Burkholderia* was the presence of the membrane lipids phosphatidylethanolamine and ornithine lipids (OLs), both in a hydroxylated and in a non-hydroxylated form (Yabuuchi et al., 1992). Here, we show that only *Burkholderia* s.s. species which often correspond to pathogens of humans, plants or animals

constitutively form OLs and that these lipids are absent (or at least not constitutively formed) in the recently proposed genera *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Trinickia*, and *Mycetohabitans* that are related to beneficial bacteria or that do not cause pathogenicity in humans. However, the absence of OLs is probably not caused by the absence of a copy of the *olsB* gene because we found that all analyzed species possessed a gene encoding a homolog of the *N*-acyltransferase OlsB (Bcal1281) responsible for the first step in OL synthesis in *B. cenocepacia* (González-Silva et al., 2011). The genomic context around the respective genes was usually conserved throughout *Burkholderia* s.l. (data not shown). The synthesis of OLs in the recently proposed genera is probably induced at low phosphate concentrations and regulated by PhoB as seen in a variety of other bacteria such as for example *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Serratia proteamaculans*, and *Vibrio cholerae*. This idea is supported by our prediction of Pho boxes preceding the respective putative *olsB* genes in 21 of the 43 genomes analyzed. The majority of these 21 genomes corresponded to genomes of bacteria that do not constitutively synthesize OLs (*Paraburkholderia* and *Caballeronia*), and five corresponded to bacterial species of the genus *Burkholderia* s.s. which constitutively synthesize OLs (Supplementary Table 4). It is possible that we did not detect the Pho boxes in some genomes, because of the evolutionary distance between α -proteobacteria and β -proteobacteria or alternatively that the genes responsible for OL formation are regulated differently in the other species. The presence of a Pho box in front of *olsB* in strains forming OLs constitutively might mean that expression of the respective *olsB* copies is increased further under phosphate-limiting conditions and that this leads to an increase in OL formation. Among the species that we identified with predicted Pho boxes was *P. xenovorans* and we cultured the strain LB400 (Goris et al., 2004) in minimal medium supplemented under low phosphate conditions. We observed that when cultivated in growth medium with 0 or 0.02 mM phosphate the strain was able to replace the phospholipids PE and 2OH-PE by modified and unmodified OLs (data not shown).

OLs can be modified by hydroxylations, either in the head group or in the fatty acid chains or by *N*-methylations (Sohlenkamp and Geiger, 2016). These modifications can play an important role in response to environmental stresses, and it has been observed that the amount of hydroxylated lipids (2OH-PE and 2OH-OL) increases at high temperatures in *B. cenocepacia* (Taylor et al., 1998) and that the hydroxylated OL NL1 is formed under acid stress in *B. cenocepacia* (González-Silva et al., 2011). In this study, we noticed that the absence of OLs in *B. cenocepacia* strain NG1, slightly affected tolerance to high temperature and acidic pH compared to its respective wild-type J2315 (Figures 5C,E) and we believe that the slight decrease in growth could be caused by the absence of the hydroxylated OL NL1. This observation is consistent with the earlier observations in *R. tropici*, where the presence of (hydroxylated) OLs conferred resistance to acid stress conditions and increased temperatures (Vences-Guzmán et al., 2011), although the effect observed in *B. cenocepacia* is clearly not as strong as in *R. tropici*. A possible explanation is that the presence/absence of OLs in *B. cenocepacia*

