



V Reunión del Grupo Especializado en Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología

Girona, 10 – 12 de Abril 2013

Programa y Libro de resúmenes

Con la colaboración de:



Comité Organizador MIP'13

Presidente: Emilio Montesinos
Secretarios: Jesús Francés y Lidia Ruz

Vocales:
Anna Bonaterra
Concepción Moragrega
Isidre Llorente
Esther Badosa
Jordi Cabrefiga
Laura Montesinos
Isabel Mora
Mireia Puig
Gemma Roselló

Junta Directiva del Grupo Especializado en Microbiología de plantas (MIP)

Presidente: Antonio de Vicente Moreno (UMA)
Vicepresidente: Pablo Rodríguez Palenzuela (CBGP-UPM)
Secretario: Alejandro Pérez García (UMA)
Tesorera: Emilia López Solanilla (CBGP-UPM)

Vocales:
Ramón Penyalver Navarro (IVIA)
Nuria Gaju Ricart (UAB)

PROGRAMA RESUMIDO

	Miércoles, 10	Jueves, 11	Viernes, 12		
9:00-10:45		Sesión III	Sesión VI		
10:45-11:15		Pausa-café	Pausa-café		
11:15-13:00		Sesión IV	Sesión VII		
13:00-13:30		Reunión de la Junta del MIP	Clausura		
13:30-14:15		Registro de participantes y recogida de material	Comida y foto de grupo		
14:15-15:00					
15:00-15:30	Inauguración				Sesión V "Bioplaguicidas y biofertilizantes microbianos"
15:30-17:30	Sesión I				Visita al claustro de la Catedral de Girona
17:30-18:00	Pausa-café				
18:00-19:30	Sesión II				
19:30-21:30	Visita a Girona y concierto en el casco antiguo				
≈ 21:30	Cena en el casco antiguo	Cena en una masía en las afueras de la ciudad			

RECOGIDA Y TRASLADO DE PARTICIPANTES

Miércoles 10 de abril, 2013

13:45 Recogida de participantes.

Itinerario

1ª parada: Hotel Carlemany 13:45

2ª parada: delante de correos (Hoteles Nord, Ciutat Girona) 13:50

3ª parada: Residencia universitaria 14:00

19:30. Traslado en autobús al centro de la ciudad para hacer la visita al casco histórico y cena (Salida del Parque Científico y Tecnológico).

Jueves 11 de abril, 2013

8:30 Recogida de participantes:

Itinerario

1ª parada: Hotel Carlemany 8:30

2ª parada: delante de correos (Hoteles Nord, Ciutat Girona) 8:35

3ª parada: Residencia universitaria 8:45

17:30 Traslado en autobús al centro de la ciudad. Visita al Claustro de la Catedral (Salida del Parque Científico y Tecnológico).

21:00 Recogida de participantes y traslado hasta el lugar de cena (Masía típica catalana) en las afueras de la ciudad.

Itinerario

1ª parada: Hotel Carlemany 21:00

2ª parada: delante de correos (Hoteles Nord, Ciutat Girona) 21:05

3ª parada: Residencia universitaria 21:15

2:15 Traslado en autobús hasta los hoteles y residencia.

Viernes 12 de abril, 2013

8:30 Recogida de participantes en los hoteles concertados y residencia, y traslado en autobús hasta el Parque Científico y Tecnológico.

Itinerario

1ª parada: Hotel Carlemany 8:30

2ª parada: delante de correos (Hoteles Nord, Ciutat Girona) 8:35

3ª parada: Residencia universitaria 8:45

14:00 Traslado en autobús hasta los hoteles y residencia (Salida del Parque Científico y Tecnológico).

PROGRAMA DETALLADO

Miércoles 10 de Abril

- 13:30 -15:00** Registro de participantes y entrega de la documentación
- 15:00 -15:30** Inauguración de la Reunión MIP'13
- Emilio Montesinos, Presidente del Comité Organizador MIP'13
Ricard Guerrero, Presidente de la SEM
Antonio de Vicente, Presidente del grupo MIP
Pere Condom, Director del Parque Científico y Tecnológico de la UdG
Josep Calbó, Vicerrector de Investigación y Transferencia de la UdG
- 15:30 – 17:30** **SESIÓN I (S1).**
Moderadores: Emilia López-Solanilla y Rafael Rivilla.
- 15:30 – 15:45 **S1.1** **SAGRA: Una nueva herramienta para el análisis de genomas de bacterias asociadas a plantas.** P.M. Martínez, C. Ramos, E. López-Solanilla, A. de Vicente y P. Rodríguez-Palenzuela
- 15:45 – 16:00 **S1.2** **Disección de los genomas de los agentes de biocontrol *Bacillus* spp. UMAF6614 y UMAF6639.** M.C. Magno, E. Arrebola, D. Romero, H. Zerriouh, L. García-Gutiérrez, A. de Vicente, C. Ramos, P. Rodríguez-Palenzuela y A. Pérez-García
- 16:00 – 16:15 **S1.3** **Papel de surfactina en la formación de biopelículas de *Bacillus* in planta.** H. Zerriouh, L. García-Gutiérrez, A. de Vicente, J.C. Codina, D. Romero y A. Pérez-García
- 16:15 – 16:30 **S1.4** **Implicación de la celulasa CelC2, en la formación de biofilm y su importancia en la infección y colonización en plantas de interés agroalimentario.** L.P. Rivera, E. Menéndez, R. Rivas, E. Velázquez, Y.G. Yanni, E. Martínez-Molina, F.B. Dazzo, A. Squartini y P.F. Mateos
- 16:30 – 16:45 **S1.5** **La expresión heteróloga de la celulasa rizobiana CelC2 afecta el desarrollo del pelo radicular y del nódulo en *Medicago truncatula*.** E. Menéndez, A. Breakspear, M. Robledo, E. Velázquez, E. Martínez-Molina, R. Rivas, J.D. Murray y P.F. Mateos
- 16:45 – 17:00 **S1.6** **Respuesta a elevados niveles de c-di-GMP en bacterias que interaccionan con planta de manera simbiótica y patogénica.** H.A. Prada-Ramírez, D. Pérez-Mendoza, L. Romero-Jiménez, I.M. Aragón, C- Ramos, J. Sanjuán y M.T. Gallegos
- 17:00 – 17:15 **S1.7** **Identificación y caracterización de genes del agente de biocontrol *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en la micofagia de *Rosellinia necatrix*.** J.I. Crespo-Gómez, C. Pliego, A. de Vicente, C.E. Calderón, C. Ramos y F.M. Cazorla
- 17:15 – 17:30 **S1.8** **Estudio del transcriptoma de *Trichoderma atroviride* en interacción con *Verticillium dahliae*.** I. Carrero-Carrón, R.M. Jiménez-Díaz, R. Hermosa y E. Monte

- 17:30 – 18:00 Pausa para café**
- 18:00 – 19:30 SESIÓN II (S2).**
Moderadores: Cayo Ramos y Inmaculada Larena.
- 18:00 – 18:15 **Funciones controladas por el sistema NtrY/NtrX identificadas durante la caracterización de la movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*.** J. Nogales, N. Calatrava, K. Ameztoy, B. van Steenberg y M. J. Soto
 S2.1
- 18:15 – 18:30 **Contribución a la especificidad de huésped de los efectores del T3SS de *Pseudomonas savastanoi* HopAO1 y HopAO2, dos hipotéticas proteínas tirosina fosfatasas.** M.P. Castañeda-Ojeda, E. López-Solanilla y C. Ramos
 S2.2
- 18:30 – 18:45 **Identificación de nuevos genes implicados en la producción de faseolotoxina mediante mutagénesis al azar de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola.** L. Martínez del Pino, L. Bardaji y J. Murillo
 S2.3
- 18:45 – 19:00 **Colonización y respuesta defensiva inducida por el agente de control biológico *Penicillium oxalicum* en el huésped.** M. Villarino, A. de Cal, Y. Herranz, E.A. Espeso, P. Melgarejo e I. Larena.
 S2.4
- 19:00 – 19:15 **“*Candidatus Liberibacter solanacearum*”: bacteria asociada a desarreglos vegetativos en apio y zanahoria.** G.R. Teresani, E. Bertolini, A. Alfaro-Fernández, M.I. Font, M.C. Martínez, F. Tanaka, E.W. Kitajima, M.M. López, y M. Cambra
 S2.5
- 19:15 – 19:30 **Análisis de los sistemas de quimiotaxis de *Pseudomonas fluorescens* F113.** C. Muriel, B. Jalvo, F. Martínez-Granero, M. Redondo-Nieto, M. Martín y R. Rivilla
 S2.6
- 19:30 Traslado en autobús al centro de la ciudad para hacer la visita guiada y asistir al concierto en el casco antiguo.**
- 21:30 Cena en el centro de Girona.**

Jueves 11 de Abril

- 8:30 Recogida de participantes MIP'13 en los hoteles concertados y residencia, y traslado en autobús hasta el Parque Científico y Tecnológico de la UdG.
- 9:00 - 10:45 **SESIÓN III (S3).**
Moderadores: Ramón Penyalver y Antonieta de Cal.
- 9:00 – 9:15 **La luz controla procesos claves para la virulencia de *Pseudomonas syringae* pv tomato**
S3.1 **DC3000.** I. Río-Álvarez, J.J. Rodríguez-Herva, P.M. Martínez, P. Rodríguez-Palenzuela y E. López-Solanilla
- 9:15 – 9:30 **Supresión cruzada de respuesta de defensa como modelo de adaptación y evolución de**
S3.2 **los efectores de la familia HopZ.** J.S. Rufián, A. Lucia, C.M. Guevara, A.P. Macho, A. Zumaquero, J. Ruiz-Albert y C.R. Beuzón
- 9:30 – 9:45 **Características asociadas a los primeros estadios de infección de aislados españoles de**
S3.3 ***Xanthomonas arboricola* pv. pruni.** J. Garita-Cambroner, P. Sabuquillo, M. Sena, E. Ferragud, C. Redondo, A. Palacio-Bielsa, M.M. López y J. Cubero
- 9:45 – 10:00 **Biosíntesis y regulación de la producción de mangotoxina en *Pseudomonas syringae*.**
S3.4 V.J. Carrión, E. Arrebola, J.A. Gutiérrez-Barranquero, M. van der Voort, J. Murillo, J.M. Raaijmakers, A. de Vicente y F.M. Cazorla
- 10:00 – 10:15 **Evaluación funcional de determinantes de mantenimiento de los plásmidos nativos de**
S3.5 ***Pseudomonas syringae* pv. savastanoi Psv48.** M. Añorga, L. Bardaji, C. Ramos y J. Murillo
- 10:15 – 10:30 **Desarrollo del haustorio de *Podosphaera fusca* y función de los lóbulos.** J. Martínez-Cruz,
S3.6 D. Vela-Corzía, A. de Vicente, D. Romero y A. Pérez-García
- 10:30 – 10:45 **Contribución de los transportadores de membrana a la resistencia a fungicidas DMI y**
S3.7 **QoI en *Podosphaera fusca*.** D. Bellón-Gómez, A. Pérez-García y J.A. Torés
- 10:45 - 11:15 **Pausa para café**
- 11:15 – 13:00 **SESIÓN IV (S4).**
Moderadores: María José Soto y Francisco Cazorla.
- 11:15 – 11:30 **Análisis de la expresión y contribución a la virulencia de *Pseudomonas savastanoi* pv.**
S4.1 **savastanoi de los operones *antABC* y *catBCA*.** E. Caballo-Ponce, I.M. Matas y C. Ramos
- 11:30 – 11:45 **Tirosol como molécula señalizadora en la relación de *Trichoderma reesei* con**
S4.2 **patógenos y plantas.** E. Pérez, R.E. Cardoza, S. Gutiérrez, E. Monte y R. Hermosa

- 11:45 – 12:00
S4.3 **GInt: Un nuevo elemento genético móvil asociado a la captura y transferencia horizontal de DNA en *Pseudomonas syringae* y otras bacterias.** L. Bardaji, M. Echeverría, P. Rodríguez-Palenzuela y J. Murillo
- 12:00 – 12:15
S4.4 **Transferencia horizontal de múltiples determinantes cromosómicos de resistencia a compuestos antibacterianos entre cepas de *Pseudomonas syringae*.** M. Echeverría, L. Bardaji y J. Murillo
- 12:15 -12:30
S4.5 **Impacto de diferentes tratamientos fitosanitarios sobre los cultivos de césped y las poblaciones microbianas del suelo.** M. Carrasquilla, J. Palau, M. Llorós, J. Palau, N. Gaju y M. Martínez-Alonso
- 12:30 – 12:45
S4.6 **Análisis funcional de la mutación que confiere resistencia a benzimidazoles en *Podosphaera fusca*.** D. Vela-Corcía, D. Romero, A. de Vicente, J.A. Torés y A. Pérez-García
- 12:45 – 13:00
S4.7 **Síntesis y regulación de un polisacárido semejante a la celulosa en *Sinorhizobium meliloti* 1021.** I. Baena, E. Valiente, I. Bonilla, M. Martín, R. Rivilla y F.J. Lloret.
- 13:00 – 13:30 **Asamblea del Grupo Especializado MIP**
- 13:30 – 15:00 **Comida en el Parque Científico y Tecnológico. Al finalizar la comida foto oficial del MIP'13.**
- 15:00 – 17:15 **Sesión V (S5). Bioplaguicidas y biofertilizantes microbianos**
Moderador: Emilio Montesinos
- 15:00-15:30
S5.1 **Perspectivas y limitaciones de los bioplaguicidas y biofertilizantes microbianos.**
Emilio Montesinos (CIDSAV-INTEA, Universitat de Girona)
- 15:30-16:00
S5.2 **Experiencia de una PYME en el desarrollo, registro y comercialización de biopesticidas microbianos.**
Carolina Fernández (Futureco Biosciences, Barcelona)
- 16:00-16:30
S5.3 **Biosafety of beneficial bacteria. A view from the genomics side.**
Brion Duffy (EAER. Research Station Agroscope Changins-Wädenswil ACW, Plant Protection and Extension Division, Suiza)
- 16:30-17:15 **Mesa redonda.**
- 17:15 – 18:15 **Visita al claustro de la Catedral de Girona.**
- 21:00 **Recogida de participantes y traslado hasta el lugar de la cena (Masía típica Catalana) en las afueras de la ciudad**
- 2:15 **Traslado a los hoteles y residencia.**

Viernes 12 de Abril

- 8:30** Recogida de participantes MIP'13 en los hoteles concertados y residencia, y traslado en autobús hasta el Parque Científico y Tecnológico de la UdG.
- 9:00 – 10:45** **Sesión VI (S6).**
Moderadores: Jaime Cubero y Anna Bonaterra
- 9:00 – 9:15
S6.1 **Producción de péptidos antimicrobianos catiónicos en plantas mediante expresión constitutiva y acumulación en el RE. Efectos sobre la planta transgénica.** A. Nadal, M. Montero, N. Company, J.L. la Paz, C. Ruiz, E. Montesinos y M. Pla
- 9:15 – 9:30
S6.2 **Diagnóstico y diversidad de los aislados de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en la Axarquía.** M. Crespo, F.M. Cazorla, S. Freeman, J.A. Gutiérrez-Barranquero, E. Arrebola, J.A. Torés y A. de Vicente
- 9:30 – 9:45
S6.3 **Caracterización de bacterias del ácido láctico aisladas de plantas: antagonismo y producción de bacteriocinas.** G. Roselló, J. Francés, L. Montesinos, E. Montesinos y A. Bonaterra
- 9:45 – 10:00
S6.4 **Influencia de la presencia de genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos y de sus productos en la actividad antimicrobiana en cepas de *Bacillus* de origen vegetal.** L. Mora, J. Cabrefiga, B. Sitjà y E. Montesinos
- 10:00 – 10:15
S6.5 **La producción de péptidos antimicrobianos sintéticos en semillas de arroz transgénico confiere resistencia a la infección por bacterias fitopatógenas.** L. Montesinos, M. Bundó, E. Izquierdo, E. Badosa, S. Campo, B. San Segundo, L. Feliu, M. Planas, E. Bardají, M. Rossignol, M. Coca y E. Montesinos
- 10:15 – 10:30
S6.6 **Desarrollo de una plataforma para la prospección masiva de efectos adversos en librerías de nuevos antimicrobianos, bioplaguicidas y biofertilizantes.** E. Badosa, L. Martínez, B. Gascón, O. Hanane y E. Montesinos
- 10:30 – 10:45
S6.7 **Evaluación de estrategias de aplicación de péptidos antimicrobianos para el control de la estemfiliosis del peral.** M. Puig, L. Ruz, C. Moragrega, E. Montesinos y I. Llorente
- 10:45 - 11:15** **Pausa para café**
- 11:15 – 13:00** **Sesión VII (S7).**
Moderadores: Raúl Rivas y Concepció Moragrega
- 11:15 – 11:30
S7.1 **Interacciones multitróficas en la rizosfera de aguacate de la cepa de biocontrol *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 con el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* CH53.** C.E. Calderon, N. Bonilla, V.J. Carrión, A. de Vicente y F.M. Cazorla
- 11:30 – 11:45
S7.2 **Evaluación de la capacidad supresora de las enmiendas con cáscara de almendra y potenciales genes implicados en dicha actividad.** C.M. Vida-Hinojosa, A. de Vicente, J.C.

Codina, N. Bonilla y F.M. Cazoria

- 11:45 – 12:00
S7.3 **La inoculación con *Phyllobacterium* aumenta el rendimiento de los cultivos de fresa.**
J.D. Flores-Félix, M. Marcos-García, E. Menéndez, L.P. Rivera, P. Martínez-Hidalgo, L. Celador-Lera, P.F. Mateos, E. Velázquez, E. Martínez-Molina y R. Rivas
- 12:00 – 12:15
S7.4 **Uso de *Rhizobium cellulosilyticum* como co-inoculante en *Phaseolus vulgaris* L. A.**
Díez-Méndez, E. Menéndez, J.D. Flores-Félix, L.P. Rivera, L. Celador-Lera, M. Marcos-García, E. Rivas-Sánchez, E. Velázquez, E. Martínez-Molina, R. Rivas y P.F. Mateos
- 12:15 – 12:30
S7.5 **Los nódulos de *Lotus corniculatus* son una fuente de obtención de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.** M. Marcos-García, E. Menéndez, L. Celador-Lera, L.P. Rivera, E. Martínez- Molina, P.F. Mateos, E. Velázquez y R. Rivas
- 12:30 – 12:45
S7.6 **Capacidad fijadora de nitrógeno de *Micromonospora*.** P. Martínez Hidalgo, J. Olivares, A. Delgado, E. Bedmar y E. Martínez-Molina
- 12:45 - 13:00
S7.7 **Diversidad de microorganismos endófitos en diferentes zonas de *Zea mays*.** L. Celador-Lera, J.D. Flores-Félix, L.P. Rivera, E. Martínez- Molina, P.F. Mateos, E. Velázquez y R. Rivas

13:00 Clausura de la reunión científica MIP'13.

