



I Reunión del Grupo Especializado
Microbiología de Plantas

**Programa
y
Libro de resúmenes**

Cercedilla (Madrid), 6–8 de junio, 2005

I Reunión Grupo Especializado
Microbiología de Plantas
Cercedilla (Madrid)
6 – 8 junio 2005

MiP '05

Con el patrocinio de:



<http://www.inycom.es/>



<http://www.teknozas.com/>



<http://es.vwr.com/>

Sociedad Española de Microbiología
<http://www.semicro.es>

Comité Organizador

Antonio de Vicente Moreno	Universidad de Málaga
Emilia López Solanilla	Universidad Politécnica de Madrid
Jesús Murillo Martínez	Universidad Pública de Navarra
Alejandro Pérez García	Universidad de Málaga
Pablo Rodríguez Palenzuela	Universidad Politécnica de Madrid

Colaboradores:

María Antúnez Lamas
Lilian Bracamonte Muñoz
M^a Aranzazu Llama-Palacios
Alfredo Maggiorani Valecillos

Universidad Politécnica de Madrid

Lunes 6 de junio

Almuerzo

16:15. Inauguración de la reunión.

16:30-17:45. Sesión 1. Resistencia a fungicidas y estrés abiótico (Moderadores: E. Marco-Noales y J. Cubero)

- R1 Resistencia a estrobilurinas en oídio de cucurbitáceas.
D. Fernández-Ortuño, F. J. López-Ruiz, A. Pérez-García y J. A. Torés.
- R2 Resistencia a fungicidas inhibidores de la biosíntesis de ergosterol en *Podosphaera fusca*, agente causal del oídio de las cucurbitáceas.
F. J. López-Ruiz, D. Fernández-Ortuño, A. Pérez-García y J. A. Torés.
- R3 Valoración de la eficacia *in vitro* de fungicidas frente a aislamientos asturianos de *Cryphonectria parasitica*.
G. González-Varela y A. J. González.
- R4 Interacción entre *Erwinia amylovora* y los iones cobre.
M. Ordax, E. Marco-Noales, M. M. López y E. G. Biosca.
- R5 Efecto del estrés abiótico sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.
B. Morón, M. Megías, F. Merchán, L. de Lorenzo, J. Estévez, M. S. Dardanelli y C. Sousa.

Pausa café

18:15-19:30. Sesión 2. Diversidad microbiana (Moderadores: E. Marco-Noales y J. Cubero)

- D1 Caracterización mediante discriminación alélica de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri con limitado y amplio rango de huéspedes.
J. Cubero y J. H. Graham.
- D2 Búsqueda de variabilidad fenotípica y genotípica en aislados de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi de olivo.
J. M. Quesada, I. Pérez-Martínez, R. Peñalver, C. Ramos y M. M. López.
- D3 Diferenciación de aislados de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi mediante análisis de microsátélites en la región codificante del gen *iaaL*.
I. M. Matas, J. M. Quesada, R. Peñalver y C. Ramos.
- D4 Diversidad de *Podosphaera fusca* en España: Análisis biológico y molecular de las poblaciones de oídio de cucurbitáceas.
E. Mingorance, J. A. Torés, A. de Vicente y A. Pérez-García.
- D5 Diversificación genética durante la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas fluorescens*. Variación de fase y aumento de la competitividad.
F. Martínez-Granero, J. Larenas, A. Navazo, R. Rivilla y M. Martín.

Discusión General (Moderadores: E. Marco-Noales y J. Cubero)

Martes 7 de junio

9:30-11:00. Sesión 3. Control biológico (Moderadores: A. Bonaterra y F. M. Cazorla)