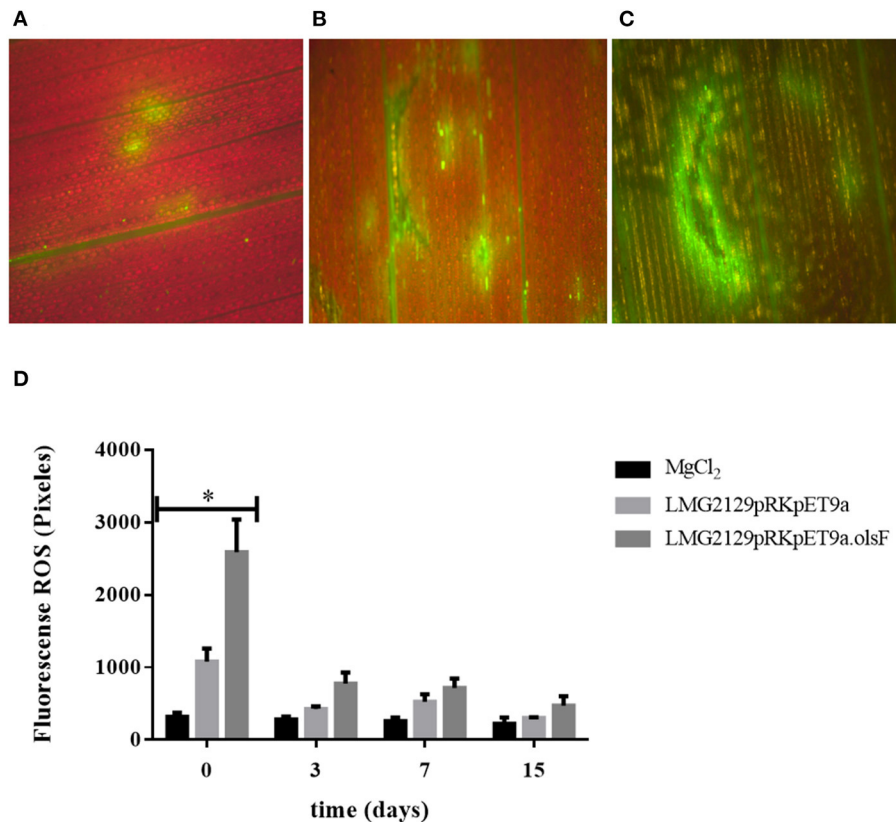


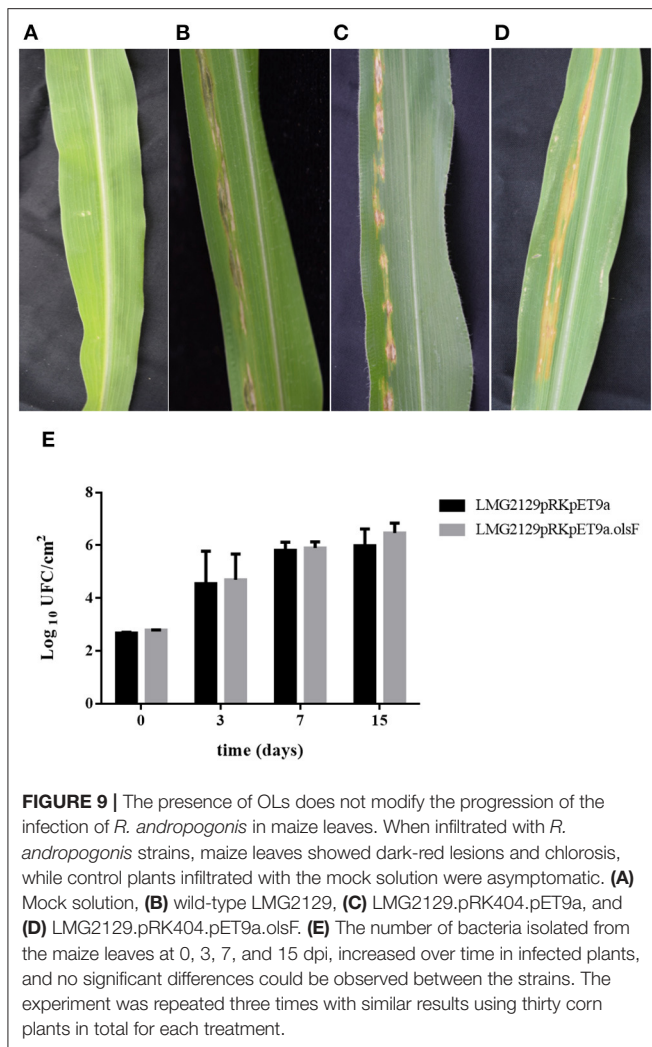
FIGURE 8 | The presence of ornithine lipids in *R. andropogonis* drastically increases the formation of reactive oxygen species (ROS) directly after infiltration into leaves of maize plants. ROS detection as DCFH-DA fluorescence (A) in maize leaves treated with mock solution, (B) treated with LMG2129.pRK404.pET9a, or (C) treated with LMG2129.pRK404.pET9a.olsF. (D) Densitometric quantification of ROS production by measuring DCFH-DA fluorescence showed that immediately after infection (0 dpi) the ROS levels were two times higher in leaves infiltrated with the strain constitutively forming OLS compared to leaves infiltrated with the wild-type strain, and were significantly different (*) determined by the analysis tailed *t*-test with a *P*-value: 0,0263 at 0 dpi. ROS concentration was lower on later times at 3, 7, and 15 dpi, and no differences were detected between the treatments. The experiment was repeated three times with similar results.