Presidente del Comité organizador MIP'13: Emilio Montesinos (UdG)

Presidente del MIP: Antonio de Vicente Moreno (UMA)

Miércoles, 10 de abril

SESIÓN I

Moderadores: Emilia López-Solanilla y Rafael Rivilla.

SAGRA: Una nueva herramienta para el análisis de genomas de bacterias asociadas a plantas

P.M. Martínez* ^{1,2}, C. Ramos², E. López-Solanilla¹, A. de Vicente², P. Rodríguez-Palenzuela¹

¹ *Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas U.P.M. – I.N.I.A. Parque Científico y Tecnológico de la U.P.M. Campus de Montegancedo 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)*

² *Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC). Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos, 29071 Málaga*

Las nuevas tecnologías de secuenciación han supuesto una disminución muy significativa de los costes de secuenciación de genomas completos, haciéndolas muy asequibles para genomas bacterianos. Pese a la gran cantidad de información que pueden proporcionar estas técnicas, el análisis bioinformático de genomas sigue presentando considerables dificultades.

SAGRA (Suite de Anotación de Genomas Relevantes en Agricultura) es un conjunto de herramientas bioinformáticas específicamente diseñadas para la identificación y el análisis de genes bacterianos potencialmente implicados en virulencia/control biológico. SAGRA implementa el paradigma de programación orientada a objetos para:

- 1) Mantener una base de datos (BBDD) de factores bacterianos de interacción con plantas. Dicha BBDD es curada y actualizada mensualmente mediante un protocolo manual de búsqueda en publicaciones relevantes.

- 2) Importar, mediante objetos de BioPerl, información de BBDD externas (NCBI, UNIPROT, PFAM), así como anotaciones de genomas bacterianos asociados a plantas.

- 3) Combinar dicha información para, mediante una estrategia mixta basada en BLAST, HMMER, Gene Ontology y búsquedas semánticas, identificar genes potencialmente implicados en virulencia/control biológico tales como efectores, toxinas, antibióticos, enzimas extracelulares, hormonas vegetales, adhesinas, sideróforos, etc... así como en mediación de otros fenómenos fundamentales para la bacteria, tales como receptores quimiotácticos, bombas de eflujo, sistemas de secreción, reguladores transcripcionales y producción de biofilms.

Disección de los genomas de los agentes de biocontrol *Bacillus* spp. UMAF6614 y UMAF6639

M.C. Magno^{1*}, E. Arrebola¹, D. Romero¹, H. Zeriuoh¹, L. García-Gutiérrez¹, A. de Vicente¹, C. Ramos¹, P. Rodríguez-Palenzuela², A. Pérez-García¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Bulevar Louis Pasteur 31, 29071 Málaga. E-mail: conchitamagno@uma.es*

²*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid).*

Algunos miembros del género *Bacillus* presentan ciertas características beneficiosas para su utilización como agentes de biocontrol. Entre estas ventajas cabe destacar la producción de compuestos insecticidas y antimicrobianos así como la promoción del crecimiento y la inducción de respuestas de defensa de la planta hospedadora. En trabajos previos de nuestro grupo se seleccionaron las cepas de *Bacillus* spp. UMAF6614 y UMAF6639, las cuales mostraron los mejores resultados en cuanto a capacidad antagonista frente al hongo fitopatógeno *Podospaera fusca*, también conocido como oídio de las cucurbitáceas. Además, se demostró que uno de los principales mecanismos de acción en este proceso de biocontrol consiste en la producción de lipopéptidos de las familias de las fengicinas e iturinas. Con el fin de conocer el verdadero potencial de estas cepas como agentes de control biológico, se ha planteado como objetivo de este trabajo la secuenciación y el análisis de los genomas de ambas cepas. En primer lugar, se ha llevado a cabo un análisis filogenético mediante la técnica *multilocus* en el que se emplearon secuencias parciales de diferentes genes *housekeeping*, lo que permitió identificar estas dos cepas a nivel de especie con una mayor precisión. Posteriormente, se realizó un análisis comparativo con cepas filogenéticamente cercanas con el fin de conocer las regiones del genoma comunes y específicas de las dos cepas de estudio. La identificación de regiones específicas para cada cepa, permitió desarrollar métodos de detección de las mismas rápidos y eficaces mediante PCR. Por último, mediante la anotación automática de ambos genomas y el análisis comparativo con otros genomas disponibles, se ha realizado una búsqueda de genes posiblemente implicados en los procesos generales de biocontrol, ya sea mediante mecanismos de interacción con la planta o de acción antagonista directa sobre el patógeno. Para aquellos genes que despiertan mayor interés, como una serie de operones/genos desconocidos, se realizarán estudios funcionales. En este sentido, hemos empezado por estudiar la transcripción de estos genes desconocidos.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del anterior Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01) y de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (P10-AGR-5797), cofinanciados con fondos FEDER (EU).

Papel de surfactina en la formación de biopelículas de *Bacillus in planta*

H. Zerriouh*, L. García-Gutiérrez, A. de Vicente, J.C. Codina, D. Romero, A. Pérez-García

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Bulevar Louis Pasteur 31, 29071 Málaga. E-mail: hzerriouh@uma.es

La capacidad de biocontrol de la mayoría de las especies de *Bacillus* ha sido directamente relacionada con la producción de moléculas que inhiben el crecimiento de los patógenos. A modo ilustrativo, entre el 4 y el 8 % de los genomas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* está dedicado a la síntesis de antibióticos, lo que les confiere la capacidad de producir más de dos docenas de antibióticos con estructuras muy variadas. Entre los antibióticos producidos por *Bacillus*, los lipopéptidos han recibido una especial atención por su amplio rango de acción contra patógenos fúngicos y bacterianos responsables de causar enfermedades en raíces, partes aéreas y en post-cosecha. El principal mecanismo de acción de los lipopéptidos es la antibiosis, aunque también pueden inducir los mecanismos de defensa de la planta (resistencia sistémica inducida) y mediar la eficiente colonización y permanencia de las bacterias en las superficies de las plantas.

En trabajos anteriores demostramos que dos cepas de *B. subtilis* UMAF6614 y UMAF6639 producían lipopeptidos pertenecientes a las familias de las fengicinas, iturinas y surfactinas, y confirmamos la implicación de fengicinas e iturinas en la capacidad de control de oídio de cucurbitáceas (*Podosphaera fusca*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*) y podredumbre blanda (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). En estos estudios, las surfactinas no mostraron actividades antifúngica o antibacteriana, sin embargo, mutantes defectivos en la producción de surfactina perdieron parcialmente la capacidad de control en ensayos de biocontrol en hojas. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que las surfactinas son esenciales para la eficiente colonización y formación de biofilms sobre hojas de melón, ambas características deseables en un agente de biocontrol eficiente. El objetivo de este trabajo es evaluar el papel de los lipopéptidos y en especial de la surfactina en la formación de la matriz extracelular de la biopelícula producida *in planta* por las cepas de *Bacillus*. Para ello, actualmente estamos realizando estudios de inmunomicroscopía electrónica de barrido, usando anticuerpos específicos para la proteína específica TasA de la matriz extracelular de las biopelículas de *Bacillus*.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

Implicación de la celulasa CelC2, en la formación de biofilm y su importancia en la infección y colonización en plantas de interés agroalimentario

L. P. Rivera^{1*}, E. Menéndez¹, R. Rivas¹, E. Velázquez¹, Y. G. Yanni², E. Martínez-Molina¹, F. B. Dazzo³, A. Squartini⁴, P. F. Mateos¹.

¹Departamento de Microbiología y Genética, CIALE, Universidad de Salamanca, España.

²Sakha Agricultural Research Station, Kafr El-sheikh 33717, Egypt. ³Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, USA.

⁴Departamento de biotecnología Agraria, Universidad de Padova, Italia.

La mayor parte del conocimiento del papel biológico de la biosíntesis de celulosa se ha realizado en la interacción bacterias-plantas. La producción de celulosa en *A. tumefaciens* facilita la adherencia a las raíces, y cepas mutantes que sobre-producen celulosa adquieren la capacidad de generar biofilms muy densos (Ramey et al. 2004). Los biofilms son los estilos de vida más exitosos en la Tierra. Son consorcios multicelulares donde las células están embebidas en una matriz extracelular conformada principalmente por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. La matriz extracelular conforma el 90% del biofilm proporcionando estabilidad mecánica y mediando la adherencia a las superficies. A su vez, la matriz extracelular provee un polímero tridimensional que transitoriamente inmoviliza las células y las mantiene próximas en el espacio. (Flemming et al. 2010, Kjelleberg & Givskov 2007). El crecimiento en biofilm proporciona muchas ventajas para las bacterias, incluyendo una mayor resistencia a los estreses ambientales, como la desecación, oxidación, radiaciones ultravioletas y compuestos antimicrobianos, así como a las defensas del huésped, antibióticos y cationes metálicos (Flemming et al. 2010). Una característica de los rizobios es su capacidad de formar agregados celulares, donde su exopolisacárido juega un papel fundamental, para adherirse a las raíces de las plantas y a partículas en la rizosfera evitando así ser desplazados de sus nichos ecológicos (Fujishige et al. 2006) Sin embargo, los diferentes polímeros de la matriz del biofilm no se han definido en *Rhizobium*, y las contribuciones de estos componentes para la integridad de la matriz son poco conocidas a nivel molecular.

En general, las técnicas comunes de aislamiento de exopolisacáridos se han centrado en exopolisacáridos solubles, eliminando los insolubles. Este es el caso de la celulosa que es un componente importante de la matriz de muchas bacterias. En particular, se sabe que la celulosa juega un papel importante en los biofilms relacionados con las infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* y *Salmonella entérica* subespecie entérica serovariedad Typhimurium (Zogaj et al. 2001, Romling et al. 2002, Wang et al. 2006). También, estudios realizados en rizobios sugieren que la celulosa es parte importante del exopolisacárido. Cepas mutantes que tienen interrumpido o que sobreexpresan el gen *celC* (Robledo et al. 2008, Robledo et al. 2011) tienen aumentada o reducida la producción de exopolisacárido, respectivamente.

El objetivo de este trabajo es relacionar la participación de la celulasa en la producción de exopolisacárido insoluble y su relación directa con la formación de biofilms en superficies abióticas (Arena, Vidrio) y superficies bióticas analizando la implicación directa en la colonización e infección de plantas de interés agroalimentario. (*Trifolium repens*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*).

La expresión heteróloga de la celulasa rizobiana CelC2 afecta el desarrollo del pelo radicular y del nódulo en *Medicago truncatula*

E. Menéndez^{1*}, A. Breakspear², M. Robledo^{1,3}, E. Velázquez¹, E. Martínez-Molina¹, R. Rivas¹, J.D. Murray², P.F. Mateos¹

¹Departamento de Microbiología y Genética. Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrícolas. Universidad de Salamanca.

²Department of Cell and Development Biology. John Innes Centre. Norwich. UK.

³LOEWE Research Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO), Marburg, Germany.

e-mail: esthermenendez@usal.es

La asociación simbiótica *Rhizobium* – leguminosa es una de las más estudiadas entre las interacciones planta – microorganismo, ya que supone la más eficiente fuente biológica de Nitrógeno en fertilizantes agrícolas. Durante el establecimiento de esta interacción, tanto la planta como la bacteria mantienen un complejo diálogo molecular, seguido de un intercambio recíproco de señales. En respuesta a los Factores de Nodulación producidos por la bacteria, los pelos radiculares se deforman en la punta formando unas estructuras denominadas “curlings”. Los rizobios penetran en la célula y mediante canales de infección llegan a la zona de formación del nódulo. En este punto se liberan y se diferencian en bacteroides rodeados de una membrana celular vegetal, formando el simbiosoma donde llevan a cabo su función fijadora de Nitrógeno (Jones *et al.*, 2007). Un paso clave en este proceso es la erosión localizada de la pared celular vegetal, que debe estar regulada para evitar la lisis celular del hospedador. En nuestro grupo de investigación se ha descrito que la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843 es esencial en el proceso de infección primaria, ya que puede degradar el ápice de los pelos en desarrollo de su hospedador específico, *Trifolium repens*, formados por celulosa no cristalina (Robledo *et al.*, 2008). Una sobreexpresión de la enzima CelC2 origina nódulos y pelos radicales aberrantes en las raíces de trébol, como consecuencia de la incontrolada degradación de la celulosa no cristalina, localizada en las paredes celulares tanto del ápice del pelo radical como en el final del canal de infección (Robledo *et al.*, 2011). En este trabajo, nos propusimos analizar el efecto de esta celulasa en el proceso simbiótico modelo *Ensifer* – *Medicago*. Para ello, se construyó un mutante que expresa constitutivamente la celulasa CelC2 en *Ensifer meliloti* 1021, cepa que en su genoma no contiene homólogos al gen *celC*, codificante para dicha enzima. Los resultados obtenidos nos indican que una expresión heteróloga de dicha endoglucanasa en *E. meliloti* 1021 induce fenotipos simbióticos alterados en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*. En plantas inoculadas con este mutante superproductor, 1021C2⁺, se observa un incremento significativo en el número de redirecciones polares en los pelos radiculares. También se observa un incremento significativo en el número de nódulos aberrantes no fijadores.

Jones *et al.*, (2007) Nature Reviews 5: 619-633.

Robledo *et al.*, (2008) PNAS 105: 7064-7069.

Robledo *et al.*, (2011) MPMI 24:7, 798:807.

Respuesta a elevados niveles de c-di-GMP en bacterias que interactúan con planta de manera simbiótica y patogénica

H. A. Prada-Ramírez*, D. Pérez-Mendoza, L. Romero-Jiménez, I. M. Aragón, C. Ramos, J. Sanjuán, M. T. Gallegos

*Departamento de Microbiología del suelo y sistemas simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC)
maritrini.gallegos@eez.csic.es*

El c-di-GMP es un segundo mensajero implicado en la regulación de numerosas funciones bacterianas, entre las que destacan muchas implicadas en la interacción con eucariotas como la virulencia, motilidad, agregación, adhesión y formación de biopelículas. Tanto las bacterias fitopatógenas como las mutualistas, ejercen un control estricto de las funciones implicadas en la interacción con la planta, lo cual les permite pasar de un modo de vida libre a otro más ventajoso en estrecha relación con su hospedador. En este trabajo hemos realizado un estudio comparativo de diferentes funciones bacterianas reguladas por c-di-GMP en bacterias que interactúan con plantas, usando como modelo bacterias fitopatógenas (*P. syringae* pv. tomato, pv. phaseolicola y *P. savastanoi*) y simbióticas (*Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*).

Como primera aproximación al estudio del papel que desempeña este segundo mensajero, hemos generado un incremento artificial en los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de una diguanilato ciclasa heteróloga, PleD*, y para verificar la actividad de dichas construcciones y su efecto sobre los niveles de c-di-GMP, hemos cuantificado los niveles intracelulares de este segundo mensajero mediante técnicas espectroscópicas. A continuación, hemos llevado a cabo una caracterización fenotípica de las cepas recombinantes, observando que un aumento de las concentraciones intracelulares de c-di-GMP provoca una disminución de la motilidad y un incremento en la formación de biopelículas y en la producción de exopolisacáridos en todas las cepas ensayadas. Asimismo, se ha estudiado el impacto de la señalización por c-di-GMP durante el establecimiento de asociaciones planta-bacteria mutualistas y patogénicas.

Identificación y caracterización de genes del agente de biocontrol *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en la micofagia de *Rosellinia necatrix*

J.I. Crespo-Gómez^{1,2*}, C. Pliego³, A. de Vicente¹, C.E. Calderón¹, C. Ramos², F.M. Cazorla¹

¹Departamento de Microbiología y ²Área de Genética, Universidad de Málaga. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. ³ IFAPA-Centro de Churriana s/n, 29140-Churriana- Málaga. ¹E-mail: cazorla@uma.es, ²E-mail: crr@uma.es.

Pseudomonas pseudoalcaligenes AVO110 es un agente de biocontrol seleccionado frente a la podredumbre blanca radicular del aguacate causada por *Rosellinia necatrix*. Su mecanismo de acción se basa en la competición por nicho y nutrientes. Sin embargo, la característica más novedosa que muestra este agente de biocontrol, es su capacidad de colonizar las hifas de este hongo fitopatógeno de forma competitiva, alimentándose de los metabolitos exudados durante el crecimiento del mismo. Estos fenotipos son característicos de la micofagia bacteriana de tipo biotrófico extracelular pasivo.

En este sentido, con el objetivo de identificar y caracterizar genes de *P. pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en su comportamiento micofágico frente a *R. necatrix*, se llevó a cabo una estrategia de genómica funcional denominada *Signature Tagged Mutagenesis* (STM). Mediante esta estrategia, se analizó la capacidad de mutantes de AVO110, generados por la inserción del transposón mini-Tn5km2, de multiplicarse y sobrevivir durante 48 horas en medio BM-RE, un medio mínimo que contiene compuestos exudados por las hifas de *R. necatrix*. A partir de 3408 mutantes de esta cepa, se seleccionaron un total de 95 mutantes portadores de una única copia del transposón, cuya competitividad y capacidad de multiplicarse y sobrevivir en medio rico LB y en BM-RE se analizó con respecto a la cepa silvestre, seleccionándose finalmente un total de 26 mutantes denominados mutantes GAM (*Growth Attenuated Mutants*), cuya competitividad se encuentra reducida exclusivamente en medio BM-RE. Las funciones afectadas en los mutantes seleccionados se han organizado en cinco categorías: metabolismo (GAM-1; GAM-5; GAM-9; GAM-10; GAM-11; GAM-13; GAM-14; GAM-17; GAM-18; GAM-21), colonización (GAM-3; GAM-15; GAM-16; GAM-22; GAM-24; GAM-26), regulación (GAM-6; GAM-8; GAM-12; GAM-20; GAM-23), defensa (GAM-2; GAM-4; GAM-19) y proteínas hipotéticas (GAM-7; GAM-25). En relación al biocontrol, las funciones relacionadas con la colonización y la defensa frente al hongo se muestran como las más prometedoras. Por ello, se ha iniciado el análisis de las capacidades de persistir y colonizar el sistema radicular de aguacate, así como el micelio fúngico, en los mutantes incluidos en estas dos categorías. También se está llevando a cabo un análisis de la formación de biopelículas *in vitro*, así como ensayos de biocontrol *in vivo*, utilizando para ello derivados de estos mutantes marcados con la proteína verde fluorescente (GFP).