- C1 Papel de los lipopéptidos en la capacidad de biocontrol de cepas de *Bacillus subtilis* contra *Podosphaera fusca*.
D. Romero, A. Pérez-García, F. M. Cazorla y A. de Vicente.
- C2 Control biológico de enfermedades bacterianas de filosfera de cucurbitáceas.
H. Zerrouh, D. Romero, A. de Vicente y A. Pérez-García.
- C3 Evaluación de un procedimiento para el control biológico de podredumbres fúngicas y de bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias en fruta y hortalizas frescas.
E. Badosa, R. Trias, D. Parés, M. Pla, L. Bañeras y E. Montesinos.
- C4 Mecanismos de acción de *Pantoea agglomerans* EPS125 en el control biológico de la podredumbre azul y el fuego bacteriano en frutales.
M. C. Moreno, E. Badosa, P. Rodríguez-Palenzuela, E. López y E. Montesinos.
- C5 Desarrollo de un método de trazabilidad del agente de control biológico del fuego bacteriano *Pseudomonas fluorescens* EPS62e mediante PCR en tiempo real.
M. Pujol, E. Badosa, C. Manceau y E. Montesinos.
- C6 Estudio de la expresión de proteínas PR en peral y tomate inducidas por la aplicación de productos fitosanitarios y bacterias fitopatógenas.
L. Ruz, C. Moragrega y E. Montesinos.

Excursión y picnic

17:00-18:15. Sesión 4. Control biológico (cont.) (Moderadores: A. Bonaterra y F. M. Cazorla)

- C7 Evaluación de bacterias de suelo y rizosfera como agentes de biocontrol de la podredumbre blanca radicular en aguacate.
M. A. González-Sánchez, T. Zea-Bonilla, P. M. Martín-Sánchez, F. M. Cazorla, C. Ramos, A. de Vicente y R. M. Pérez-Jiménez.
- C8 Mecanismos bacterianos implicados en el control biológico de la podredumbre blanca del aguacate causada por *Rosellinia necatrix*.
C. Pliego, F. M. Cazorla, R. M. Pérez-Jiménez y C. Ramos.
- C9 Análisis del papel en biocontrol de la producción del antibiótico 2-hexil, 5-propil resorcinol por *Pseudomonas fluorescens* PCL1606.
D. J. Ruiz-Romero, A. de Vicente y F. M. Cazorla.
- C10 Efecto de rizobacterias en la promoción del crecimiento y en el control biológico de patógenos de *Fragaria* sp. y *Prunus* sp.
L. Agustí, A. Bonaterra, C. Moragrega y E. Montesinos.
- C11 Adherencia de *Penicillium oxalicum* a las raíces del tomate.
P. Sabuquillo, A. Szejnberg, A. De Cal, P. Melgarejo.

Discusión general (Moderadores: A. Bonaterra y F. M. Cazorla)

19:30. Reunión del grupo especializado y Elecciones de la junta directiva.

Miércoles 8 de junio

9:00-10:15. Sesión 4. Patogénesis (Moderadores: C. Ramos y P. Llop)

- P1 Fluorescencia de imagen aplicada al estudio de infecciones bacterianas de plantas.
L. Rodríguez-Moreno, M. Pineda, J. Soukupová, A. Macho, C. R. Beuzón, L. Nedbal, C. Ramos y M. Barón.
- P2 Caracterización del sistema polifenol oxidasa de la bacteria patógena de plantas *Ralstonia solanacearum* y su posible papel fisiológico.
D. Hernández-Romero, F. Solano-Muñoz y A. Sánchez-Amat.
- P3 Estudio de genes implicados en la producción de mangotoxina en *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y su papel en la virulencia.
M. A Vázquez, E. Arrebola, A. de Vicente y F. M. Cazorla.
- P4 La región de biosíntesis de faseolotoxina está conservada en *P. syringae* pvs. *phaseolicola* y *actinidiae*, pero no en *P. syringae* pv. *syringae*.
L. Navarro, K. López-lópez, N. Mateo, S. Aguilera-Aguirre, A. Álvarez-Morales y J. Murillo.
- P5 Factores de virulencia en *Erwinia amylovora*: papel del plásmido ubicuo pEA29.
P. Llop, J. Cabrefiga, E. Montesinos y M. López.