is not a main factor for stress resistance as seems to be the case in *R. tropici*, but a secondary factor contributing on a smaller scale to resistance to the stress conditions studied. In the case of the *R. andropogonis* strains, the strain expressing OlsF constitutively is growing slower under all conditions and it does not contribute to an increased resistance to abiotic stress conditions under the chosen expression conditions.

Membrane lipids can play a role in bacteria-host relationships during pathogenicity. Bartholomew et al. (2019), described that a 2-hydroxylation in lipid A contributes to virulence in *Acinetobacter baumannii* using *G. mellonella* as an infection model. They could show that only 10 % of the larvae survived when challenged with the wild-type and the complemented mutant. In contrast, 50 % of the larvae survived when inoculated with the *lpxO* mutant. A recent study by Kim et al. (2018) concluded that an increased formation of OLS might play a role in increasing persistence, while at the same time reducing the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* on *Tenebrio molitor* (an insect) and in *Caenorhabditis elegans* (nematode). In our study, we observed that the mean of the mortalities after 5 days caused by the *B. cenocepacia* mutant deficient in OL seems

to be lower at different cell densities tested, but a statistically significant reduction of mortality in the *G. mellonella* model was only observed at a cell density of 3×10^5 CFU/ml. A possible explanation is that OLS are not the main factor contributing to mortality in this experimental system, and that the effect of the absence of OLS might be covered by other unknown factors. Older studies by other groups about the immunogenicity of OLS have been contradictory and a probable reason is that OLS are not the only or main factor in all the bacteria studied, although they probably contribute to immunogenicity by interfering with or contributing to the effects of other virulence factors. We also observed that the resistance to a selected set of antibiotics and microbial peptides was not affected by the presence of OLS (data not shown). However, although OLS seem to affect the bacterial-host interaction, there are clearly additional factors present in *B. cenocepacia* affecting its virulence.

Plants have elaborate multilayered defense mechanisms to survive the constant attack of pathogens. The first line of defense is innate immunity, which is triggered by molecular components of microbes, called Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs), including components of the bacterial membrane



(Boller and Felix, 2009). Once MAMPs are recognized, the Pattern-Triggered Immunity (PTI) is activated, inducing a strong accumulation of ROS, MAPK signaling cascades and transcriptional activation of early defense response genes (Tsuda and Somssich, 2015). After this initial response, plants can induce the Effector-Triggered Immunity (ETI), which is based on the specific recognition of pathogen effectors by the *R* genes that leads to a local programmed cell death or hypersensitive response (HR) (Boller and Felix, 2009). The combined effect of PTI and ETI can block the invasion of pathogens, both locally at the infection site and systemically in uninfected leaves (Craig et al., 2009; Tsuda and Somssich, 2015). However, although PTI and ETI share similar molecular defense response elements, they have different dynamics in the activation and intensity (Katagiri and Tsuda, 2010). It was demonstrated that bacterial polar lipids can stimulate specific immune responses in the host (Melian et al., 2000; Roura-Mir et al., 2005). For instance, polar lipids of *B. pseudomallei* (e.g., ornithine lipids and rhamnolipids) induce antibody production and several polar lipids stimulate cellular immune responses (González-Juarrero et al., 2013). Here we