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (AGL-2011-30354-C02-01), cofinanciado por FEDER.

Estudio del transcriptoma de *Trichoderma atroviride* en interacción con *Verticillium dahliae*

I. Carrero-Carrón^{1,2*}, R. M. Jiménez-Díaz², R. Hermosa¹, E. Monte¹

¹Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor, C/ Río Duero, 12; 37185 Salamanca, España

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba e Instituto de Agricultura Sostenible, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3. Edificio C4 'Celestino Mutis', Campus de Rabanales, Ctra. Madrid km 396; 14071 Córdoba, España

*i.carreroc@gmail.com

Algunas estirpes de especies de *Trichoderma* se utilizan como agentes de biocontrol en agricultura por su reconocida capacidad para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos y oomicetos. El cultivo del olivo es uno de los más importantes y tradicionales de la Cuenca Mediterránea, y España es el primer país olivarero a nivel mundial. La Verticilosis causada por el hongo vascular y necrotrofo obligado *Verticillium dahliae* es la principal enfermedad del olivo en nuestro país. En ensayos antifúngicos *in vitro* (duales y sobre membranas), realizados con varias estirpes de diferentes especies de *Trichoderma* y aislamientos de los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de *V. dahliae*, se seleccionaron *T. atroviride* T11 como estirpe antagonista y el aislado D *V. dahliae* V-138 I como patógeno diana. Con objeto de profundizar en el antagonismo de *Trichoderma* sobre *V. dahliae*, hemos utilizado un *microarray* de oligonucleótidos de alta densidad (HDO) para analizar el transcriptoma de *T. atroviride* T11 cuando se enfrenta con *V. dahliae* V-138 I. El *microarray* se construyó utilizando los tres genomas disponibles de *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. reesei* y *T. virens*).

Los aislados T11 y V-138 I se cultivaron enfrentados y se recogió micelio de T11 del borde de la colonia de placas sin patógeno (control), del borde de la colonia que estaba a 5 mm de distancia de la colonia del patógeno (cerca) y de la zona de interacción *Trichoderma*-patógeno de placas donde T11 había crecido 5 mm sobre la colonia del patógeno (sobre). El RNA obtenido del micelio recogido de cada una de estas tres condiciones se utilizó para preparar los cDNAs que se amplificaron, marcaron y utilizaron para hibridar, en triplicado, los HDOs de *Trichoderma*.

El análisis de los *microarrays* mostró que con unos valores FC (*fold change*) >2 y FDR: 0,2, había 218 genes de T11 que se expresaban diferencialmente en las situaciones de “cerca de V-138 I” y “sobre V-138 I”, respecto al “control”. De ellos, 172 fueron comunes en “sobre” frente a “cerca” y “sobre” frente a “control”; 23 genes diferenciales fueron comunes a las situaciones “sobre” y “cerca” y otros 23 genes fueron exclusivos de “cerca”. Tras asignar términos GO y analizar estadísticamente los resultados, se observó que los procesos sobrerrepresentados cuando *T. atroviride* crece sobre *V. dahliae* son la proteólisis y el transporte.

Investigación financiada por el Proyecto AGR 6082 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

Miércoles, 10 de abril

SESIÓN II

Moderadores: Cayo Ramos y Inmaculada Larena.

Funciones controladas por el sistema NtrY/NtrX identificadas durante la caracterización de la movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*

J. Nogales, N. Calatrava*, K. Ameztoy, B. van Steenberg, M.J. Soto

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada
E-mail: mariajose.soto@eez.csic.es

Está ampliamente aceptado que la mayoría de las bacterias pasan gran parte de su ciclo de vida asociadas a una superficie. De hecho, el estudio de comunidades microbianas sésiles o biofilms es el objetivo de numerosas investigaciones. La capacidad de una bacteria de desplazarse sobre una superficie puede afectar el inicio y posterior desarrollo del biofilm y en consecuencia, posibles interacciones con un hospedador. A pesar de esto, el conocimiento existente sobre las bases moleculares que rigen el movimiento en superficie de bacterias que interaccionan con plantas es escaso.

Con el objetivo de identificar nuevos componentes bacterianos importantes en la colonización e invasión de las plantas, hemos abordado el estudio de las bases moleculares y genéticas del movimiento en superficie de la bacteria modelo *Sinorhizobium meliloti*, endosimbionte fijador de N de plantas de alfalfa. En una aproximación genética, se identificó el transposante GNS577, derivado de la cepa GR4 de *S. meliloti*, incapaz de mostrar desplazamiento en superficie en condiciones inductoras de motilidad *swarming*. La caracterización genética de este mutante ha demostrado que GNS577 se encuentra afectado en el sistema regulador de dos componentes NtrY/X implicado en regulación del metabolismo nitrogenado en distintas bacterias, entre ellas bacterias beneficiosas que interaccionan con plantas, y patógenas intracelulares de animales como *Brucella* donde el sistema NtrY/X se ha relacionado con su capacidad virulenta. GNS577 se caracteriza por mostrar un fenotipo pleiotrópico *in vitro*: además del ya mencionado defecto en desplazamiento sobre una superficie, comparado con la cepa parental GNS577 muestra menor motilidad tipo *swimming*, presenta una apariencia mucho más mucosa, una capacidad de formar biofilms significativamente incrementada, y mayor sensibilidad a estrés salino. *In planta*, aunque GNS577 es capaz de inducir nódulos fijadores de N, su capacidad para competir con la cepa silvestre por la invasión de los nódulos se encuentra muy reducida.

Nuestros datos sugieren que en *S. meliloti* NtrY/X es un sistema regulador clave en la adaptación de la bacteria del modo de vida libre al simbiótico, a través del control coordinado de fenotipos como motilidad o producción de polisacáridos, en respuesta a distintas señales medioambientales que podrían ser detectadas por NtrY.

Financiado por MICINN (BIO2010-18005) y Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia CVI-03541)

Contribución a la especificidad de huésped de los efectores del T3SS de *Pseudomonas savastanoi* HopAO1 y HopAO2, dos hipotéticas proteínas tirosina fosfatasas

M.P. Castañeda-Ojeda^{1*}, E. López-Solanilla², C. Ramos¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es

La secuenciación y anotación del genoma de la cepa de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335, identificó dos genes, *hopAO1* (plásmido pPsv48B) y *hopAO2* (cromosómico), codificadores de posibles efectores del T3SS (T3Es). Ambos T3Es pertenecen a la familia de enzimas denominada *proteína tirosina fosfatasas* (PTPs), caracterizada por la presencia de un dominio PTP: [LIVMF]-H-C-X(2)-G-X(2)-R-[STC]-[STAGP]. Tras confirmar que ambas proteínas se translocan a través del T3SS de Psv, y que su expresión es dependiente del factor sigma alternativo HrpL, se construyó un mutante de pérdida de función PsvD*hopAO1*, así como una cepa curada de los plásmidos pPsv48A y pPsv48B (PsvDpPsv48AB). Mientras que PsvDpPsv48AB induce en plantas de olivo tumores de tamaño muy inferior a los inducidos por la cepa silvestre, el tamaño y morfología de los tumores generados por PsvD*hopAO1* son semejantes a los inducidos por la cepa silvestre, aunque muestran una necrosis temprana del tejido tumoral. Por otro lado, la competitividad de la cepa PsvD*hopAO1* se encuentra reducida tanto *in planta* como en medio rico LB. Todos los fenotipos observados en el mutante PsvD*hopAO1* se complementan con la expresión en el mismo del gen *hopAO1* silvestre. En la actualidad, se está abordando el estudio del papel de HopAO1 y HopAO2 en la especificidad de huésped de Psv y otras cepas pertenecientes al complejo *P. syringae*. Para ello, cada uno de estos dos genes se ha expresado en las cepas siguientes: 1) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) 1448A, cepa secuenciada completamente y filogenéticamente cercana a Psv; se analiza el efecto de la expresión heteróloga de los T3Es sobre el desarrollo de la enfermedad y competitividad de las cepas en plantas de judía (*Canadian wonder*). 2) un derivado de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000, denominado D28E y carente de 28 de los genes codificadores de T3Es de esta cepa; se visualiza la aparición de la respuesta hipersensible (HR) inducida en una planta no huésped (*Nicotiana tabacum*), utilizando el fondo genético de una bacteria fitopatógena. 3) una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (Pf5) en la que, además de los T3Es de Psv, se expresan los genes necesarios para la biosíntesis del T3SS; se analiza el efecto de la expresión individual de un T3E concreto en la HR inducida en *N. tabacum*, utilizando el fondo genético de una bacteria no patógena. En este caso, se analizan respuestas de defensa asociadas a la inmunidad innata, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la deposición de callosa. 4) una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que expresa fusiones de los T3Es de Psv a la GFP, con el objetivo de estudiar la localización subcelular de los mismos en plantas de *N. benthamiana*.
Financiación: AGL2011-30343-C02-01 (MINECO), cofinanciado por FEDER.

Identificación de nuevos genes implicados en la producción de faseolotoxina mediante mutagénesis al azar de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola

L. Martínez del Pino*, L. Bardaji, J. Murillo

*Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad
Pública de Navarra, 31006 Pamplona
E-mail: jesus.murillo@unavarra.es*

La faseolotoxina es una toxina antimetabolito producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Pph) y que inhibe la actividad de enzimas clave en las rutas de biosíntesis de arginina y poliaminas en un amplio espectro de organismos. Se ha identificado una región genómica esencial para la biosíntesis de faseolotoxina, que comprende 22-23 genes (cluster Pht, 23 kb) agrupados en una isla genómica (Pht-PAI, 38 kb). Además, se sabe que existen diversos genes localizados fuera de la Pht-PAI que también son esenciales para la producción de la toxina. En este trabajo se ha abordado, por tanto, la identificación de genes implicados en la regulación del cluster Pht o en la biosíntesis de faseolotoxina. Para ello se llevó a cabo una mutagénesis aleatoria de la cepa modelo Pph 1448A con el transposón IS- Ω -Km/hah, que puede producir la inactivación de genes por inserción o bien la activación de genes adyacentes. Se han generado 17.480 mutantes en 190 mutagénesis independientes. La producción de faseolotoxina se evaluó a las 24 y 48 horas de incubación a 18 °C en medio mínimo PMS (glucosa 2 g/L) Mediante el ensayo de inhibición del crecimiento de *E. coli*. El fenotipo de los clones supuestamente afectados en la biosíntesis de toxina fue comprobado mediante ensayos similares utilizando los medios mínimos PMS y HSM (glucosa 20 g/L). El punto de inserción del transposón en cada uno de los mutantes resultantes se identificó mediante PCR y secuenciación. La mutagénesis originó un 0,8 % de auxótrofos (133 mutantes) con inserciones en genes de biosíntesis de aminoácidos, vitaminas y bases nitrogenadas, así como un 0,5 % de mutantes (89 mutantes) que no produjeron faseolotoxina en PMS. Estos 89 mutantes se dividieron en dos categorías: A) 58 mutantes que no produjeron faseolotoxina en ninguna de las condiciones ensayadas (negativos absolutos), y B) 31 mutantes que no produjeron faseolotoxina en PMS pero sí en HSM (negativos parciales). En el grupo de negativos absolutos se identificaron 26 genes afectados por la inserción del transposón, de los cuales 13 genes se encuentran en el cluster Pht y dos son reguladores globales (*gacA* y *gacS*), mientras que los 11 genes restantes no han sido implicados previamente en la biosíntesis de faseolotoxina. Entre estos 11 genes se encuentran algunos que codifican posibles lipoproteínas, enzimas de biosíntesis de serina, N-acetiltransferasas o proteínas hipotéticas. Actualmente, se están llevando a cabo experimentos de mutagénesis dirigida y complementación para evaluar el papel de estos genes en el proceso de biosíntesis de faseolotoxina.

Colonización y respuesta defensiva inducida por el agente de control biológico *Penicillium oxalicum* en el huésped

M. Villarino^{1,2}, A. De Cal¹, Y. Herranz¹, E. A. Espeso², P. Melgarejo¹, I. Larena*¹

¹Departamento de Protección Vegetal, SGIT-INIA, Carretera de La Coruña 8,00, 28040 Madrid. E-mail: ilarena@inia.es

²Departamento de Medicina Molecular y Celular, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

Penicillium oxalicum (PO) ha demostrado ser un eficaz agente de control biológico (ACB) frente a diferentes enfermedades de plantas hortofrutícolas. El objetivo de este trabajo es estudiar el patrón de colonización de las raíces de tomate por el ACB e incrementar nuestro conocimiento del modo de acción del mismo. Se ha desarrollado un método de transformación y de selección de cepas recombinantes de PO basado en protocolos ya establecidos en *Aspergillus* y otras especies de *Penicillium*. Como marcadores genéticos de selección se realizó una aproximación para generar mutantes auxótrofos en la biosíntesis de pirimidinas, aislando específicamente mutaciones en el gen homólogo *pyrG*, que codifica para orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMPdecase). Se aislaron varias cepas mutantes con un fenotipo de auxotrofia de pirimidinas, fácilmente suplementadas con una mezcla de uracilo y uridina. Se puso a punto un protocolo de producción de protoplastos, y demostramos que dichas mutaciones *pyr-* mapean en el gen homólogo *pyrG*. Por otro lado, los plásmidos autorreplicativos, de la serie pRG3-AMA, pueden ser mantenidos en PO lo que nos ha permitido abordar trabajos de etiquetado con proteína fluorescente roja así como iniciar los estudios de interacción del ACB con plantas de tomate a través de microcopia confocal. La transformación no afectó a la ecofisiología del mismo ni a su capacidad de biocontrol cuando se comparó con la cepa silvestre.

Se confirma la inducción de resistencia al patógeno en las plantas de tomate tratadas como uno de los modos de acción de PO previamente descrita. Con el objetivo de estudiar la capacidad de *P. oxalicum* de activar los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana*. Previos resultados han mostrado que la presencia de conidias de PO inducen la rápida liberación de Calcio en *A. thaliana* activando la inducción de genes relacionados con la defensa vegetal incluso a concentraciones de 3×10^5 conidias/ml, lo que nos indicaría la activación de la ruta autoinmune en la planta como consecuencia de la aplicación de PO. Posteriormente, se estudió la inducción de los genes WRKY33 y MPK3, descritos como marcadores de la activación de la inmunidad vegetal, tanto en plantas silvestres como en mutantes en el receptor *bak1*, relacionado tanto con la respuesta inmune como con la respuesta a brasinosteroides. De los resultados obtenidos podemos concluir que PO es un elicitador de las respuestas defensivas de *A. thaliana*, siendo capaz de activar las mismas a concentraciones de 1×10^6 conidias/ml.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2010-00093 del INIA y el convenio CC09-074-C5-5.

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*”: bacteria asociada a desarreglos vegetativos en apio y zanahoria

G.R. Teresani^{1*}, E. Bertolini¹, A. Alfaro-Fernández², M.I. Font², M.C. Martínez¹, F. Tanaka³, E.W. Kitajima³, M.M. López¹, M. Cambra¹

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: teresani@ivia.es*

²*Grupo de Virología Vegetal. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.*

⁵*Dpto. de Fitopatología e Nematología ESALQ/USP. Piracicaba-S.P. Brasil.*

En 2008 se observaron en Villena (Alicante) desarreglos vegetativos en apio (*Apium graveolens* L.) y zanahoria (*Daucus carota*). Se caracterizaban por brotaciones excesivas y retorcimiento de pencas en apio y amarilleos, enrojecimientos y deformación de raíces en zanahorias. Los primeros análisis revelaron la presencia de fitoplasmas de los grupos “stolbur” y “Aster yellows”, algunos virus y posteriormente también se detectó la bacteria “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (CaLsol). Los mismos síntomas se han observado en años sucesivos y los análisis realizados permiten asociar la bacteria “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (CaLsol), y no otros patógenos, con la sintomatología observada. Esta bacteria es Gram negativa, no cultivable, restringida al floema y transmitida, de forma vertical (transovárica) y horizontal por distintas especies de psílidos vectores. Para la detección sensible y específica de la bacteria en material vegetal y vectores se han diseñado y validado iniciadores, una sonda TaqMan para PCR en tiempo real y un kit basado en métodos directos de preparación de muestras. Para su validación, en pruebas intralaboratorio, se han calculado parámetros estadísticos de diagnóstico resultando una precisión de 100%. Mediante análisis estadísticos se ha asociado la presencia de desarreglos vegetativos en apio y zanahoria, con la detección de CaLsol por PCR en tiempo real. Además, en plantas de apio positivas por dicha técnica, se han detectado células típicas de “Ca. Liberibacter” mediante microscopia electrónica de barrido y de transmisión. La bacteria también ha sido detectada en psílidos visitantes (*Bactericera trigonica* y *Bactericera tremblayi*), capturados en trampas amarillas y brotes pegajosos en parcelas de apio y zanahoria. Las secuencias de CaLsol, obtenidas mediante PCR convencional, utilizando iniciadores del gen 16S rDNA y 50S rDNA han mostrado un alto porcentaje de identidad con las descritas en otros huéspedes de esta bacteria. Sin embargo, se han podido determinar dos nuevos haplotipos. La bacteria se ha transmitido por *Cuscuta campestris* de zanahoria y apio sintomáticos y positivos mediante PCR en tiempo real a *Vinca rosea*, tomate y zanahoria.

Actividades financiadas por la Consellería de Agricultura-GVA y proyectos IVIA (5301) e INIA (RTA2011000142-C03-00).