Pausa café

10:45-12:00. Sesión 5. Patogénesis (cont.) (Moderadores: C. Ramos y P. Llop)

- P6 Resistencia de *Erwinia chrysanthemi* a los mecanismos de defensa de la planta.
A. Llama-Palacios, E. López-Solanilla, A. Maggiorani, M. Antúnez-Lamas y P. Rodríguez-Palenzuela.
- P7 Infecciones mixtas para el análisis genético de la interacción *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* con judía.
A. P. Macho, A. Zumaquero, I. Ortiz-Martín y C. R. Beuzón.
- P8 Herramientas moleculares para el análisis de la regulación de la expresión del sistema de secreción tipo III Hrp en *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.
I. Ortiz-Martín, A. P. Macho y C. R. Beuzón.
- P9 Interacción entre efectores bacterianos tipo III y el sistema de sumolización de plantas.
C. M. Guevara, E. R. Bejarano y J. Ruiz-Albert.
- P10 Identificación y análisis de genes de virulencia en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.
I. Pérez-Martínez, L. Lambertsen, E. Santilli, S. Tegli, J. Murillo, C. Ramos.

Discusión general (Moderadores: C. Ramos y P. Llop)

13:00. Clausura de la reunión.

Almuerzo

Resistencia a estrobilurinas en oídio de cucurbitáceas

| R1

D. Fernández-Ortuño^{1*}, F. J. López-Ruíz¹, A. Pérez-García² y J. A. Torés¹

¹Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), Algarrobo-Costa E-29750 Málaga.

²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: tores@eelm.csic.es

En España, se ha descrito como único agente causal del oídio de las cucurbitáceas al hongo *Podosphaera fusca*. En la actualidad, el principal método de control de la enfermedad consiste en el empleo combinado de fungicidas con distintos mecanismos de acción. Uno de los grupos de fungicidas más utilizados son las estrobilurinas. Estos compuestos, se caracterizan por ser unos potentes inhibidores de la respiración mitocondrial, siendo su diana el centro Qo del complejo proteico citocromo bc₁, por ello son también llamados QoIs. Al actuar, bloquean la síntesis de ATP provocando la muerte de patógeno al no poder realizar sus funciones vitales. Aunque el control químico sea el más empleado, conlleva el grave inconveniente de la aparición de cepas resistentes a estos productos fitosanitarios con relativa frecuencia.

Para evaluar los niveles de resistencia/sensibilidad a estrobilurinas en *P. fusca*, se usaron tres fungicidas pertenecientes a este grupo (kresoxim metil, azoxistrobin y trifloxistrobin). El cálculo de los valores de CMI y CE₅₀ se realizó mediante un ensayo con discos de cotiledones de calabacín mantenidos *in vitro*. Tras realizar tres repeticiones por cepa y concentración de fungicida con 50 aislados de *P. fusca*, se observó resistencia cualitativa a estrobilurinas, ya que se obtuvieron dos tipos diferentes de cepas: sensibles (CMI < 25 µg/ml) y resistentes (CMI > 500 µg/ml). Además, esta resistencia fue, en todos los casos, cruzada, puesto que las cepas resistentes a cualquiera de estos fungicidas lo eran también a los otros dos.

Para obtener una información más completa sobre la distribución de la resistencia a estrobilurinas en *P. fusca* en la mitad sur de España, se analizaron 250 aislados procedentes de distintas provincias (Almería, Badajoz, Ciudad Real, Córdoba, Murcia y Valencia) y campañas agrícolas (2002, 2003 y 2004). La resistencia media global obtenida fue del 33%, esto indica que en España una de cada tres cepas de *P. fusca* es resistente a estrobilurinas. Por provincias, destacaba por su elevada frecuencia de resistencia Murcia (74%), seguida de Córdoba y Ciudad Real, con 51% y 44% de resistencia, respectivamente. Con niveles de resistencia inferiores aparecían Valencia (13%) y Almería (11%). En Badajoz, sin embargo, no detectó ningún aislado resistente.

Para comprobar si la resistencia a estrobilurinas observada en *P. fusca* se correlacionaba con mutaciones puntuales en el gen *cytb* que codifica la proteína diana de estos fungicidas (citocromo b), se está procediendo al aislamiento y secuenciación de alelos de dicho gen procedentes de cepas sensibles y resistentes. Para ello, se diseñaron cebadores degenerados teniendo en cuenta los dominios conservados de la proteína. Para identificar los productos de PCR obtenidos con estos cebadores, se usó como sonda el gen *cytb* de *Magnaporthe grisea*. Mediante esta aproximación pretendemos determinar el papel de las principales mutaciones puntuales descritas en la literatura para el gen *cytb* en el fenómeno de resistencia a estrobilurinas en *P. fusca*.