show that *R. andropogonis* constitutively forming OLs causes an increased formation of ROS directly after infection of maize leaves (Figure 8), suggesting that plants can recognize OLs as MAMPs, inducing the PTI. As signaling molecules and as toxic compounds, ROS have been described to play multiple roles during plants life, including modulation of growth and development and response to abiotic and biotic stimuli (Camejo et al., 2016). The constitutive presence of OLs in *R. andropogonis* does not affect the number of bacteria growing inside the leaves (Figure 9), which suggests that a possible recognition of OLs and subsequent accumulation of ROS are not sufficient to stop the infection. One possibility to explain this phenomenon, is that the infection inflicted by *R. andropogonis* can be inhibited by activating the ETI but no PTI. This is in agreement with the observation that expression of the *R* gene *Rxo1* controls the resistance against *R. andropogonis* in maize and rice (Zhao et al., 2005). Another possibility is that during the infection, *R. andropogonis* can produce scavenger molecules or detoxifying enzymes that can inhibit ROS, which has been previously described as invading strategy for multiple plant pathogens (Lehmann et al., 2015).

In conclusion, the presence of OLs in both bacteria-host interactions we studied affects how the pathogen is perceived and it may affect in some cases the outcome of the infection. Further work is required to determine the role of OLs in *Burkholderia* spp. during plant-pathogen and animal-pathogen interactions.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LAC-C, MS, and CS designed the study. LAC-C, RS-M, MT, LM-A, MÁV-G, and ZG carried out the experiments. LAC-C, LL, ZG, ED-G, MS, and CS carried out the data analysis and discussed the results. LAC-C and CS were involved in drafting the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

LAC-C is a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 295964 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Research in our lab was supported by grants PAPIIT-UNAM (IN202413, IN208116, IN208319) and CONACyT-Mexico (153200, 237713). ZG and the mass spectrometry facility in the Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, were supported by a LIPID MAPS glue grant (GM-069338) from the National Institutes of Health.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Irma Martínez Flores from CCG's Evolutionary Genomics program for her support in using the Synergy 2.0 Biotek equipment to measure the growth kinetics carried out in this work, and we thank the students Nahomy Donaji Rojas Sánchez and Naomi Astrid Mojica Quintana, who carried out its social service of the UAEM Clinical Laboratory Technician