Análisis de los sistemas de quimiotaxis de *Pseudomonas*

***fluorescens* F113**

C. Muriel*, B. Jalvo, F. Martínez-Granero, M. Redondo-Nieto, M. Martín, R. Rivilla

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid
E-mail: rafael.rivilla@uam.es

La rizosfera, es un nicho ecológico propicio para el desarrollo de multitud de microorganismos debido a los exudados que la planta secreta a través de sus raíces. Estos microorganismos pueden establecer relaciones beneficiosas con la planta, como es el caso de las PGPRs, capaces promover su crecimiento o protegiéndolas frente a fitopatógenos. Por esta razón estas rizobacterias pueden tener diversos usos biotecnológicos en sistemas integrados planta/microorganismo. Para que estos microorganismos puedan realizar su acción beneficiosa, y por tanto sean aplicables biotecnológicamente, es fundamental que sean capaces de colonizar eficazmente la rizosfera, siendo la movilidad y la quimiotaxis unos de los factores más importantes para que se lleve a cabo este proceso. *Pseudomonas fluorescens* F113 fue aislada de la rizosfera de remolacha (*Beta vulgaris*) en Irlanda y coloniza efectivamente muchos tipos de plantas de interés agrícola, como el guisante (*Pisum sativum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Además esta cepa produce un potente antifúngico de amplio espectro, DAPG (2,4-diacetilfloroglucinol), por lo que ha sido utilizada como agente de biocontrol. También, ha sido modificada genéticamente para ser utilizada en la biorremediación de bifenilos policlorados. A partir de la secuenciación de su genoma completo se ha observado la existencia de genes de desnitrificación, así como la presencia de tres sistemas de quimiotaxis Che. Por este motivo decidimos comprobar la capacidad de esta cepa para crecer y moverse en condiciones anaerobias, utilizando nitrato y nitrito como aceptores de electrones alternativos al oxígeno. Además, quisimos profundizar en el conocimiento de algunos de los genes responsables de su capacidad quimiotáctica, realizando mutantes en el gen *cheA* de cada uno de los tres sistemas Che y analizando su movilidad tipo *swimming*. Los resultados obtenidos demuestran que los genes de desnitrificación son funcionales, pues *P. fluorescens* F113 es capaz de crecer en condiciones anaerobias, utilizando nitrato y nitrito como aceptores de electrones alternativos. También se demuestra que los tres sistemas Che son funcionales y no intercambiables, ya que las mutaciones llevadas a cabo en los genes *cheA* de cada uno de ellos, reduce su movilidad, siendo incluso inmóviles algunos de ellos. Una vez conocida la funcionalidad de los tres sistemas Che de quimiotaxis decidimos realizar ensayos de colonización competitiva de la rizosfera por parte de la estirpe silvestre *P. fluorescens* F113 frente a los tres mutantes afectados en los sistemas de quimiotaxis, permitiéndonos así averiguar la implicación de los mismos en el proceso. Los resultados que obtuvimos muestran que las tres cepas mutantes ensayadas presenten deficiencias en distinto grado en el proceso de colonización competitiva respecto a la cepa silvestre. Este análisis nos indica que los tres sistemas de quimiotaxis están implicados y son de gran importancia para que se produzca una colonización competitiva de la rizosfera por *P. fluorescens* F113.

Jueves, 11 de abril

SESIÓN III

Moderadores: Ramón Penyalver y Antonieta de Cal

La luz controla procesos claves para la virulencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

I. Río-Álvarez^{1*}, J.J. Rodríguez-Herva¹, P.M. Martínez^{1,2}, P. Rodríguez-Palenzuela¹, E. López-Solanilla¹

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Parque Científico y Tecnológico de la UPM. Campus de Montegancedo. 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain. UPM. E-mail: emilia.lopez@upm.es*

²*Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC)*

Pseudomonas syringae pv tomato DC3000 (PsPto) es el agente causal de la mancha bacteriana del tomate. PsPto habita en la filosfera del tomate; en esta ubicación específica en la planta, el patógeno está expuesto, entre otros factores ambientales, a la luz. La luz, además de constituir un ambiente estresante, actúa como una fuente de información sobre el momento del día que, a su vez, está relacionado con diferentes niveles de defensa de las plantas. En este trabajo se ha analizado la presencia de fotorreceptores de luz azul y roja en un grupo de *Pseudomonas*. Además, se ha estudiado el efecto de la luz blanca, azul y roja en diferentes fenotipos de PsPto. La luz blanca y en concreto su componente azul parecen inhibir la motilidad, la virulencia y la aparición de la respuesta hipersensible, mientras que promueven la agregación bacteriana y la adherencia a las hojas. El componente rojo y la oscuridad parecen ejercer el efecto contrario. Se ha analizado a través de la hibridación de micromatrices de ADN la respuesta de PsPto a un tratamiento de 10 minutos de luz blanca. Los resultados de este análisis confirmaron los fenotipos anteriormente observados y ofrecen una visión general del papel de la luz en el control de respuestas adaptativas y de los mecanismos de virulencia. Finalmente, el análisis fenotípico de un mutante de PsPto en el receptor de luz azul sugiere que la percepción de luz azul por esta bacteria juega un papel clave en la transición al estado patogénico.

Financiación: AGL-2009-12757 y AGL-2012-32516 (MINECO)

Supresión cruzada de respuesta de defensa como modelo de adaptación y evolución de los efectores de la familia HopZ

J.S. Rufián*, A. Lucia, C.M. Guevara, A.P. Macho, A. Zumaquero, J. Ruiz-Albert, C.R. Beuzón

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga E-29071
E-mail: cbl@uma.es*

La familia de efectores HopZ es una de las más diversas dentro de los secretomas de *Pseudomonas syringae*. Dentro de esta familia hay descritos cuatro efectores (HopZ1, HopZ2, HopZ3 y HopZ4) y a su vez HopZ1 posee tres alelos (HopZ1a, HopZ1b y HopZ1c). La gran diversidad existente en esta familia parece estar determinada por la fuerte respuesta de defensa mediada por genes R (ETI) que disparan en la mayoría de sus hospedadores. Esto representa una fuerte presión negativa que tendría como resultado una acumulación de cambios que les permitiría evadir los mecanismos de defensa de los hospedadores. Este proceso se conoce como patoadaptación, fenómeno del cual la familia de efectores HopZ es su paradigma.

La familia HopZ también muestra una de las mayores tasas de transferencia horizontal de todas las analizadas, con numerosos eventos de adquisición y pérdida, y readquisición de genes que codifican para diferentes miembros de la familia, lo cual apoya el que estos efectores estén sujetos a una fuerte selección negativa en la planta.

El modelo de evolución de esta familia, así como otros propuestos para otras familias de efectores, no tienen presente que la adaptación a un hospedador pueda estar determinada por la supresión mediada por efectores de la defensa disparada frente a otro efector del mismo patógeno. Un ejemplo de efector con esta función es VirPphA, un efector de *P. syringae* pv. phaseolicola capaz de suprimir la respuesta hipersensible (HR) disparada frente a otros efectores de este mismo patógeno. Además el caso de VirPphA no parece ser un caso aislado ya que la capacidad de suprimir defensas disparadas por efectores ha sido mostrada para numerosos efectores de *P. syringae*, si bien los mecanismos y dianas implicados no han sido descritos aún.

En este trabajo demostramos que, si bien los miembros de la familia HopZ expresados desde sus respectivas estirpes no disparan respuestas de defensa en los hospedadores de las mismas, las disparan en esos mismos hospedadores cuando son expresados heterológicamente desde otra estirpe. Nuestros resultados apoyan un modelo de adaptación al hospedador basado en la supresión cruzada por otros efectores, e incluyen la identificación de dichos efectores candidatos a suprimir las defensas disparada frente a los HopZ.

Características asociadas a los primeros estadios de infección de aislados españoles de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

J. Garita-Cambronero^{*1,3}, P. Sabuquillo¹, M. Sena¹, E. Ferragud¹, C. Redondo¹, A. Palacio-Bielsa², M.M. López³, J. Cubero¹

¹Departamento de Protección Vegetal, INIA. Ctra. de la Coruña km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: cubero@inia.es.

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.

El género *Xanthomonas* presenta características fenotípicas asociadas con el inicio de la infección, como son la síntesis de enzimas extracelulares, la producción del exopolisacárido xanthano, la motilidad y quimiotaxis y la capacidad para organizar estructuras tipo biopelícula. La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro, enfermedad causada por la bacteria de cuarentena *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), ha sido detectada en ocho provincias españolas en la última década. Los estudios epidemiológicos de la enfermedad demuestran que existe variabilidad entre cepas de *Xap*, que podría estar relacionada con diferencias en la patogenicidad y en sus primeras etapas de interacción con el huésped.

En este trabajo, veinticuatro cepas de *X. arboricola*, inicialmente identificadas como pertenecientes a los patovares *pruni* (22 cepas), *corylina* (1) y *populi* (1), procedentes de España (17 cepas), Francia (1), Holanda (3), Italia (1), Estados Unidos (1) y Nueva Zelanda (1), aisladas a partir de almendro, avellano, ciruelo, chopo, melocotón, piracanta y lauroceraso, han sido evaluadas para diversas características biológicas asociadas a la supervivencia y primeros estadios de infección, como son la utilización de compuestos de carbono, la capacidad de producir movimiento en superficie (swarming) y en medio semisólido (swimming) y la actividad surfactante.

De manera general, se observó un patrón de utilización de compuestos de carbono común en 14 de las cepas identificadas como *Xap*. El movimiento superficial presentó principalmente dos patrones fenotípicos, siendo el fenotipo dendrítico el predominante dentro del patovar *pruni*. La capacidad de movimiento en medio semisólido, así como la capacidad de generar actividad surfactante, fueron observadas en todas las cepas evaluadas, mostrando variación entre ellas.

Las cepas han sido caracterizadas molecularmente mediante un análisis multilocus a partir de las secuencias parciales de los genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* y *rpoD*. Este análisis ha permitido determinar el número de alelos para cada uno de los genes analizados dentro de *X. arboricola*, dando lugar a 22 secuencias tipo que fueron agrupadas en 3 complejos clonales y 4 secuencias únicas. Todas las cepas identificadas como *Xap* se agruparon dentro de un grupo clonal diferente a los demás patovares de la especie analizada.

Finalmente se estudiaron diferencias respecto a la patogenicidad y virulencia de las cepas mediante inoculación por infiltración en hojas de albaricoquero, almendro, ciruelo y melocotonero. Las cepas del patovar *pruni*, presentaron la capacidad de generar síntomas en todos los huéspedes analizados, así mismo, las cepas aisladas de avellano, chopo y piracanta generaron síntomas en algunos de los huéspedes analizados a pesar de no corresponder a sus huéspedes originales.

Trabajo financiado por el proyecto RTA2011-00140-C03

Biosíntesis y regulación de la producción de mangotoxina en *Pseudomonas syringae*

V.J. Carrión^{1*}, E. Arrebola¹, J.A. Gutiérrez-Barranquero¹, M. van der Voort², J. Murillo³, J.M. Raaijmakers², A. de Vicente¹, F.M. Cazorla¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga. e-mail: vcarrion@uma.es.

²Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

³Laboratorio de Patología Vegetal, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

Mangotoxina es una toxina antimetabolito considerada como factor de virulencia, fundamentalmente producida por cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aisladas de mango, aunque recientemente se descrito su producción en cepas pertenecientes a los patovares *avellanae* y *pisi*. La mangotoxina es un pequeño oligopéptido que inhibe a la enzima ornitina N-acetil transferasa, paso clave en la ruta de biosíntesis de ornitina y arginina. Se dispone de una colección de mutantes defectivos en la producción de mangotoxina en nuestra cepa modelo *P. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Estudios previos han demostrado la implicación del gen *mgoA* en la producción de mangotoxina, el cual codifica para una posible péptido sintetasa no ribosomal. Este gen pertenece al operón *mgo* (*mangotoxin generating operon*), el cual contiene cuatro genes implicados en la producción de mangotoxina. En este trabajo, se ha descrito el operón denominado *mbo* (*mangotoxin biosynthetic operon*) que contiene seis genes (*mboABCDEF*), el cual es específico y esencial para la biosíntesis de mangotoxina. Por otro lado, se ha realizado un estudio de la distribución y evolución del operón *mbo*, usando varios genes *housekeeping* de más de cien cepas de diferentes patovares de *Pseudomonas syringae*. Se secuenciaron y analizaron estos genes, llevando a cabo la construcción de los correspondientes árboles filogenéticos mediante diferentes métodos, mostrando todos ellos los mismos grupos: uno cepas no productoras y otros dos grupos que abarcan todas las cepas productoras de mangotoxina que se han analizado, uno se corresponde con las cepas aisladas en mango y otro a cepas aisladas en otros hospedadores (patovares *aptata*, *avellanae*, *japonica*, *pisi* y *syringae*). Por otro lado, se ha realizado un estudio de la regulación de la producción de mangotoxina, mediante análisis por Q-PCR, donde se ha observado que mutantes en el sistema de regulación de dos componentes GacS/GacA disminuyen los niveles de expresión de los operones *mgo* y *mbo*, y que en los mutantes en el operón *mgo* se reduce la expresión de los genes del operón *mbo*. Estos resultados sugieren que el sistema de dos componentes GacS/GacA junto con el operón *mgo*, intervienen en la regulación de la producción de mangotoxina. Sin embargo, experimentos de sobreexpresión, y expresión del promotor del operón *mbo* en diferentes fondos genéticos sugieren que, los productos del operón *mgo* podrían actuar como potenciadores de la transcripción del operón *mbo*.

Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-169 e Incentivos a Proyecto de Excelencia (P07-AGR-02471), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

Evaluación funcional de determinantes de mantenimiento de los plásmidos nativos de *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi Psv48

M. Añorga*, L. Bardaji, C. Ramos, J. Murillo

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

La gamma proteobacteria *Pseudomonas syringae* es una bacteria fitopatógena gram negativa que infecta una amplia gama de plantas, incluyendo especies tanto herbáceas como leñosas. *P. syringae* pv. savastanoi Psv48 (NCPB3335) que induce tumores en olivo (*Olea europea* L), es un organismo modelo para el estudio de las bases moleculares de la producción de enfermedad en plantas leñosas y recientemente se ha publicado un borrador de su genoma. La cepa Psv48, contiene tres plásmidos nativos: pPsv48A (73 kb), pPsv48B (45 kb) y pPsv48C (42 kb) que han sido secuenciados completamente. Los plásmidos nativos de esta especie portan con frecuencia genes implicados en la interacción con la planta. En los plásmidos de Psv48 se han identificado varios posibles genes de virulencia, pero su análisis se ha complicado por las dificultades para curar estos plásmidos o transferirlos a otras cepas. Además, el análisis de la secuencia de estos plásmidos ha identificado un alto número de posibles genes de mantenimiento, de los cuales se desconoce su funcionalidad. En consecuencia, se ha abordado la caracterización funcional de los determinantes de mantenimiento de los plásmidos de Psv48, con el fin general de identificar los mecanismos que permiten el mantenimiento de plásmidos de virulencia en *P. syringae* y para facilitar su análisis mediante curación y transferencia heteróloga. Para ello, se han identificado los posibles determinantes de mantenimiento en las secuencias de pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C y se ha evaluado su contribución al mantenimiento del plásmido pKMAG-C en la cepa *P. syringae* pv. *syringae* B728a, libre de plásmidos. El plásmido inestable pKMAG-C que se construyó a partir de un vector de *E. coli*, contiene el origen de replicación de pPsv48C y un polilinker para clonación situado detrás de un terminador de la transcripción. Mediante un ensayo estándar de estabilidad, se han identificado once determinantes que aumentan significativamente la estabilidad de pKMAG-C, de los cuales cinco determinantes condujeron a la retención del plásmido en más del 90% de las células. Dos plásmidos, pPsv48A y pPsv48C, contienen cada uno, al menos, tres determinantes que contribuyen a la retención del plásmido en al menos el 50% de las células. Sin embargo, de los cuatro determinantes de pPsv48B ensayados, sólo uno contribuyó a aumentar la estabilidad de pKMAG-C, y en un porcentaje marginal.

Desarrollo del haustorio de *Podosphaera fusca* y función de los lóbulos

J. Martínez-Cruz*, D. Vela-Corcía, A. de Vicente, D. Romero, A. Pérez-García

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Bulevar Louis Pasteur 31, 29071 Málaga. E-mail: jmcruz@alu.uma.es

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren células vivas de la planta para completar su ciclo de vida asexual. Estos patógenos desarrollan una estructura de infección especializada responsable de la toma de nutrientes e intercambio de factores con la planta denominada 'haustorio', estableciendo de esta forma una íntima relación con el citoplasma de las células de su hospedador. A pesar de estar localizada en el interior de las células epidérmicas de la planta, el haustorio permanece separado del citoplasma de la planta por una membrana plasmática derivada de la planta, denominada membrana extrahaustorial (EHM), cuya diferenciación y/o formación es aún desconocida. La EHM está unida a la membrana plasmática de la planta por una región del cuello denominada septum. Entre la pared celular del haustorio y la EHM se localiza la matriz extrahaustorial (EHMx), en la cual se debe producir el intercambio de moléculas entre el parásito y su huésped. Dentro de esta matriz se extienden unas proyecciones del cuerpo del haustorio, denominadas lóbulos. En este trabajo presentamos un método desarrollado para el aislamiento y purificación de complejos del haustorio de *Podosphaera fusca*, principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas en España, a partir de hojas de calabacín densamente infectadas con el hongo. La pared celular del hongo fue visualizada con un anticuerpo específico contra quitina, uno de los componentes estructurales mayoritarios de la pared celular de hongos. De esta manera, se marcaron con fluorescencia diferentes estructuras del haustorio como el cuerpo, lóbulos, cuello y septum, no así EHM y EHMx. Además, se observó que el tamaño y el número de lóbulos alrededor del cuerpo del haustorio aumentaban progresivamente en el tiempo hasta rodearlo completamente, lo que era indicativo de la madurez del mismo. En paralelo, se realizó un estudio detallado de la ultraestructura del haustorio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) a partir de cortes ultrafinos de hojas de melón densamente infectadas con el hongo, observándose depósitos de calosa alrededor del complejo del haustorio. Por ello, se llevó a cabo una doble tinción con azul de anilina y calcoflúor para visualizar los depósitos de calosa. De esta manera, se observó que los depósitos de calosa aumentaban con el tiempo alrededor de los complejos del haustorio, sin impedir el desarrollo del mismo. Recientemente se ha descrito la presencia de pequeñas vesículas y cuerpos multivesiculares (MVBs) en complejos del haustorio de *Golovinomyces orontii* (oídio de *Arabidopsis*). Por ello, hemos creído oportuno realizar una tinción selectiva con un colorante específico de membranas plasmáticas en haustorios de *P.fusca*, observándose un patrón diferente en la distribución de pequeñas vesículas, endosomas y MVBs entre lóbulos y cuerpo del haustorio, además, de una alta presencia de vacuolas de gran tamaño en éste último. Nuestros resultados sugieren que los lóbulos serían los máximos responsables del tráfico de vesículas y, probablemente, los principales mediadores del diálogo molecular con la planta.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del anterior Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

Contribución de los transportadores de membrana a la resistencia a fungicidas DMI y Qol en *Podosphaera fusca*

D. Bellón-Gómez*, A. Pérez-García, J.A. Torés

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Bulevar Louis Pasteur 31, 29071 Málaga. E-mail: davinia@eelm.csic.es

El oídio de las cucurbitáceas, *Podosphaera fusca*, es uno de los principales problemas que afectan a estos cultivos en todo el mundo. Al tratarse de un ectoparásito, el uso de fungicidas es la principal estrategia de control. Desgraciadamente, el empleo excesivo de fungicidas conlleva el importante problema de desarrollo de resistencias. En trabajos previos de nuestro grupo se describieron importantes niveles de resistencia a fungicidas Qol (inhibidores de la respiración) y DMI (inhibidores de la biosíntesis del ergosterol).