Resistencia a fungicidas inhibidores de la biosíntesis de ergosterol en *Podosphaera fusca*, agente causal del oídio de las cucurbitáceas

F. J. López-Ruiz^{1*}, D. Fernández-Ortuño¹, A. Pérez-García² y J. A. Torés¹

¹Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), Algarrobo-Costa E-29750 Málaga.

²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: tores@eelm.csic.es

El oídio de las cucurbitáceas es una de las principales micosis que limitan la producción de estos cultivos a nivel mundial. En España, se ha descrito como único agente causal del oídio de las cucurbitáceas a *Podosphaera fusca*, un patógeno biotrofo que coloniza la superficie de las hojas y otros órganos verdes de la planta. Debido a su desarrollo ectoparasítico, la principal estrategia de control de la enfermedad está basada en el empleo combinado de fungicidas. En este estudio se han examinado los niveles de resistencia/sensibilidad a tres fungicidas inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (IBE, miclobutanil, triadimenol y fenarimol) en *P. fusca*, empleando para ello un método de disco de hoja. Con este fin, a partir de una muestra poblacional constituida por 50 aislados procedentes en su mayoría de las provincias de Málaga, Almería y Murcia, junto con algunas cepas foráneas de referencia, se estimaron para cada aislado tres parámetros básicos en este tipo de estudios, concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración efectiva 50 (CE₅₀) y factor de resistencia (FR). En base a la estimación de estos parámetros, se establecieron una serie de concentraciones críticas para cada fungicida que fueron empleadas para estudio posterior a mayor escala de la distribución y frecuencia de la resistencia/sensibilidad a los tres fungicidas IBE comentados. En esta ocasión, se ensayaron 181 aislados recolectados en tres campañas sucesivas de muestreo, 2002, 2003 y 2004, en las provincias de Almería, Badajoz, Ciudad Real, Córdoba, Murcia y Valencia, que son mantenidos en forma de aislados monoconidiales en las colecciones de la Estación Experimental “La Mayora” (CSIC) y el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

Los resultados obtenidos hasta el momento ponen de manifiesto una marcada diferencia entre las distintas provincias muestreadas. Por un lado, en las provincias de Córdoba y Ciudad Real se observó una nula o escasa resistencia frente a triadimenol y fenarimol, mientras que en las provincias de Badajoz, Murcia y Almería se observaron frecuencias de resistencia que en función del fungicida empleado fueron altas o moderadamente altas. Así, los niveles de resistencia a triadimenol en estas tres últimas provincias oscilaron entre el 7% de Badajoz y el 19% de Almería, mientras que para fenarimol se movieron entre el 20% de Murcia y el 40% de Almería, siendo en todos los casos las frecuencias de resistencia a fenarimol superiores a las observadas para triadimenol. En lo referente a miclobutanil, no se detectó resistencia a este compuesto en ninguno de los aislados ensayados.

Finalmente, con objeto de determinar las bases moleculares de la resistencia a estos fungicidas en *P. fusca*, se está procediendo al aislamiento de secuencias del gen codificante de la enzima C14 α -demetilasa (CYP51), la cual constituye la diana de los fungicidas IBE. Para ello se está llevando a cabo una estrategia de PCR empleando una pareja de cebadores degenerados. Para comprobar la identidad de los fragmentos amplificados se empleará como sonda un fragmento de 1,8 kb del gen CYP51 de *Penicillium digitatum*.

Valoración de la eficacia *in vitro* de fungicidas frente a aislamientos asturianos de *Cryphonectria parasitica*

R3

G. González-Varela* y A. J. González

Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Carretera de Oviedo s/n 33300 Villaviciosa. Asturias. E-mail: ggonzalez@serida.org

El chancro del castaño es una enfermedad de etiología fúngica, producida por *Cryphonectria parasitica*, muy extendida en los castaños asturianos y que afecta tanto a la viabilidad del árbol como al aprovechamiento de su madera. El método de lucha más extendido contra la enfermedad consiste en la utilización de cepas hipovirulentas que, inoculadas en un chancro activo, producen la cicatrización del mismo y la recuperación de la madera. En el presente estudio se planteó como objetivo el estudio de otra alternativa de control como es la terapia química mediante la realización de ensayos *in vitro* de fitosanitarios.