program supporting the execution of pathogenicity tests in plants and larvae.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.610932/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alghoribi, M. F., Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Beatson, S. A., and Upton, M. (2014). *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS ONE* 9:e101547. doi: 10.1371/journal.pone.0101547
- Barbosa, L. C., Goulart, C. L., Avellar, M. M., Bisch, P. M., and von Kruger, W. M. A. (2018). Accumulation of ornithine lipids in *Vibrio cholerae* under phosphate deprivation is dependent on VC0489 (OlsF) and PhoBR system. *Microbiology* 164, 395–399. doi: 10.1099/mic.0.000607
- Bartholomew, T. L., Kidd, T. J., Sa Pessoa, J., Conde Alvarez, R., and Bengoechea, J. A. (2019). 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* Lipid A contributes to virulence. *Infect. Immun.* 87:e00066-19. doi: 10.1128/IAI.00066-19
- Behrends, V., Bundy, J. G., and Williams, H. D. (2011). Differences in strategies to combat osmotic stress in *Burkholderia cenocepacia* elucidated by NMR-based metabolic profiling. *Let. Appl. Microbiol.* 52, 619–625. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03050.x
- Benikhlef, L., IHaridon, F., Abou-Mansour, E., Serrano, M., Binda, M., Costa, A., et al. (2013). Perception of soft mechanical stress in *Arabidopsis* leaves activates disease resistance. *BMC Plant Biol.* 13:133. doi: 10.1186/1471-2229-13-133
- Benning, C., Huang, Z. H., and Gage, D. A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 103–111. doi: 10.1006/abbi.1995.1141
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi: 10.1139/o59-099
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Bosak, T., Schubotz, F., de Santiago-Torio, A., Kuehl, J. V., Carlson, H. K., Watson, N., et al. (2016). System-wide adaptations of *Desulfovibrio alaskensis* G20 to phosphate-limited conditions. *PLoS ONE* 11:e0168719. doi: 10.1371/journal.pone.0168719
- Camejo, D., Guzman-Cedeno, A., and Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Biochem.* 103, 10–23. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.035
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13
- Cother, E. J., Noble, D., Peters, B. J., Albiston, A., and Ash, G. J. (2004). A new bacterial disease of jojoba (*Simmondsia chinensis*) caused by *Burkholderia andropogonis*. *Plant Pathol.* 53, 129–135. doi: 10.1111/j.0032-0862.2004.00982.x
- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A. (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 60, 1123–1132. doi: 10.1093/jxb/erp059
- Defrance, M., and van Helden, J. (2009). Info-gibbs: a motif discovery algorithm that directly optimizes information content during sampling. *Bioinformatics* 25, 2715–2722. doi: 10.1093/bioinformatics/btp490
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., and Mahenthalingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5215–5229. doi: 10.1007/s00253-016-7520-x
- Dobritsa, A. P., and Samadpour, M. (2016). 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.* 66, 2836–2846. doi: 10.1099/ijsem.0.001065
- Eloy, M., and Cruz, L. (2008). A new bacterial disease of carnation in Portugal caused by *Burkholderia andropogonis*. *Rev. Ciências Agrárias* 31, 89–95.
- Elshafie, H. S., Viggiani, L., Mostafa, M. S., El-Hashash, M. A., Camele, I., and Bufo, S. A. (2017). Biological activity and chemical identification of ornithine lipid produced by *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* ICMP 11096 using LC-MS and NMR analyses. *J. Biol. Res. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperimentale* 90, 96–103. doi: 10.4081/jbr.2017.6534
- Estrada-de Los Santos, P., Palmer, M., Chavez-Ramirez, B., Beukes, C., Steenkamp, E. T., 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. doi: 10.3390/genes9080389
- Fabraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381. doi: 10.1099/00221287-16-2-374
- Fedhila, S., Buisson, C., Dussurget, O., Serror, P., Glomski, I. J., Liehl, P., et al. (2010). Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 24–29. doi: 10.1016/j.jip.2009.09.005
- Gao, J. L., Weissenmayer, B., Taylor, A. M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I. M., and Geiger, O. (2004). Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Mol. Microbiol.* 53, 1757–1770. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04240.x
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I. M., and Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog. Lipid Res.* 49, 46–60. doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.002
- Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M., and Thomas-Oates, J. E. (1999). The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol. Microbiol.* 32, 63–73. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x
- Geske, T., Vom Dorp, K., Dörmann, P., and Hölzl, G. (2013). Accumulation of glycolipids and other non-phosphorous lipids in *Agrobacterium tumefaciens* grown under phosphate deprivation. *Glycobiology* 23, 69–80. doi: 10.1093/glycob/cws124
- Ghosh, S., Malukani, K. K., Chandan, R. K., Sonti, R. V., and Jha, G. (2019). “How plants respond to pathogen attack: interaction and communication,” in *Sensory Biology of Plants*, ed S. Sopory (Singapore: Springer), 537. doi: 10.1007/978-981-13-8922-1_20
- Gillis, M., Van, T. V., Bardin, R., Goor, M., Hebban, P., Willems, A., et al. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45, 274–289. doi: 10.1099/00207713-45-2-274
- González-Juarrero, M., Mima, N., Trunck, L. A., Schweizer, H. P., Bowen, R. A., Dascher, K., et al. (2013). Polar lipids of *Burkholderia pseudomallei* induce different host immune responses. *PLoS ONE* 8:e80368. doi: 10.1371/journal.pone.0080368
- González-Silva, N., López-Lara, I. M., Reyes-Lamothe, R., Taylor, A. M., Sumpton, D., Thomas-Oates, J., et al. (2011). The dioxygenase-encoding *olsD* gene