Los transportadores de membrana han sido ampliamente estudiados por su importante papel en la patogénesis de hongos fitopatógenos. Son proteínas responsables del transporte de compuestos celulares. La resistencia a fungicidas en *P. fusca* podría estar mediada por la sobreexpresión de estos transportadores, produciendo la secreción y disminución del acumulo de fungicidas en las células. Por ello decidimos estudiar el posible papel de los mismos en la resistencia a fungicidas Qol y DMI en *P. fusca*.

Para llevar a cabo el estudio, se realizó una visualización histoquímica mediante microscopía de fluorescencia. Se seleccionaron un conjunto de cepas que presentaban distintos niveles de sensibilidad a fungicidas Qol y DMI. Estos aislados fueron tratados con distintas concentraciones de fungicidas para facilitar la sobreexpresión o no de los transportadores. Posteriormente se incubaron con sustratos de éstos que emitían fluorescencia, así como con distintos protonóforos para conocer así su naturaleza bioenergética. A concentraciones altas de fungicida se observó una sobreexpresión de los transportadores, así como una disminución cuando utilizábamos protonóforos de transportadores ABC. Esto podría indicar que los transportadores ABC (ATP-binding cassette) podrían estar implicados en la resistencia a estos fungicidas. También se creyó conveniente llevar a cabo una cuantificación de la expresión de los genes codificantes de transportadores ABC implicados en la resistencia a estos fungicidas en *P. fusca*, para ver diferencias de expresión. Podríamos explicar así la disminución de la sensibilidad a estos fungicidas como una sobreexpresión de transportadores ABC en *P. fusca*. En la actualidad ya disponemos de una región de la zona conservada de estos transportadores que se utilizará para cuantificar su expresión mediante RT-qPCR.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del anterior Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

Jueves, 11 de abril

SESIÓN IV

Moderadores: María José Soto y Francisco Cazorla

Análisis de la expresión y contribución a la virulencia de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* de los operones *antABC* y *catBCA*

E. Caballo-Ponce*, I.M. Matas, C. Ramos

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Área de Genética, Universidad de Málaga. E-mail: crr@uma.es

El análisis comparativo del borrador del genoma de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335, cepa modelo en el estudio de interacciones con plantas leñosas, con los genomas completos de tres cepas de *Pseudomonas syringae* patógenas de plantas herbáceas, reveló la existencia de una región variable (VR8; 14,7 kb) codificada exclusivamente en el genoma de Psv. Esta región, también presente en los genomas de otras bacterias patógenas de plantas leñosas, e.g. *P. syringae* pv. *aesculi*, pv. *morsprunorum* y pv. *actinidiae*, codifica 15 ORFs, probablemente implicados en la degradación de compuestos aromáticos. Análisis de expresión génica mediante *reverse transcription-PCR* (RT-PCR) reveló que, en Psv NCPPB 3335, estos 15 ORFs se organizan en al menos 4 posibles operones. Uno de ellos es homólogo al operón *antABC* de *Pseudomonas fluorescens* MB214, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y del plásmido pCAR1 de *Pseudomonas resinovorans* CA10, responsables en estas cepas de la transformación de antranilato en catecol. Otro de estos operones es homólogo al *catBCA* presente en algunas cepas de *P. fluorescens* y *P. putida*, implicado en la degradación de catecol a intermediarios del ciclo de Krebs. Análisis de expresión del gen *antA* mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) demuestran que, en Psv NCPPB 3335, la expresión del mismo se induce en presencia de antranilato (primer metabolito de la ruta). Para analizar la posible contribución del operón *antABC* a la virulencia de Psv NCPPB 3335, se construyó un mutante $\Delta antA$ mediante intercambio alélico. Aunque los síntomas generados por las cepas silvestres y $\Delta antA$ resultaron ser similares en plantas de olivo jóvenes no lignificadas, el volumen de los tumores inducidos por el mutante en plantas de olivo leñosas resultó ser significativamente inferior al de los inducidos por la cepa silvestre. Además, resultados preliminares indican que la expresión *in trans* del gen *antA* en el mutante $\Delta antA$ tiene como consecuencia la inducción de síntomas similares a los generados por la cepa silvestre. Estos resultados apoyan el papel del operón *antABC*, y por tanto de la VR8, en la virulencia de Psv y de otras *Pseudomonas* patógenas de plantas leñosas. En la actualidad, se están analizando la expresión del operón *catBCA* de Psv mediante qRT-PCR y el inicio de la transcripción de ambos operones mediante 5'-RACE.

Financiación: AGL2011-30343-C02-01 (MINECO), cofinanciado por FEDER.

Tirosol como molécula señalizadora en la relación de *Trichoderma reesei* con patógenos y plantas

E. Pérez^{1*}, R.E. Cardoza², S. Gutiérrez², E. Monte¹, R. Hermosa¹

¹Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agraria (CIALE). C/ Río Duero, 12. Campus de Villamayor. Universidad de Salamanca. 37185 Salamanca.

²Área de Microbiología. Escuela Universitaria de Ingeniería Agrícola. Universidad de León. Campus de Ponferrada. Avda. Astorga s/n. 24400 Ponferrada, España.

*E-mail: esclaudysperez@yahoo.es

Trichoderma es un género de hongos ascomicetos muy bien adaptado a vivir en diferentes nichos ecológicos, debido a su capacidad para metabolizar un gran número de sustratos y producir una amplia cantidad/variedad de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios. Algunas de sus cepas son utilizadas en el control biológico de enfermedades de plantas producidas por hongos y oomicetos. Además, algunas cepas tienen efectos positivos en las plantas ya que pueden promover su crecimiento, inducir defensa y aumentar su tolerancia a estreses ambientales. En la actualidad, están disponibles los genomas de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens*. Mediante técnicas cromatográficas hemos detectado tirosol en sobrenadantes de cultivo de cepas pertenecientes a las especies *T. brevicompactum*, *T. atroviride*, *T. reesei*, y *T. harzianum*. En ensayos *in vitro* e *in vivo* (invernadero) se seleccionó la cepa T6 de *T. reesei*, en base a sus efectos positivos sobre el crecimiento de plantas de tomate. El tirosol es un compuesto fenólico que deriva de la tirosina, que junto con fenilalanina y triptófano, son producidos en la ruta metabólica de aminoácidos aromáticos en la que participa la corismato mutasa. Hemos observado que el crecimiento de la cepa T6 se ve afectado por la adición exógena de tirosol, triptófano o fenilalanina, y también que estos compuestos afectan a la germinación de semillas de tomate. Por otro lado, en levaduras se publicó que el tirosol [2-(4-hidroxifenil) etanol] es una molécula señalizadora relacionada con cambios morfogénicos. En el genoma de *T. reesei* hemos identificado varios genes ortólogos de planta relacionados con la ruta biosintética de esos compuestos aromáticos. Con objeto de profundizar en el papel del tirosol como molécula señalizadora en las relaciones de *Trichoderma* con microorganismos fitopatógenos y con la planta, estamos trabajando con el gen que codifica la corismato mutasa (*cmu1*). Este gen se aisló de *T. reesei* T6, y hemos observado, mediante qPCR, que su expresión se incrementa en la cepa T6 cuando se cultiva con paredes de fitopatógenos o con material vegetal. El análisis funcional de *cmu1* en *T. reesei* se está realizando mediante un silenciamiento del gen en *T. reesei* T6.

*Esclaudys Pérez es becario de la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID).

GInt: Un nuevo elemento genético móvil asociado a la captura y transferencia horizontal de DNA en *Pseudomonas syringae* y otras bacterias

L. Bardaji^{1*}, M. Echeverría¹, P. Rodríguez-Palenzuela², J. Murillo¹

¹Laboratorio de Patología vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra; ²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid
E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

La transferencia horizontal de genes mediada por elementos genéticos móviles (como plásmidos, bacteriófagos o islas genómicas) es muy común en la naturaleza y generalmente favorece la adaptación de procariontes a nuevos nichos ecológicos. En nuestro grupo estamos interesados en la funcionalidad y evolución de la isla genómica de biosíntesis de faseolotoxina (Pht-PAI, 38 kb) de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A. La Pht-PAI está delimitada en su extremo 5' por cuatro CDSs consecutivas (cluster *ginA-D*), de las cuales *ginAB* se anotan como recombinasas de la familia de integrasas de tirosina de fagos. El cluster *ginA-D* se ha encontrado asimismo en *P. syringae* pv. tomato DC3000, pero asociado a DNA distinto del incluido en la Pht-PAI. La prospección realizada mediante hibridación y secuenciación en una colección de 100 cepas de *P. syringae*, así como la búsqueda *in silico* del cluster *ginA-D* mediante Blast ha revelado la presencia de estos genes en 5 de las 9 genomaspecies que constituyen *P. syringae*, en cepas de tres especies más del género *Pseudomonas* y en la α -proteobacteria *Marinobacter algicola*. La comparación de estas secuencias nos ha permitido definir una nueva familia de elementos genéticos móviles, que hemos denominado GInt (pronunciado como "giant"), que tienen en común: un cluster *ginA-D* en el extremo 5' altamente conservado, una región de unos 300 nt en el extremo 3' poco conservada, y que se insertan en el cromosoma dentro de la región codificante de un gen cuyo producto es un posible transportador ABC. Entre los extremos conservados de los GInt se localizan secuencias de DNA con contenido génico y tamaño (9 a 40 kb) variables. Además, los análisis de secuencias indican que el DNA adquirido por los diversos GInt proviene fundamentalmente de especies de *Pseudomonas*. Los GInt están bordeados por dos repeticiones directas imperfectas de 10-11 nt, probablemente derivadas por recombinación con una secuencia de 11 nt conservada en los genomas de *Pseudomonas* que carecen de GInt, y que constituye el sitio de inserción específica *attB*. La filogenia de los genes *gin* no coincide con la filogenia de las bacterias que los portan, indicando que los GInts sufren procesos de transferencia horizontal intra- e interespecíficos. Igualmente, hay falta de congruencia en la filogenia de los diversos genes *gin* de cada GInt, lo que sugiere la ocurrencia de eventos de recombinación entre estas islas. Mediante PCR con iniciadores específicos, hemos demostrado la circularización del GInt en células en cultivo de diversas cepas de *P. syringae*, *P. stutzeri* y *P. fragi*, así como la regeneración del posible sitio *attB* tras la escisión. En conjunto, nuestros resultados han permitido identificar un nuevo elemento móvil que genera islas genómicas, con contenido y tamaño variables, que se distribuyen horizontalmente y preferentemente entre miembros del género *Pseudomonas*.

Transferencia horizontal de múltiples determinantes cromosómicos de resistencia a compuestos antibacterianos entre cepas de *Pseudomonas syringae*

M. Echeverría*, L. Bardaji, J. Murillo

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra

E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

El control químico de las enfermedades de plantas causadas por bacterias es difícil, y se basa fundamentalmente en la utilización de compuestos de cobre y, en algunos países, de estreptomycin. La efectividad de estos compuestos puede verse comprometida, además, por la existencia en diversas bacterias fitopatógenas de genes de resistencia a cobre y estreptomycin, generalmente de localización plasmídica. En este trabajo presentamos evidencias de la transferencia simple y múltiple entre cepas de *P. syringae*, y con alta frecuencia, de determinantes cromosómicos de resistencia a diversos compuestos antibacterianos. El patógeno de judía *P. syringae* pv. *syringae* UPN800 muestra resistencia a estreptomycin (Sm^R), debida a Tn5393, y a cobre (Cu^R). *P. syringae* pv. *phaseolicola* UPN779 deriva de la cepa 1448A por inserción de un gen de resistencia a espectinomycin (Spc^R) en el cluster de biosíntesis de faseolotoxina, es también patógena de judía, pero sensible a cobre (Cu^S) y a estreptomycin (Sm^S). Para evaluar la existencia de eventos de transmisión horizontal, se coinocularon UPN800 y UPN779 en vainas de judía (*Phaseolus vulgaris*) o en medio KMB. Desde los 2 dpi, se recuperaron repetitivamente numerosos clones $Cu^R Spc^R$, que se identificaron como derivados de UPN779 con la base de sus perfiles ERIC, perfiles plasmídicos e incapacidad para degradar caseína. Dos de los clones analizados ($Cu^R Sm^S$) adquirieron la isla genómica GI6 descrita en *P. syringae* pv. *syringae* B728a, que contiene homólogos de los genes *copABCDRS* y que se definió como un elemento de 120 kb circularizado o insertado específicamente en un $tRNA^{LYS}$. El resto de los clones, que aparecieron con una frecuencia de hasta 10^{-4} clones/receptor, mostraron un fenotipo $Cu^R Spc^R Sm^R$. La secuenciación genómica de uno de estos clones, UPN799, mostró la adquisición de un elemento genético de 230 a 250 kb que porta secuencias homólogas a genes de resistencia a cobre, arsénico, cobalto y mercurio descritos en otras especies de bacterias. Igualmente, todos estos clones adquirieron Tn5393, aunque este transposón aparece insertado en distintas zonas genómicas en cada clon. No hemos observado la transferencia del cluster de biosíntesis de faseolotoxina a la cepa UPN800.

Impacto de diferentes tratamientos fitosanitarios sobre los cultivos de césped y las poblaciones microbianas del suelo

M. Carrasquilla^{1*}, J. Palau², M. Llorós¹, J. Palau², N. Gaju¹, M. Martínez-Alonso¹

¹*Departament de Genètica i Microbiologia.*

Universitat Autònoma de Barcelona (08191 Bellaterra).

²*Palau Microorganics (08911 Badalona)*

El césped es considerado uno de los elementos más ligados a la jardinería y a un gran número de actividades deportivas. Su gran valor se fundamenta tanto en aspectos estéticos como funcionales. Para conseguir que el césped alcance un desarrollo biológico óptimo es necesario el uso de fertilizantes y pesticidas químicos. Es bien sabido que ambos productos generan en el medio sustancias nocivas que, a concentraciones elevadas, afectan negativamente a los ecosistemas. Así que, para ser capaces de hacer económicamente viable la explotación de plantaciones de césped (golf, fútbol, jardines, zonas urbanas, etc.), minimizando la contaminación ambiental derivada de la utilización de estos productos, debemos desarrollar nuevas técnicas de fertilización y protección dirigidas a mejorar el crecimiento del césped y hacerlo resistente frente enfermedades. Estas nuevas tecnologías nos permitirán mantener campos de césped en buen estado, y obtener cosechas que satisfagan la demanda del mercado.

El principal objetivo planteado en este trabajo consiste en evaluar el efecto de un tratamiento de biofertilización en comparación con un tratamiento químico convencional, tanto sobre el estado del césped, como sobre las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo que sustenta el crecimiento de éste. Las variables que se han tenido en cuenta para realizar dicho estudio son la apariencia del césped, el régimen de crecimiento y el desarrollo radicular de éste, la invasión de hierbas, la resistencia a las infecciones fúngicas, los nutrientes del suelo y la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo.

Para realizar el ensayo, de una duración de un ciclo anual, se han elegido dos mezclas de césped de características diferentes, plantadas, a su vez, en dos parcelas independientes. Cada parcela se ha dividido en 20 zonas de unas dimensiones de 4 m² y se han aplicado cuatro tratamientos diferentes (biofertilización, fertilización química, biofertilización+fertilización química y un control sin fertilizantes ni productos fitosanitarios), de manera que tenemos 5 réplicas de cada uno de ellos. Así, cada vez que se analiza una variable, la muestra que se toma es una mezcla a partes iguales de los cinco puntos que están sometidos al mismo tratamiento. La distribución de los tratamientos en las diferentes zonas se ha realizado según un modelo de bloques al azar.

El estudio de la diversidad microbiana se ha llevado a cabo mediante dos aproximaciones, una de ellas que incluye las poblaciones cultivables de hongos y bacterias (aproximación cultivo dependiente) y la otra que implica la extracción del DNA genómico total y el análisis posterior mediante PCR-DGGE (aproximación cultivo independiente). Para la amplificación mediante PCR se han utilizado cebadores específicos para el gen del rRNA 16S de bacterias y para las regiones ITS de hongos. Finalmente para realizar el análisis filogenético de las poblaciones dominantes se han recuperado del gel las bandas más prominentes y se está procediendo a su secuenciación.

El análisis preliminar de los resultados pone de manifiesto la existencia de notables variaciones en la riqueza y abundancia relativa de las poblaciones bacterianas y fúngicas del suelo, y en el estado del césped, tanto a lo largo del tiempo, como al comparar los diferentes tratamientos ensayados.

Análisis funcional de la mutación que confiere resistencia a benzimidazoles en *Podosphaera fusca*

D. Vela-Corcía*, D. Romero, A. de Vicente, J.A. Torés, A. Pérez-García

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus Universitario de Teatinos, 29071 Málaga.