Se ensayaron cinco productos cuyas materias activas eran: Captan (85%), Carbendazima (50%), Epoxiconazol (12,5%) y las mezclas de Folpet (32%) + Cimoxamilo (3%) + Ofurace (6%) y Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%). Las dosis ensayadas siguieron una progresión geométrica de 1 a 1.024 µg/ml referidas siempre a la materia activa de referencia (Captan, Carbendazima, Epoxiconazol y Folpet). También se incluyó un testigo sin producto. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. El medio de cultivo empleado fue el agar de patata y dextrosa. Como inóculo se utilizaron trozos de medio de igual tamaño conteniendo el hongo en estudio que se colocaron boca abajo sobre las placas de cultivo para poner en contacto directo el micelio del hongo con el producto. Las placas se incubaron cinco días a 25°C y el crecimiento se estimó por la media de dos diámetros perpendiculares de las colonias medidos con un pie de rey. Se evaluó únicamente el efecto de los productos respecto al desarrollo del micelio. La disminución del diámetro de la colonia respecto al control se utilizó como indicador de inhibición (total o parcial) del crecimiento. Para determinar el efecto fungistático o fungicida se procedió a resembrar el inóculo de las placas en las que se inhibió el crecimiento, en medio sin producto para comprobar su viabilidad, considerándose la acción del producto fungicida si no crecía en este medio y fungistática si lo hacía.

La materia activa más eficaz fue el Epoxiconazol (12,5%) que consiguió inhibir el crecimiento de las tres cepas en estudio a la concentración de 1 µg/ml, situándose su concentración inhibitoria mínima (CIM) entre 0 y 1 µg/ml y actuando como fungicida. Le siguió en eficacia la mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) que obtuvo el mismo resultado que el anterior con la diferencia de que se comportó como fungicida para las concentraciones de 128 µg/ml y superiores y fungistático para las inferiores.

Interacción entre *Erwinia amylovora* y los iones cobre

M. Ordax^{1*}, E. Marco-Noales¹, M. M. López¹ y E. G. Biosca²

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Dpto. Protección Vegetal y Biotecnología, Ctra. Moncada-Náquera, km-4,5, Apdo. Oficial 46113, Moncada, Valencia. ²Universidad de Valencia. Dpto. Microbiología y Ecología, Dr. Moliner, 50, Burjassot, Valencia.

Erwinia amylovora es el agente causal del fuego bacteriano, que afecta gravemente a las Rosáceas en más de 40 países. Pese a que el control de esta enfermedad mediante el empleo de diferentes compuestos cúpricos no ha sido generalmente satisfactorio, continúa siendo la estrategia de lucha más utilizada debido a la carencia de bactericidas eficaces, a su bajo coste y a la prohibición del uso de antibióticos en muchos países. Ante la escasa información disponible sobre la interacción entre el cobre y *E. amylovora*, se planteó el estudio del papel que los iones Cu^{2+} desempeñan en diferentes aspectos de la biología de esta bacteria. Así, se realizaron experimentos de supervivencia del patógeno en medio mineral con tres concentraciones de cobre a lo largo de 9 meses. Se observó que la presencia de iones cobre, al igual que ocurre en otras bacterias fitopatógenas, inducía la entrada de *E. amylovora* en el estado “viable pero no cultivable” (VBNC), ya que ésta perdió la cultivabilidad en el medio sólido King B, y de forma más rápida a mayor concentración de cobre. Sin embargo, las células bacterianas mantuvieron su viabilidad, según los métodos ensayados de determinación de la integridad de la membrana celular y de la actividad respiratoria. Mediante inoculación en peras inmaduras se determinó que las células VBNC sólo fueron patógenas durante los 5 primeros días tras su entrada en este estado. Pero cuando se redujeron o eliminaron los iones Cu^{2+} del medio mediante la adición de distintos compuestos capaces de acomplejarlos, *E. amylovora* recuperó tanto la cultivabilidad como el poder patógeno, incluso tras 9 meses en el estado VBNC. Al ser observadas por microscopía electrónica de barrido, las células de *E. amylovora* en presencia de cobre aparecieron rodeadas de una cubierta, probablemente debido a un incremento en la síntesis de exopolisacáridos (EPS). Además, se constató un aumento de la mucosidad de las colonias, e incluso una estimulación del crecimiento, en medio sólido King B suplementado con concentraciones de cobre por debajo de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para analizar la función de los EPS en la interacción de *E. amylovora* con el cobre, se realizarán estudios de supervivencia con diferentes mutantes de esta bacteria afectados en la síntesis de amilovorano y/o levano (los dos EPS mayoritarios de este patógeno). Se pretende determinar, mediante protocolos de cuantificación, si el cobre estimula realmente la síntesis de EPS en *E. amylovora*, así como el papel de los EPS en la inducción del estado VBNC por este metal.