- from *Burkholderia cenocepacia* causes the hydroxylation of the amide-linked fatty acyl moiety of ornithine-containing membrane lipids. *Biochemistry* 50, 6396–6408. doi: 10.1021/bi200706v
- Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J. F., et al. (2004). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(Pt. 5), 1677–1681. doi: 10.1099/ijs.0.63101-0
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Jonsson, R., Struve, C., Jensen, H., and Krogfelt, K. A. (2017). The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enterotoxigenic *Escherichia coli* pathogenesis. *Virulence* 8, 1894–1899. doi: 10.1080/21505594.2016.1256537
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Arabidopsis Book* 1:e0039. doi: 10.1199/tab.0039
- Katagiri, F., and Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1531–1536. doi: 10.1094/MPMI-04-10-0099
- Kim, S. K., Park, S. J., Li, X. H., Choi, Y. S., Im, D. S., and Lee, J. H. (2018). Bacterial ornithine lipid, a surrogate membrane lipid under phosphate-limiting conditions, plays important roles in bacterial persistence and interaction with host. *Environ. Microbiol.* 20, 3992–4008. doi: 10.1111/1462-2920.14430
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., and Métraux, J. P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54–62. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.08.027
- Lewenza, S., Falsafi, R., Bains, M., Rohs, P., Stupak, J., Sprott, G. D., et al. (2011). The *olsA* gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility. *FEMS Microbiol. Lett.* 320, 95–102. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02295.x
- L'Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Balet, F., et al. (2011). A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog.* 7:e1002148. doi: 10.1371/journal.ppat.1002148
- Li, X., and De Boer, S. H. (2005). First report of *Burkholderia andropogonis* causing leaf spots of *Bougainvillea* sp. in Hong Kong and Clover in Canada. *Plant Dis.* 89:1132. doi: 10.1094/PD-89-1132A
- López-Lara, I. M., Gao, J. L., Soto, M. J., Solares-Pérez, A., Weissenmayer, B., Sohlenkamp, C., et al. (2005). Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 973–982. doi: 10.1094/MPMI-18-0973
- Matus-Acuña, V., Caballero-Flores, G., Reyes-Hernández, B. J., and Martínez-Romero, E. (2018). Bacterial preys and commensals condition the effects of bacteriovirus nematodes on *Zea mays* and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Soil Ecol.* 132, 99–106. doi: 10.1016/j.apsoil.2018.08.012
- McCloskey, A. P., Lee, M., Megaw, J., McEvoy, J., Coulter, S. M., Pentlavalli, S., et al. (2019). Investigating the *in vivo* antimicrobial activity of a self-assembling peptide hydrogel using a *Galleria mellonella* infection model. *ACS Omega* 4, 99–106. doi: 10.1021/acsoomega.8b03578
- Melian, A., Watts, G. F., Shamshiev, A., De Libero, G., Clatworthy, A., Vincent, M., et al. (2000). Molecular recognition of human CD1b antigen complexes: evidence for a common pattern of interaction with alpha beta TCRs. *J. Immunol.* 165, 4494–4504. doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4494
- Miller, J. (1972). “Experiments in molecular genetics,” in *Experiments in Molecular Biology*, eds J. Miller and J. B. Miller (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 431–433.
- Minnikin, D. E., and Abdolrahimzadeh, H. (1974). The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett.* 43, 257–260. doi: 10.1016/0014-5793(74)80655-1
- Moffett, M. L., Hayward, A. C., and Fahy, P. C. (1986). Five new hosts of *Pseudomonas andropogonis* occurring in eastern Australia: host range and characterization of isolates. *Plant Pathol.* 35, 34–43. doi: 10.1111/j.1365-3059.1986.tb01978.x
- Palleroni, N. J. (2015). “Burkholderia,” in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, eds M. Trujillo, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. Rainey, and W. B. Whitman, 1–50. doi: 10.1002/9781118960608
- Rojas-Jiménez, K., Sohlenkamp, C., Geiger, O., Martínez-Romero, E., Werner, D., and Vinuesa, P. (2005). A CLC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1175–1185. doi: 10.1094/MPMI-18-1175