E-mail: dvela@uma.es

Aunque en la actualidad su uso está en decaimiento, los fungicidas de la familia de los metil benzimidazol carbamatos (MBC) han sido empleados de forma extensiva e intensiva desde hace años. Dentro de esta familia se encuentran fungicidas como metiltiofanato, carbendazima y benomilo. Estos fungicidas impiden la división celular mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina, el componente fundamental de los microtúbulos. El mecanismo de resistencia más común frente a este tipo de fungicidas se debe al cambio Glu198→Ala198 (E198A), aunque se han descrito otras mutaciones que, en menor proporción, también conducen a la aparición de resistencia a estos fungicidas. Una de las enfermedades sobre las que se han usado estos fungicidas son los oídios (Erysiphales), que son probablemente el principal problema fitosanitario de origen fúngico al que se enfrenta la agricultura actual. El control de esta enfermedad se lleva a cabo mediante el empleo continuado de fungicidas como método principal, en combinación con el empleo de variedades de hospedadores resistentes y, recientemente, con el uso de agentes de control biológico. No obstante, aunque es el método más efectivo contra estos patógenos, el empleo de fungicidas presenta un problema fundamental, la aparición de resistencia tras un uso intensivo y en ocasiones indebido de los mismos.

El objetivo de este trabajo es esclarecer las bases moleculares de la resistencia a benzimidazoles en *Podosphaera fusca*, el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas en España. Para ello, se está llevando a cabo la producción *in vitro* y la purificación de las dos subunidades proteicas que componen el dímero de tubulina, α - y β -tubulina, y la realización de ensayos de polimerización tanto en presencia como en ausencia de fungicida. Junto a esto, se está evaluando la capacidad del fungicida de inducir cambios conformacionales en el dímero de tubulina que podrían conducir a una incompleta inhibición de la formación de microtúbulos o a la formación de estructuras de tubulina aberrantes incompatibles con la vida. En paralelo, se está llevando a cabo un análisis computacional mediante la creación de un modelo de docking entre el dímero de tubulina y el fungicida, lo que permite evaluar topológicamente la interacción entre la molécula de fungicida y la proteína diana. Se ha comprobado que los sitios de unión propuestos por otros autores no son los que presentan las mejores condiciones termodinámicas para que se establezca la interacción entre ambas moléculas.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (UE).

Síntesis y regulación de un polisacárido semejante a la celulosa en *Sinorhizobium meliloti* 1021

I. Baena*, E. Valiente, I. Bonilla, M. Martín, R. Rivilla, F.J. Lloret

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
E-mail: javier.lloret@uam.es*

El megaplásmido pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 contiene numerosos genes cuyos productos parecen estar relacionados en la síntesis de polisacáridos. A lo largo de las tres últimas décadas, algunos de estos genes implicados en la producción y regulación de succinoglicano (EPSI), galactoglucano (EPSII), polisacáridos capsulares (CPS) y lipopolisacáridos (LPS), han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, la mayoría de las regiones que parecen estar relacionadas con la síntesis de polisacáridos de superficie están sin caracterizar. Durante el análisis de proteínas presuntamente implicadas en el metabolismo del di-GMP-cíclico, hemos encontrado una región en dicho megaplásmido que regula la síntesis de un nuevo polisacárido. Este área comprende por lo menos seis ORFs, tres de los cuales aparecen anotados como proteínas hipotéticas. Las otras tres codifican proteínas anotadas como una diguanilatociclasa/fosfodiesterasa (DGC/PDE) denominada Smb20447, una metiltransferasa (Smb20449) y una proteína reguladora con dominios HAMP y fosfatasa (Smb20450). Una mutación en estos dos últimos genes, así como la sobreexpresión de la DGC/PDE, induce la síntesis de un nuevo polisacárido en la estirpe *S. meliloti* 8530. La presencia de una copia intacta de la DGC/PDE en el mutante Smb20450 parece ser esencial, ya que una mutación en este gen elimina completamente la producción del polisacárido. Dicho polisacárido se asemeja a la celulosa. Se tiñe de forma intensa con Rojo Congo y presenta un brillo azulado cuando se observa bajo luz UV en placas suplementadas con calcoflúor. Además, los mutantes que producen este polisacárido forman unas fibrillas blancas en medio líquido, que desaparecen cuando son tratadas con celulasa comercial. Si se bloquea la síntesis de EPSI y/o EPSII mediante la generación de mutantes en los genes *exoY* y/o *wgaB* (*expA23*), este nuevo polisacárido se sigue produciendo, lo que indica una independencia de las rutas biosintéticas. En el genoma de *S. meliloti* 8530 se han anotado dos posibles celulosas sintetas, ambas en las proximidades de la región caracterizada, Smb20391 y Smb20460. La inactivación del gen Smb20391 suprime completamente la producción del polisacárido, mientras que una inserción en Smb20460 parece alterar la estructura de las fibras producidas. Se han iniciado estudios de la regulación de la síntesis de este polisacárido en distintos fondos genéticos, que han mostrado un complejo nivel de regulación tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Cabe destacar que la región de seis ORF's aquí descrita está muy bien conservada en distintos miembros de la familia Rhizobiaceae capaces de establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas.

Jueves, 11 de abril

SESIÓN V

Bioplaguicidas y biofertilizantes microbianos

Moderador: Emilio Montesinos

- | | |
|---------------------|--|
| 15:00-15:30
S5.1 | Perspectivas y limitaciones de los bioplaguicidas y biofertilizantes microbianos.
Emilio Montesinos (CIDSAV-INTEA, Universitat de Girona) |
| 15:30-16:00
S5.2 | Experiencia de una PYME en el desarrollo, registro y comercialización de biopesticidas microbianos.
Carolina Fernández (Futureco Biosciences, Barcelona) |
| 16:00-16:30
S5.3 | Biosafety of beneficial bacteria. A view from the genomics side.
Brion Duffy (EAER. Research Station Agroscope Changins-Wädenswil ACW, Plant Protection and Extension Division, Suiza) |

Viernes, 12 de abril

SESIÓN VI

Moderador: Jaime Cubero y Anna Bonaterra

Producción de péptidos antimicrobianos catiónicos en plantas mediante expresión constitutiva y acumulación en el RE. Efectos sobre la planta transgénica.

A. Nadal^{1*}, M. Montero¹, N. Company¹, J.L. La Paz², C. Ruiz¹, E. Montesinos¹,
M. Pla¹

¹*Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA), Universitat de Girona*

²*Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Barcelona*

e-mail: anna.nadal@udg.edu

La utilización de plantas modificadas genéticamente (MG) es una alternativa para la producción de péptidos antimicrobianos (PAMs) con distintos tipos de aplicaciones, inclusive las fitosanitarias. El BioPéptido BP100 (perteneciente a la quimioteca CECMEL11) es un undecapéptido sintético de estructura en hélice α y con actividad *in vitro* demostrada frente a las especies bacterianas fitopatógenas *Erwinia amylovora* (Ea), *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria (Xav) y *Pseudomonas syringae* pv. syringae (Pss). La producción de BP100 y sus derivados (BP100der) en plantas, ya sea para fines de autoprotección o como biofactoría, presenta una serie de retos específicos básicamente debidos a su reducido tamaño y a algunas de sus características físico-químicas, en concreto su carácter fuertemente catiónico y (en algunos casos) hemolítico, lo que los convierte en potencialmente tóxicos para las plantas que los expresan.

Como prueba de concepto, pero también con una aplicación fitosanitaria clara, nuestro grupo ha utilizado como modelo la expresión en arroz de los undecapéptidos lineales de la serie BP100, siguiendo una estrategia de expresión constitutiva y acumulación en retículo endoplasmático (RE). Se diseñaron 11 BP100der que contemplaban: (i) aumento del tamaño mediante dímeros o trímeros de BP100 o adición de algunos fragmentos de PAMs naturales, (ii) dímeros en sentidos opuestos, y (iii) inclusión de un *tag* para su detección y purificación. Ensayos *in vitro* con péptidos obtenidos mediante síntesis química revelaron que la secuencia de retención a RE KDEL no modificaba la actividad antibacteriana, que las repeticiones en tándem invertidos sí aumentaban significativamente su actividad y que, contrariamente, las repeticiones en tándem directos de BP100 no mejoraban la CMI frente a las bacterias de referencia.

Se obtuvieron plantas transgénicas viables y fértiles que expresan la mayoría de transgenes *bp100der* (que codifican los distintos BP100der), si bien con eficiencias de transformación muy variables, desde inferiores al 1% hasta el 50 % respecto al control. Se observó que la eficiencia de transformación de cada *bp100der* era inversamente proporcional a la actividad hemolítica del péptido correspondiente. Sin embargo, en general las plantas transgénicas obtenidas mostraron características agronómicas muy similares a las líneas de arroz no transformadas. Dichas plantas transgénicas muestran, además, resistencia a patógenos como *Dickeya chrysantheni* (similar a *Erwinia*) o *Fusarium verticilloides*, y tolerancia al estrés oxidativo. En el caso de las líneas de arroz transgénicas que expresan un derivado de BP100 con una secuencia *tag* inmunogénica, confirmamos que el péptido recombinante se produce y acumula en arroz hasta niveles de 0,5 % de la proteína total soluble, cantidad que sería compatible con su producción en este sistema.

Este trabajo se ha financiado en parte por el proyecto AGL2010-17181/AGR y EUI 2008-035725.

Diagnóstico y diversidad de los aislados de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en la Axarquía

M. Crespo^{1*}, F.M. Cazorla¹, S. Freeman³, J. A. Gutiérrez-Barranquero¹, E. Arrebola², J. A. Torés², A. de Vicente¹

¹IHSM La Mayora-UMA-CSIC. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: mcrespo@uma.es

²IHSM La Mayora-UMA-CSIC. Estación Experimental La Mayora, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Algarrobo-Costa 29750 Málaga.

³Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel

La Malformación del Mango (MMD) es una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo. Varias especies del género *Fusarium* se han descrito como agentes causales de la enfermedad a nivel mundial, como son *Fusarium mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. proliferatum*, *F. mexicanum* y *F. tuiense*. La MMD es una enfermedad de reciente introducción en el cultivo de mango de la costa andaluza. Durante cuatro años consecutivos (2009-2012) se realizaron prospecciones en fincas de varias localidades de la Axarquía (Málaga), de las que se aislaron un total de 134 aislados, de los cuales aproximadamente una tercera parte fueron identificados como *F. mangiferae* en base a características morfológicas y a la amplificación por PCR de un fragmento específico de 608 pb. Para la identificación de los restantes aislados, se han secuenciado parcialmente los genes del factor de elongación 1 α y la β -tubulina. La combinación de ambos genes utilizando el programa informático MEGA.5 ha resultado en la agrupación de éstos aislados en un cluster junto a aislados de *Fusarium tuiense*.

Tanto los aislados diagnosticados como *F. mangiferae* como los similares a *F. tuiense* han confirmado su papel como agentes causales de esta enfermedad en España, cumpliendo los postulados de Koch en plantas de mango de dos años inoculadas experimentalmente.

Para estudiar la heterogeneidad de las poblaciones de *Fusarium* patógenas de mango de la Axarquía se han determinado los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG) y las pautas de amplificación mediante ap-PCR. Los resultados indican que la población de aislados del tipo *F. tuiense* pertenecen a un único grupo de compatibilidad vegetativa y presentan un perfil de bandas idéntico lo que sugiere un origen clonal. En el caso de la población de *F. mangiferae* aparecen dos grupos de compatibilidad vegetativa que presentan un patrón de bandas muy similar pero diferenciable, lo que sugiere al menos dos entradas diferentes de esta especie. Para completar este estudio de diversidad se está determinando el mating -type de los aislados mediante ensayos de PCR con los cebadores MAT-1 y MAT-2, y asimismo realizar un diagnóstico concluyente de los posibles *F. tuiense* mediante cruzamientos con aislados fértiles de referencia de esta especie.

Este proyecto ha sido financiado por ayudas CICE-Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia P07-AGR-02471, cofinanciado con fondos FEDER (UE). Asimismo ha recibido ayudas de un convenio con SAT-2803 TROPS, Reyes Gutiérrez S.L. y Viveros Brokaw S.L.

Caracterización de bacterias del ácido láctico aisladas de plantas: antagonismo y producción de bacteriocinas

G. Roselló*, J. Francés, L. Montesinos, E. Montesinos, A. Bonaterra

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-XaRTA-CIDSAV, Universidad de Girona,
Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: anna.bonaterra@udg.edu*

Las bacterias del ácido láctico (BAL) han sido utilizadas tradicionalmente para la bioconservación de productos cárnicos, lácticos y vegetales fermentados y pueden aplicarse como bioprotectores ya que previenen el crecimiento de las principales bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias. Además estas bacterias han sido calificadas como QPS por la EFSA (UE) y GRAS por la EPA (USA), siendo de este modo reconocidas como seguras. La actividad antibacteriana de las BAL es debida a la producción de diversos compuestos entre los que destacan los ácidos orgánicos, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular como peróxido de hidrógeno. En este estudio se ha caracterizado una colección de BAL en cuanto a su actividad antimicrobiana frente a bacterias fitopatógenas y otras que se han utilizado como indicadoras y a la producción de bacteriocinas. Partiendo de una colección de 600 aislados de BAL, obtenidos a partir de plantas y diversos productos vegetales, se ha determinado la actividad antimicrobiana en ensayos *in vitro* y se ha determinado la presencia de genes de biosíntesis de plantaricina, mesentericina y nisina. Se ha relacionado la presencia de dichos genes con la actividad antagonista. Algunas especies y cepas de BAL pueden ser buenos candidatos como agentes de biocontrol de microorganismos fitopatógenos o de bacterias causantes de toxiinfecciones.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL-2009-13255-C02-01 y AGL-2012-39880-C02-01 y por una beca FPI BES-2010-035738.

Influencia de la presencia de genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos y de sus productos en la actividad antimicrobiana en cepas de *Bacillus* de origen vegetal

I. Mora*, J. Cabrefiga, B. Sitjà, E. Montesinos

Instituto de Tecnología Agroalimentaria-XaRTA-CIDSAV, Universitat de Girona.

E-mail: isabel.mora@udg.edu

Bacillus subtilis y especies relacionadas son objeto de interés en el biocontrol de enfermedades de las plantas debido a su amplia distribución en diferentes hábitats, gran capacidad de supervivencia favorecida por la formación de esporas, producción de una extensa variedad de metabolitos con actividad antimicrobiana y por ser reconocidas como seguras por diferentes organismos reguladores. La capacidad de biocontrol de enfermedades de las plantas en cepas de *Bacillus* ha sido relacionada con su capacidad de producir compuestos antimicrobianos que permiten además de la inhibición directa a el patógeno, la inducción de defensas en la planta así como la formación de biofilms, entre otros. Éstos compuestos han sido caracterizados mayoritariamente como péptidos antimicrobianos (AMP). En éste trabajo se ha relacionado la capacidad de producción de AMPs con la detección de genes implicados en la síntesis de los mismos, así como con la actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos fitopatógenos. Para ello, ha sido caracterizada una colección de aislados de *Bacillus* procedentes de muestras naturales de plantas y suelo a nivel molecular, según la presencia/ausencia seis genes relacionados con la producción de surfactina, fengicina, iturina, bacilomicina, bacilisina y subtilina (*srfAA*, *fenD*, *ituC*, *bmyB*, *bacA* y *spaS*), y según su capacidad de inhibir el crecimiento de ocho bacterias y seis hongos patógenos de plantas de interés agronómico. Además, esta colección se ha caracterizado según su capacidad de producción de tres familias de ciclolipopéptidos: surfactinas, fengicinas e iturinas. Los estudios de correlación entre las diferentes características estudiadas han mostrado que existe una relación entre la presencia simultánea de genes biosintéticos de AMP con la producción múltiple de surfactinas, fengicinas e iturinas, que además es relevante en la actividad inhibitoria contra bacterias y hongos fitopatógenos. Así la presencia de un mayor número de genes biosintéticos en una cepa en particular está relacionada con una mayor capacidad antagonista. A su vez se ha comprobado la prevalencia de marcadores moleculares en la población de *Bacillus*, con la presencia de al menos uno de los seis marcadores utilizados, siendo los genes más frecuentes *srfAA*, *bacA*, *bmyB* y *fenD*, respectivamente.

Investigación subvencionada por AGL2009-13255-C02-01 AGL 2009-13255-C02-01.

La producción de péptidos antimicrobianos sintéticos en semillas de arroz transgénico confiere resistencia a la infección por hongos y bacterias fitopatógenas

L. Montesinos^{1*}, M. Bundó², E. Izquierdo³, E. Badosa¹, S. Campo², B. San Segundo²,
L. Feliu¹, M. Planas¹, E. Bardají¹, M. Rossignol³, M. Coca², E. Montesinos¹

¹Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA y LIPPSO, Universitat de Girona;

²Departamento de Genética Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG); ³INRA
UR1199 - Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, Montpellier

E-mail: laura.montesinos@udg.edu

Los péptidos antimicrobianos sintéticos ofrecen actualmente un gran potencial para el control de enfermedades de las plantas. La estrategia para el diseño de péptidos sintéticos para su producción en plantas parte del undecapéptido BP100, perteneciente a la quimioteca CECMEL11 (derivados cecropina A- melitina) obtenida mediante química combinatoria. Dichos péptidos presentan actividad *in vitro* contra bacterias fitopatógenas y controlan infecciones en plantas causadas por *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* y *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Asimismo, presentan baja toxicidad y moderada susceptibilidad a la degradación por proteasas. Para su acumulación en planta fue necesario incrementar el tamaño de los mismos (elongación, n-merización), así como incluir secuencias de estabilización y de retención al retículo endoplasmático. De este modo, se diseñaron y sintetizaron 52 péptidos, de los cuales 5 de ellos fueron seleccionados como candidatos para su producción en plantas. Para la transformación de plantas de arroz, se prepararon construcciones génicas diseñadas para la expresión específica en semilla (Glutelina B-4, Glutelina B-1 o Globulina, Oleosina 18 kDa), y con señales de direccionamiento para la acumulación de los correspondientes péptidos en cuerpos proteicos y cuerpos oleicos.

Las semillas transgénicas obtenidas muestran un incremento muy significativo de la resistencia a infecciones causadas por *Fusarium verticillioides* y *Dickeya chrysanthemi*, indicando que los péptidos sintetizados *in planta* son biológicamente activos. Las semillas transgénicas presentaron niveles de germinación superiores a las semillas control no transformadas en presencia de estos patógenos de semilla de arroz. En la mayoría de las estrategias se obtuvieron al menos tres eventos con niveles altos de resistencia frente a las infecciones de los patógenos ensayados. La purificación de los cuerpos proteicos (endospermo) y oleicos (embrión) de la semilla de arroz permitió detectar los productos de expresión mediante análisis Western-blot, confirmando así la producción de los péptidos y la acumulación en el compartimento subcelular diana. Además, la identidad de los péptidos ha sido confirmada mediante espectrometría de masas ESI-MS. Los niveles de acumulación de estos péptidos en semillas se encuentran en el rango de 20-50 ug/g p.s. Estos resultados demuestran que la producción de estos péptidos antimicrobianos es una buena estrategia para la protección de las semillas frente a enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenas. Asimismo, dichas plantas pueden utilizarse como biofactoría para la producción de los péptidos.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto EUI 2008-035725 y EUI2008-03769.

Desarrollo de una plataforma para la prospección masiva de efectos adversos en librerías de nuevos antimicrobianos, bioplaguicidas y biofertilizantes

E. Badosa*, L. Martínez, B. Gascón, O. Hanane y E. Montesinos

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA, Universitat de Girona
E-mail: emontesinos@udg.edu

Durante la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (p.e. péptidos antimicrobianos sintéticos o naturales), o cepas de microorganismos beneficiosos para las plantas (p.e. agentes de biocontrol, biofertilizantes), es necesario detectar prematuramente los posibles efectos adversos, con el fin de seleccionar los mejores candidatos.

En general, las pruebas más representativas de posibles efectos adversos consisten en evaluar la toxicidad y/o infectividad en modelos animales (dosis letal oral, inyección, contacto, etc.) o vegetales (fitotoxicidad). Sin embargo, dichas pruebas, permiten sólo el estudio de unos pocos candidatos, resultan muy costosas y requieren un gran esfuerzo en tiempo y medios. Por lo tanto, resulta necesario poner a punto sistemas que permitan la evaluación rápida y de un gran número de candidatos, entre los que se han mostrado activos en ensayos *in vitro* o *ex vivo* de control o promoción de crecimiento, para proceder a las fases posteriores de desarrollo.

En el presente trabajo se ha puesto a punto una plataforma basada en un conjunto de ensayos que permiten la evaluación rápida y masiva de toxicidad/infectividad durante el desarrollo de bioplaguicidas y nuevos productos sintéticos para la protección vegetal. Dicha batería de pruebas consiste en: (1) capacidad hemolítica en eritrocitos, (2) genotoxicidad mediante el test de Ames, (3) fitotoxicidad mediante infiltración en tabaco, y (4) toxicidad/infectividad en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. La plataforma se ha validado utilizando productos/patógenos de referencia, y se está actualmente empleando para cribar colecciones de potenciales agentes de biocontrol y péptidos antimicrobianos sintéticos y de origen natural.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto EUI 2008-035725

Evaluación de estrategias de aplicación de péptidos antimicrobianos para el control de la estemfiliosis del peral

M. Puig*, L. Ruz, C. Moragrega, E. Montesinos, I. Llorente

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV, Universitat de Girona.

E-mail: mireia.puig@udg.edu

La estemfiliosis o mancha marrón del peral es una de las principales enfermedades fúngicas que afectan al cultivo del peral en algunas zonas productivas de Europa. El agente causal es *Stemphylium vesicarium*. El control de la enfermedad se realiza mediante la aplicación de fungicidas a cadencia fija o guiada según el modelo predictivo BSPcast y con medidas sanitarias de reducción del inóculo del patógeno. No obstante la eficacia de control de la enfermedad es parcial debido a las características de la enfermedad y a que el número de materias activas eficaces es limitado. Los péptidos antimicrobianos (AMP) pueden ser una alternativa o complemento ya que presentan actividad contra otros hongos y bacterias fitopatógenos en diversos patosistemas. Además algunos de estos AMP presentan algunas ventajas como son su alta biodegradabilidad, escasa toxicidad en mamíferos y baja probabilidad de selección de microorganismos resistentes. En trabajos previos se determinó la eficacia de dos péptidos antimicrobianos de la librería CECMEL11 para el control de la infección de *S. vesicarium*. Se seleccionaron los péptidos BP15 y BP22 ya que en los ensayos *in vitro* mostraron una buena eficacia en la reducción de la esporulación, del desarrollo de los tubos germinativos y de la germinación de los conidios de *S. vesicarium*.

En este trabajo se determinó la eficacia de estos dos péptidos en el control de la enfermedad en material vegetal en función del momento de aplicación. El objetivo fue diseñar la mejor estrategia de aplicación: preventiva o curativa y determinar el momento óptimo de aplicación. Para ello se realizaron varios ensayos para obtener la dinámica de eficacia en función del progreso de la infección, realizando aplicaciones preventivas (antes del inicio de las infecciones) o curativas (a diferentes tiempos una vez iniciada la infección). Los dos péptidos evaluados se mostraron muy eficaces en el control de las infecciones cuando las aplicaciones se realizaron de manera curativa, siendo el óptimo sobre las 15 h desde el inicio de las infecciones. Las aplicaciones realizadas preventivamente mostraron una baja eficacia. A partir de estos resultados es posible diseñar una estrategia de aplicación de los AMP seleccionados en condiciones de campo.

Financiado por el proyecto AGL2009-09829/AGR del MEC y BR 10/17 de la Universitat de Girona.

Viernes, 12 de abril

SESIÓN VII

Moderador: Raúl Rivas y Concepció Moragrega

Interacciones multitróficas en la rizosfera de aguacate de la cepa de biocontrol *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 con el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* CH53

C.E. Calderon¹, N. Bonilla¹, V.J. Carrión¹, A. de Vicente¹, F.M. Cazorla¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC) Campus de Teatinos, 29071. Málaga. E-mail: claudia@uma.es.

Rosellinia necatrix es un hongo fitopatógeno de suelo, agente causal de la podredumbre radicular blanca, la cual puede ser contralada experimentalmente por la bacteria antagonista *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. El antibiótico antifúngico 2-hexil, 5-propil resorcinol (HPR) es esencial en el mecanismo de biocontrol de *P. chlororaphis* PCL1606. Para comprender los efectos de PCL1606 sobre el hongo *R. necatrix* en la rizosfera de aguacate, se llevaron a cabo una serie de análisis microscópicos. Se utilizaron la cepa silvestre *P. chlororaphis* PCL1606 y una colección de mutantes dirigidos en cada uno de los genes *dar*, relacionados con la producción de HPR en ésta cepa. Tanto la cepa silvestre como los mutantes fueron transformados con plásmidos que contenían la proteína autofluorescente GFP y Ds-Red, otorgándole el color verde y rojo, respectivamente, para su visualización en el microscopio láser confocal. Para estos ensayos ya se disponía de *R. necatrix*-GFP. Las raíces de aguacate se sumergieron en una suspensión bacteriana, tanto de la cepa de la cepa de biocontrol PCL1606 como de los diferentes mutantes dirigidos. Una vez tratados, las plantas de aguacate se colocaron en macetas llenas de sustrato no estéril e inoculados con granos de trigo infectados con *R. necatrix*. Las plantas se dejaron 21 días en un invernadero a 24°C, HR 70% y aproximadamente 14-16 horas de luz natural. El análisis de la interacción en la rizosfera de aguacate mediante microscopia confocal láser reveló i) la capacidad de colonización de la cepa *P. chlororaphis* PCL1606 y los mutantes dirigidos en las plantas de aguacate no infectadas con *R. necatrix*, ii) la cepa de biocontrol PCL1606 es capaz de interactuar directamente con la hifa del hongo, lo que puede representar un nuevo mecanismo de biocontrol adicional, iii) la producción de HPR por *P. chlororaphis* PCL1606 puede afectar negativamente al crecimiento de la hifa del hongo *R. necatrix*, mostrando cambios en la apariencia de la hifa de *R. necatrix* como el ensanchamiento, vacuolización o cambios en la dirección de crecimiento fúngico.

Esta investigación ha sido financiada por el Proyecto AGL2011-30354-C02-01 (MINECO, España) cofinanciado por FEDER. CE Calderón recibió el apoyo de una beca de FPI, MICINN, España.

Evaluación de la capacidad supresora de las enmiendas con cáscara de almendra y potenciales genes implicados en dicha actividad

C.M. Vida-Hinojosa^{1*}, A. de Vicente¹, J.C. Codina¹, N. Bonilla¹, F.M. Cazorla¹

¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC) Campus de Teatinos, 29071. Málaga. E-mail: cvida@uma.es

El continuo crecimiento del cultivo del aguacate (*Persea americana*) en España, alcanza una superficie estimada de unas 13.500 Ha, con una producción aproximada de 57.000 Tn/año y unos 76 millones de euros de facturación, siendo uno de los principales cultivos subtropicales del país. Una de las principales enfermedades de este cultivo es la podredumbre blanca (PB), causada por el ascomiceto *Rosellinia necatrix*. Los síntomas de esta enfermedad comienzan con el amarilleamiento de las hojas, que tarde o temprano se marchitan y en última instancia, y en casos muy agresivos, puede causar la muerte del árbol unas semanas después de la aparición de los primeros síntomas.

El control de la PB se ha planteado desde hace años como una estrategia de control integrado que incluye diversos métodos de lucha, entre los que se encuentra la manipulación de la ecología de los suelos por adición de enmiendas orgánicas que le pueden conferir un efecto supresivo o protector. Estudios previos han mostrado que la aplicación de enmiendas orgánicas provoca un cambio en las comunidades microbianas de suelo, tanto a nivel poblacional como funcional. En concreto, la utilización de cáscara de almendra compostada es una práctica muy extendida entre los productores de aguacate del sur de la Península, siendo los propios agricultores los que arrojan evidencias de que dicha aplicación tiene un efecto positivo sobre los cultivos.

Con objeto de poner de manifiesto y valorar las posibles propiedades supresivas de los suelos agrícolas enmendados con cáscara de almendra compostada, se han realizado ensayos "in vitro" empleando plantas sensibles al patógeno (*Persea americana* y *Triticum aestivum*) creciendo en distintos sustratos. Los resultados preliminares muestran un cierto grado de supresividad contra *R. necatrix*, así como la existencia de una clara relación entre la presencia de las comunidades microbianas en estos suelos y su carácter supresivo. Simultáneamente, para profundizar en los posibles mecanismos implicados en la supresividad, se ha iniciado la detección de marcadores microbianos de interés a partir de microorganismos cultivables Gram-negativos aislados de suelos enmendados con cáscara de almendra compostada. Los marcadores ensayados hasta el momento son genes de antibióticos antifúngicos como el ácido 1-fenazin-carboxílico, (PCA), 2-hexil 5-propil resorcinol (HPR), pirrolnitrina (PRN), pioluteorina (PLT), 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) y el compuesto volátil ácido cianhídrico (HCN). Estos ensayos han revelado la dificultad para diseñar cebadores "universales" compatibles con la diversidad microbiana del suelo, lo que limitaría la técnica de PCR. Alternativamente, se ha puesto a punto la detección por hibridación de colonia (colony blot), con sondas específicas de ADN marcadas con digoxigenina, que ha resultado en la detección de estos marcadores en un mayor número de cepas bacterianas procedentes de las comunidades microbianas de suelos enmendados con cáscara de almendra compostada.

Esta investigación ha sido financiada por el Proyecto AGL2011-30354-C02-01 (MINECO, España) y cofinanciada por FEDER. C.M. Vida-Hinojosa recibió la financiación de una beca FPI, MINECO, España.

La inoculación con *Phyllobacterium* aumenta el rendimiento de los cultivos de fresa

J. D. Flores-Félix^{1*}, M. Marcos-García¹, E. Menéndez¹, L.P. Rivera¹, P. Martínez-Hidalgo¹, L. Celador-Lera¹, P.F. Mateos^{1,2}, E. Velázquez^{1,2}, E.o Martínez- Molina^{1,2}; R. Rivas^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca; ²Unidad Asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC(IRNASIA)
E-mail: emm@usal.es

El sector agrícola presenta una destacada importancia en la economía española, destacando en algunas regiones donde la producción agrícola es una pieza clave en el motor económico de las mismas. El desarrollo de una agricultura competitiva y de calidad es uno de los principales retos a los que el sector agrícola español se enfrenta en la actualidad. Para ello se deben desarrollar técnicas que además de incrementar la productividad agrícola, sean capaces de reducir el impacto de esta actividad en el medio ambiente, consiguiendo a su vez, que los productos obtenidos sean más atractivos para el consumidor, tanto nacional como internacional. En este marco, el cultivo de fresa tiene especial importancia en España, ya que somos el principal exportador de esta fruta en el mundo y para mantener estas cifras se deben mantener unos estándares de producción acordes a las exigencias de los mercados, que piden mercancías producidas de manera más natural y respetuosa con el medioambiente. Una de las herramientas con las que afrontar este reto es el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs en la agricultura. Estas bacterias presentan mecanismos capaces de estimular el desarrollo de las plantas, como son la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato o la producción de fitohormonas. En este trabajo se plantea la inoculación de la cepa PEPV15, identificada como *Phyllobacterium endophyticum*, aislada a partir del nódulos de *Phaseolus vulgaris*, sobre cultivos de fresa (*Fragaria x ananassa*) debido a que esta bacteria presenta mecanismos PGPR como es la producción de ácido indol acético en concentraciones óptimas. En primer lugar, se estudió la respuesta de plántulas de fresa a la inoculación con esta bacteria como primera aproximación de esta interacción, presentando aquellas plántulas inoculadas un desarrollo más temprano y una raíz más pilosa que las plántulas control sin inocular. El estudio de la interacción bacteria-planta mediante microscopía de fluorescencia mostró que la cepa PEPV15 era capaz de colonizar la superficie radicular de la planta de forma muy activa, formando agregados entre los pelos radicales, mostrando, también, especial predilección por los espacios intercelulares. A continuación, el estudio de la interacción utilizando microscopía confocal, confirmó la capacidad de la cepa PEPV15 para crecer en la superficie de la raíz, observándose la formación de extensos céspedes sobre la raíz de fresa. Los estudios en microcosmos mostraron que los plantones de fresa inoculados con la cepa PEPV15 presentaban un desarrollo más temprano de las flores y por tanto de la producción de frutos, así como un mayor número de estolones, los cuales, a su vez, presentaban una longitud media superior, incrementándose, la generación de esquejes por planta. Al analizar el peso fresco medio de los frutos se constató que los valores eran similares, sin embargo, el número de frutos total producido por los plantones inoculados era superior que los frutos recolectados de los plantones control sin inocular, siendo el peso total de la producción de los plantones inoculados con la cepa PEPV15 un 24% superior que en los plantones de fresa sin inocular.

Uso de *Rhizobium cellulosilyticum* como co-inoculante en *Phaseolus vulgaris* L.

A. Díez-Méndez*, E. Menéndez, J.D. Flores-Félix, L.P. Rivera, L. Celador-Lera, M. Marcos-García, E. Rivas-Sánchez, E. Velázquez¹, E. Martínez-Molina, R. Rivas y P.F. Mateos

*Departamento de Microbiología y Genética. Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias.
Universidad de Salamanca.
e-mail: pfm@usal.es*

Dentro de los microorganismos con potencial en promoción del crecimiento vegetal, se incluyen diversas bacterias entre las que destacan especialmente el grupo de los rizobia ya que constituyen el grupo más amplio de endosimbiontes capaces de fijar Nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas y que presentan la ventaja de actuar como endófitos en no leguminosas. Además, la experiencia de la inoculación de los rizobia en leguminosas es muy extensa ya que han sido utilizados como inoculantes de leguminosas durante décadas demostrando su elevado nivel de seguridad para la salud humana y animal. Entre los múltiples factores que determinan una unión efectiva entre los rizobios y las raíces de las plantas, puede encontrarse la facultad de diversas especies de rizobia para producir biofilms sobre diferentes tipos de sustratos, incluidos materiales inertes como plástico, vidrio y arena, lo que haría a estas especies más competitivas frente a otros microorganismos. Un aspecto fundamental cuando se trata de estudiar la efectividad de un inoculante es conocer su competitividad por la unión a las raíces de las plantas con respecto al resto de los organismos del suelo. En referencia a la formación de estos biofilms sobre material vegetal y del papel fundamental que pueden tener en la consecución de un biofertilizante ideal, nuestro grupo de investigación ha conseguido detectar microfibrillas de celulosa producidas por cepas de *Rhizobium* y asociadas al anclaje a las raíces de la planta hospedadora (Mateos *et al.*, 1995; Robledo *et al.*, 2012). Recientemente, en unos experimentos preliminares, nuestro grupo de investigación ha comprobado que la especie *Rhizobium cellulosilyticum*, cuyo hospedador natural es *Medicago sativa* y la cual fue aislada en nuestro laboratorio (García-Fraile *et al.*, 2007), es capaz de producir cantidades elevadas de celulosa que puede ser esencial en la colonización radicular de los vegetales y por lo tanto un primer paso para inducir una promoción del crecimiento, ya sea utilizando a *Rhizobium cellulosilyticum* como único inoculante o bien actuando esta bacteria como *helper* cuando se co-inocula con otras bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) aisladas en nuestro laboratorio. En esta comunicación presentamos los resultados obtenidos al realizar una co-inoculación de diferentes cepas de *Rhizobium* en alubia. El análisis de los datos obtenidos nos indica que la co-inoculación de *Rhizobium cellulosilyticum* incrementa la producción total de la cosecha de alubia con respecto a la inoculación por separado de las cepas analizadas y del control sin inocular bajo condiciones controladas de invernadero.

Mateos *et al.* (1995) *Can. J. Microbiol.* 41:202-207.

Robledo *et al.* (2012) *MCF* 11:125.

García-Fraile *et al.* (2007) *IJSEM* 57:844-849.