- Rojas-Rojas, F. U., López-Sánchez, D., Meza-Radilla, G., Méndez-Canarios, A., Ibarra, J. A., and Estrada-de Los Santos, P. (2019). The controversial *Burkholderia cepacia* complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens. *Rev. Argent. Microbiol.* 51, 84–92. doi: 10.1016/j.ram.2018.01.002
- Roura-Mir, C., Wang, L., Cheng, T. Y., Matsunaga, I., Dascher, C. C., Peng, S. L., et al. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2. *J. Immunol.* 175, 1758–1766. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1758
- Sawana, A., Adeolu, M., and Gupta, R. S. (2014). 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.* 5:429. doi: 10.3389/fgen.2014.00429
- Simmons, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi: with colored plate. *J. Infect. Dis.* 39, 209–214. doi: 10.1093/infdis/39.3.209
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1, 784–791. doi: 10.1038/nbt1183-784
- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85, 229–236. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81099-5
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 133–159. doi: 10.1093/femsre/fuv008
- Tahara, Y., and Fujiyoshi, Y. (1994). A new method to measure bilayer thickness: cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation. *Micron* 25, 141–149. doi: 10.1016/0968-4328(94)90039-6
- Taylor, C. J., Anderson, A. J., and Wilkinson, S. G. (1998). Phenotypic variation of lipid composition in *Burkholderia cepacia*: a response to increased growth temperature is a greater content of 2-hydroxy acids in phosphatidylethanolamine and ornithine amide lipid. *Microbiology* 144(Pt. 7), 1737–1745. doi: 10.1099/00221287-144-7-1737
- Tsuda, K., and Somssich, I. E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol.* 206, 932–947. doi: 10.1111/nph.13286
- Turatsinze, J. V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., and van Helden, J. (2008). Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat. Protoc.* 3, 1578–1588. doi: 10.1038/nprot.2008.97
- Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthalingam, E., LiPuma, J. J., et al. (2003). *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Res. Microbiol.* 154, 91–96. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00026-3
- Vences-Guzmán, M. A., Guan, Z., Escobedo-Hinojosa, W. I., Bermúdez-Barrientos, J. R., Geiger, O., and Sohlenkamp, C. (2015). Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environ. Microbiol.* 17, 1487–1496. doi: 10.1111/1462-2920.12562
- Vences-Guzmán, M. A., Guan, Z., Ormeno-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I. M., Martínez-Romero, E., et al. (2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Microbiol.* 79, 1496–1514. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x
- Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L. E., and Contreras-Moreira, B. (2018). GET_PHYLOMARKERS, a Software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical geno-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas*. *Front. Microbiol.* 9:771. doi: 10.3389/fmicb.2018.00771

- Weissenmayer, B., Gao, J. L., López-Lara, I. M., and Geiger, O. (2002). Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Mol. Microbiol.* 45, 721–733. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03043.x
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., et al. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36, 1251–1275. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x
- Yuan, Z. C., Zaheer, R., Morton, R., and Finan, T. M. (2006). Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 34, 2686–2697. doi: 10.1093/nar/gkl365
- Zhao, B., Lin, X., Poland, J., Trick, H., Leach, J., and Hulbert, S. (2005). A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15383–15388. doi: 10.1073/pnas.0503023102
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2021 Córdoba-Castro, Salgado-Morales, Torres, Martínez-Aguilar, Lozano, Vences-Guzmán, Guan, Dantán-González, Serrano and Sohlenkamp. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.