Los nódulos de *Lotus corniculatus* son una fuente de obtención de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

M. Marcos-García^{1*}, E. Menéndez¹, L. Celador-Lera¹, L.P. Rivera¹, E. Martínez-Molina^{1,2}, P.F. Mateos^{1,2}, E. Velázquez^{1,2}, R. Rivas^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca; ²Unidad Asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC(IRNASA)
E-mail: evp@usal.es

Los microorganismos son agentes biológicos útiles para los cultivos por su potencial de favorecer la nutrición de las plantas, y como elicitores de resistencia sistémica frente a patógenos y de producción de fitohormonas por parte de la propia planta. Los mecanismos de la promoción directa del crecimiento vegetal son diversos e incluyen la estimulación del crecimiento de las raíces, la rizorremediación y el control del estrés en las plantas. En este sentido, se ha demostrado que los nódulos de leguminosas son una fuente excelente de obtención de bacterias seguras para ser utilizadas como biofertilizantes. *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* o *Ensifer*, son algunos de los géneros de bacterias habituales que encontramos dentro de estos nódulos y que son responsables de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas. Sin embargo, poco se conoce de la interacción de estas bacterias con otras plantas no leguminosas. Por esta razón, en este estudio hemos pretendido aislar un microorganismo endófito de nódulo de *Lotus* y comprobar su interacción con plantas de interés hortícola. De los aproximadamente 650 géneros que forman la familia Fabaceae, el género *Lotus* comprende alrededor de 100 especies, anuales y perennes, de distribución mundial, dentro de las cuales la especie *Lotus corniculatus* es una de las cuatro especies más importantes desde el punto de vista agrónomo. Así, en este estudio aislamos bacterias endófitas de nódulos de *Lotus corniculatus*, obteniendo una cepa, la CSLC01N que presentaba capacidad potencial de promover el crecimiento de las plantas por medio de mecanismos como la síntesis de ácido indol acético y la capacidad de producir sideróforos. El análisis filogenético del gen ribosómico 16S mostró que la cepa pertenece al género *Mesorhizobium*, siendo la especie más próxima *Mesorhizobium loti*. Los ensayos preliminares de nuestro aislado inoculado en semillas de zanahoria y cebolla mostraron que en las plantas inoculadas con la bacteria, se aceleraba el desarrollo tisular del tallo y se desarrollaba una raíz más pilosa que en los controles negativos lo cual repercutía favorablemente en la superficie de absorción de la raíz, con las connotaciones positivas que esto implica para la mejora en la absorción de nutrientes y agua. Para comprobar la interacción de nuestro aislado con las raíces de estas plantas no leguminosas, se realizó un análisis mediante microscopía de fluorescencia de las raíces de las plantas inoculadas de zanahoria y cebolla con la cepa CSLC01N-RFP, transformada por conjugación triparental. Este análisis nos reveló que la bacteria colonizaba los espacios intercelulares y las depresiones entre las células de la raíz tanto de zanahoria como de cebolla, pero con una mayor actividad en la primera, lo que posibilita ver un patrón geométrico. Con ello podemos afirmar que *Mesorhizobium loti* muestra una interacción positiva con las raíces de zanahoria y cebolla facilitando una promoción eficiente del desarrollo de plantas.

Capacidad fijadora de nitrógeno de *Micromonospora*

P. Martínez Hidalgo*, J. Olivares, A. Delgado, E. Bedmar, E. Martínez Molina.

*Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.
Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, CSIC-Universidad de Granada.
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.*

Durante la última década se han sucedido una serie de aportaciones científicas de enorme importancia en el campo de la fijación simbiótica de nitrógeno y más concretamente en las interacciones mutualistas con leguminosas. La fijación simbiótica de nitrógeno parecía una característica exclusiva del grupo derivado del *Rhizobium* original, pero numerosos estudios han demostrado la capacidad fijadora de nitrógeno en otros géneros microbianos.

En estudios realizados por Valdés *et al.*, 2005 se describe, en nódulos de casuarina, una actinobacteria distinta de *Frankia*, que fue identificada como *Micromonospora* y que de acuerdo con sus resultados podría fijar nitrógeno atmosférico.

En estudios previos, en nuestro laboratorio, también ha quedado establecido que *Micromonospora* se aísla del interior de nódulos de leguminosas y que la inoculación de las plantas de alfalfa con *Micromonospora* sola o coinoculada con *Ensifer* mejora la nutrición nitrogenada.

Todas estas consideraciones nos han llevado a plantearnos si una de las funciones de *Micromonospora* en el nódulo es la de fijar nitrógeno para la planta junto con *Ensifer*. Para dar respuesta a esta cuestión nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

(i) Comprobar la capacidad de crecimiento de nuestros aislados en medios sin nitrógeno tanto líquidos como sólidos. (ii) Comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre mediante la técnica de reducción de acetileno. (iii) Comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno. (iv) Comprobar la capacidad de fijación en plantas inoculadas con *Micromonospora* mediante la técnica de reducción de acetileno. (v) Comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en plantas inoculadas con *Micromonospora* midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno.

Los experimentos realizados para la alcanzar estos objetivos fueron los siguientes:

Crecimiento en medio semisólido y líquido libre de nitrógeno, para determinar si *Micromonospora* podía crecer en estas condiciones, lo que implicaría su capacidad para la síntesis de compuestos nitrogenados a partir de nitrógeno atmosférico.

Determinar, mediante cromatografía de gases, la capacidad de reducción de acetileno en cultivos puros de *Micromonospora* y también en asociación con alfalfa.

Determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en cultivos puros de *Micromonospora* en medio líquido y también *in planta* crecidos en atmósfera enriquecida en ¹⁵N

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que *Micromonospora*: (i) No tiene capacidad de crecimiento en medios sin nitrógeno tanto líquidos como sólidos. (ii) No se detecta actividad nitrogenasa, en vida libre ni en asociación con alfalfa mediante la técnica de reducción de acetileno. (iii) No tiene capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre ni en simbiosis con *Medicago sativa* midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno.

Se puede concluir que *Micromonospora*, en nuestras condiciones de ensayo, no tiene capacidad de fijar nitrógeno, ya sea en vida libre o en simbiosis con *Medicago sativa*.

Diversidad de microorganismos endófitos en diferentes zonas de *Zea mays*

L. Celador-Lera^{1*}, J.D. Flores-Félix¹, L.P. Rivera¹, E. Martínez- Molina^{1,2}, P.F. Mateos^{1,2}, E. Velázquez^{1,2}, R. Rivas^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca; ²Unidad Asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC(IRNASA)
E-mail: raulrg@usal.es

Las bacterias endófitas presentes en los tejidos de las plantas son capaces de mejorar las capacidades de las plantas y con ello el crecimiento. Además, pueden contribuir significativamente a la mejora del crecimiento de la planta y se puede suponer también una fuente de fertilización para la planta hospedadora.

En este estudio, se pretendió analizar la diversidad de microorganismos endófitos en raíz y tallo de *Zea mays*. Se aislaron 87 cepas de microorganismos endófitos y se caracterizaron genotípicamente empleando técnicas moleculares basadas en perfiles de ADN que permiten el estudio de la biodiversidad infraespecífica. Para analizar la biodiversidad de las cepas utilizamos los perfiles RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), lo que nos permitió observar una gran diversidad de aislados. Para agrupar las cepas empleamos los perfiles de TP-RAPD (Two Primers-RAPD), que a diferencia de los RAPD, utilizan 2 primers complementarios de regiones altamente conservadas del ADNr 16S para la amplificación, obteniendo perfiles que nos permiten diferenciar a nivel de subespecie. De cada uno de los grupos obtenidos seleccionamos un aislado representativo para identificarlo mediante la secuenciación del gen ribosómico 16S. Los resultados obtenidos nos permitieron observar una gran cantidad y diversidad de géneros en la raíz, entre los cuales están *Pantoea*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Leifsonia*, *Yokenella*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Erwinia*, *Staphylococcus*, *Curtobacterium* y *Streptomyces*. Sin embargo, en el tallo se encontró una menor diversidad, obteniéndose aislados de los géneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Agrococcus* y *Aerobasidium*. De esta forma, tan sólo los géneros *Pantoea*, *Microbacterium* y *Bacillus* fueron aislados tanto en raíz como en tallo, siendo *Pantoea vagans* la única especie común de ambos sitios. Esta diferencia puede deberse a que la rizosfera forma una zona de transición entre el suelo y la superficie de la raíz de la planta, pudiéndose acumular gran cantidad de microorganismos diferentes algunos de los cuales pueden comportarse como endófitos, ya que el exudado de las raíces proporciona nichos ecológicos adecuados para el crecimiento de este tipo de microorganismos.

En alusión a las capacidades promotoras de crecimiento observadas en los endófitos, decidimos realizar un análisis de la producción de compuestos implicados en la promoción del crecimiento vegetal, observando que el 21% de las cepas aisladas eran capaces de solubilizar fosfato, el 45% de producir sideróforos y el 96% de producir ácido indol-acético.

PARTICIPANTES**CENTRO**

Añorga García, Maite	Universidad Pública de Navarra
Arrebola Díez, Eva	Universidad de Málaga
Badosa Romañó, Esther	Universitat de Girona
Baena Roperó, Irene	Universidad Autónoma de Madrid
Bellón Gómez, Davinia-Loreto	Universidad de Málaga
Bonaterra Carreras, Anna	Universitat de Girona
Caballo Ponce, Eloy	Universidad de Málaga
Cabrefiga Olamendi, Jordi	Universitat de Girona
Calatrava Morales, M ^a de las Nieves	Estación Experimental del Zaidín
Cambra Álvarez, Mariano	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
Carrasquilla Gallego, Marc	Universitat Autònoma de Barcelona
Carrero Carrón, Irene	Universidad de Salamanca
Carrión Bravo, Víctor José	Universidad de Málaga
Castañeda Ojeda, M ^a del Pilar	Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea
Cazorla López, Francisco M.	Universidad de Málaga
Crespo Gómez, José Ignacio	Universidad de Málaga
Cubero Dabrio, Jaime	Instituto Nacional de Inv. y Tecnología Agraria y Alimentaria
de Cal Cortina, Antonieta	Instituto Nacional de Inv. y Tecnología Agraria y Alimentaria
de Vicente Moreno, Antonio	Universidad de Málaga
del Río Álvarez, Isabel	Universidad Politécnica de Madrid
Echeverría Ancín, Myriam	Universidad Pública de Navarra
Escaño Calderón, Claudia	Universidad de Málaga
Francés Ortega, Jesús	Universitat de Girona
Galeano Revert, Magda	Koppert España, S.L.
Gallegos Fernández, M ^a Trinidad	Estación Experimental del Zaidín
Garita Cambrero, Jerson	Instituto Nacional de Inv. y Tecnología Agraria y Alimentaria
Hermosa Prieto, María Rosa	Universidad de Salamanca
Larena Nistal, Inmaculada	Instituto Nacional de Inv. y Tecnología Agraria y Alimentaria
Llorente Cabratosa, Isidre	Universitat de Girona
López González, María Milagros	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
López Solanilla, Emilia	Universidad Politécnica de Madrid
Magno Pérez-Bryan, M. Concepción	Universidad de Málaga
María Crespo Palomo	Universidad de Málaga
Martínez Cruz, Jesús	Universidad de Málaga
Martínez Del Pino, Lara	Universidad Pública de Navarra
Martínez García, Pedro	Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea
Martínez Hidalgo, Pilar	Universidad de Salamanca
Martínez Molina, Eustoquio	Universidad de Salamanca
Mateos González, Pedro F.	Universidad de Salamanca
Menéndez Gutiérrez, Esther	Universidad de Salamanca
Monte Vázquez, Enrique	Universidad de Salamanca
Montesinos Barreda, Laura	Universitat de Girona
Montesinos Seguí, Emilio	Universitat de Girona
Mora Pons, Isabel	Universitat de Girona
Moragrega Garcia, Concepció	Universitat de Girona
Muriel Fernández, Candelas	Universidad Autónoma de Madrid
Murillo Martínez, Jesús	Universidad Pública de Navarra
Nadal Matamala, Anna	Universitat de Girona
Penyalver Navarro, Ramon	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
Pérez González, Esclaudys	Universidad de Salamanca
Pla de Solà Morales, Maria	Universitat de Girona
Prada Ramírez, Harold A.	Estación Experimental del Zaidín
Puig Garcia, Mireia	Universitat de Girona

Ramos Rodríguez, Cayo	Universidad de Málaga
Ribeiro Teresani, Gabriela	Plant Print Diagnostics, S.L.
Rivas González, Raúl	Universidad de Salamanca
Rivera Rodríguez, Lina Patricia	Universidad de Salamanca
Rivilla Palma, Rafael	Universidad Autónoma de Madrid
Rodríguez Palenzuela, Pablo	Universidad de Málaga
Romero Hinojosa, Diego Francisco	Universidad de Málaga
Roselló Prados, Gemma	Universitat de Girona
Rufián Plaza, José	Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea
Ruz Estévez, Lidia	Universitat de Girona
Soriano García, José D.	Koppert España, S.L.
Soto Misffut, M ^a José	Estación Experimental del Zaidín
Torés Montosa, Juan Antonio	Juan Antonio Torés Montosa
Vela Corcía, David	Universidad de Málaga
Velázquez Pérez, M ^a Encarnación	Universidad de Salamanca
Vida Hinojosa, Carmen M ^a	Universidad de Málaga
Zerriouh, Houda	Universidad de Málaga

ÍNDICE DE AUTORES

Alfaro-Fernández, A.	25	Marcos-García, M.	55, 56, 57
Ameztoy, K.	21	Martín, M.	26, 42
Añorga, M.	32	Martínez del Pino, L.	23
Aragón, I.M.	17	Martínez, L.	50
Arrebola, E.	13, 31, 46	Martínez, M.C.	25
Badosa, E.	49, 50	Martínez, P.M.	12, 28
Baena, I.	42	Martínez-Alonso, M.	40
Bardají, E.	49	Martínez-Cruz, J.	33
Bardaji, L.	23, 32, 38, 39	Martínez-Granero, F.	26
Bedmar, E.	58	Martínez-Hidalgo, P.	55, 58
Bellón-Gómez, D.	34	Martínez-Molina, E.	15,16, 55, 56, 57, 58, 59
Bertolini, E.	25	Matas, I.M.	36
Beuzón, C.R.	29	Mateos, P.F.	15,16, 55, 56, 57, 59
Bonaterra, A.	47	Melgarejo, P.	24
Bonilla, N.	53, 54	Menéndez, E.	15,16, 55, 56, 57
Bonilla, I.	42	Monte, E.	19, 37
Breakspear, A.	16	Montero, M.	45
Bundó, M.	49	Montesinos, E.	45, 47, 48, 49, 50
Caballo-Ponce, E.	36	Montesinos, L.	47, 49
Cabrefiga, J.	48	Mora, I.	48
Calatrava, N.	21	Moragrega, C.	51
Calderón, C.E.	18, 53	Muriel, C.	26
Cambra, M.	25	Murillo, J.	23, 31, 32, 38, 39
Campo, S.	49	Murray, J.D.	16
Cardoza, R.E.	37	Nadal, A.	45
Carrasquilla, M.	40	Nogales, J.	21
Carrero-Carrón, I.	19	Olivares, J.	58
Carrión, V.J.	31, 53	Palacio-Bielsa, A.	30
Castañeda-Ojeda, M.P.	22	Palau, Joan	40
Cazorla, F.M.	18, 31, 46, 53, 54	Palau, Josep	40
Celador-Lera, L.	55, 56, 57, 59	Pérez, E.	37
Coca, M.	49	Pérez-García, A.	13, 14, 33, 34, 41
Codina, J.C.	14	Pérez-Mendoza, D.	17
Codina, J.C.	54	Pla, M.	45
Company, N.	45	Planas, M.	49
Crespo, M.	46	Pliego, C.	18
Crespo-Gómez, J.I.	18	Prada-Ramírez, H.A.	17
Cubero, J.	30	Puig, M.	51
Dazzo, F.B.	15	Raaijmakers, J.M.	31
de Cal, A.	24	Ramos, C.	12, 13, 17, 18, 22, 32, 36
de Vicente, A.	3, 14, 18, 31, 33, 41, 46, 53, 54	Redondo, C.	30
Delgado, A.	58	Redondo-Nieto, M.	26
Díez-Méndez, A.	56	Río-Álvarez, I.	28
Echeverría, M.	38, 39	Rivas, R.	15, 55, 56, 57, 59
Espeso, E.A.	24	Rivas-Sánchez, E.	56
Feliu, L.	49	Rivera, L.P.	15, 55, 56, 57, 59
Ferragud, E.	30	Rivilla, R.	26, 42
Flores-Félix, J.D.	55, 56, 59	Robledo, M.	16
Font, M.I.	25	Rodríguez-Herva, J.J.	28
Francés, J.	47	Rodríguez-Palenzuela, P.	12, 13, 28, 38
Freeman, S.	46	Romero, D.	13, 14, 33, 41
Gaju, N.	40	Romero-Jiménez, L.	17
Gallegos, M.T.	17	Roselló, G.	47
García-Gutiérrez, L.	13, 14	Rossignol, M.	49
Garita-Cambronero, J.	30	Rufián, J.S.	29
Gascón, B.	50	Ruiz, C.	45
Guevara, C.M.	29	Ruiz-Albert, J.	29
Gutiérrez, S.	37	Ruz, L.	51
Gutiérrez-Barranquero, J.A.	31, 46	Sabuquillo, P.	30
Hanane, O.	50	San Segundo, B.	49
Hermosa, R.	19, 37	Sanjuán, J.	17
Herranz, Y.	24	Sena, M.	30
Izquierdo, E.	49	Sitjà, B.	48
Jalvo, B.	26	Soto, M.J.	21
Jiménez-Díaz, R.M.	19	Squartini, A.	15
Kitajima, E.W.	25	Tanaka, F.	25
la Paz, J.L.	45	Teresani, G.R.	25
Larena, I.	24	Torés, J.A.	34, 41, 46
Llirós, M.	40	Valiente, E.	42
Llorente, I.	51	van der Voort, M.	31
Lloret, F.J.	42	van Steenberg, B.	21
López, M.M.	25, 30	Vela-Corcía, D.	33, 41
López-Solanilla, E.	12, 22, 28	Velázquez, E.	15,16, 55, 56, 57, 59
Lucia, A.	29	Vida-Hinojosa, C.M.	54
Macho, A.P.	29	Villarino, M.	24
Magno, M.C.	13	Yanni, Y.G.	15
		Zerriouh, H.	13, 14
		Zumaquero, A.	29