Efecto del estrés abiótico sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

| R5

B. Morón*, M. Megías, F. Merchán, L. de Lorenzo, J. Estévez, M. S. Dardanelli y C. Sousa

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González, nº 2. 41012-Sevilla

Las leguminosas constituyen cultivos de gran importancia no sólo por su uso habitual en la alimentación humana y animal, sino también por su capacidad para establecer una relación simbiótica con bacterias conocidas genéricamente como rizobios. Durante la simbiosis, dichas bacterias inducen la formación de unos órganos en la raíces de las plantas denominados nódulos, dentro de los cuales se produce la fijación de nitrógeno atmosférico. Gracias a este proceso, la planta se provee de las fuentes de nitrógeno adecuadas haciendo prescindible el uso de abonos artificiales para desarrollarse, evitándose así problemas de contaminación ambiental.

Sin embargo, el establecimiento de una simbiosis efectiva viene determinado por el estado fisiológico tanto de la leguminosa hospedadora como de la bacteria. La acidez y salinidad del suelo, las bajas precipitaciones y las temperaturas extremas están presentes en grandes extensiones de terreno, limitando el crecimiento y la actividad fijadora de nitrógeno en las leguminosas. En nuestro grupo de investigación se está llevando a cabo el estudio de los efectos de distintos factores medioambientales extremos sobre diversos aspectos de la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Hemos analizado la influencia del estrés ácido y salino sobre la producción de los factores de nodulación bacterianos, moléculas señal imprescindibles en el proceso de nodulación con un papel fundamental en el inicio del desarrollo del nódulo y en la invasión bacteriana. Los resultados obtenidos indican que tanto la acidez como la salinidad incrementan la biosíntesis de los factores de nodulación, modificándose también su estructura. Dado que la actividad de estas moléculas viene determinada por los sustituyentes de la estructura básica común a todos los factores Nod descritos hasta la fecha, estos cambios podrían minimizar los efectos adversos del estrés ambiental sobre las respuestas desencadenadas por los mismos en la planta, pudiendo contribuir también a aumentar su estabilidad.

Por otra parte, estamos analizando las alteraciones del transcriptoma de la leguminosa modelo *Medicago truncatula* como respuesta al estrés salino. Los genes identificados que ven alterada su expresión tras la exposición de las raíces de la planta a altas concentraciones salinas comprenden algunos con funciones en el proceso de nodulación, otros en la transducción de señales y un importante grupo de genes con función desconocida. Asimismo, nuestro trabajo ha permitido generar una colección de arrays de cDNA que contiene genes implicados en las respuestas a estrés salino. Dichos arrays están siendo empleados con éxito para identificar posibles marcadores de estrés por sal en otras leguminosas de interés agronómico.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de INCO-DC (CEE) nº ERBIC18CT980321, por el proyecto nº HF2001.0120 y por el programa Picasso franco-español.

Discusión General

Caracterización mediante discriminación alélica de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri con limitado y amplio rango de huéspedes

| D1

J. Cubero^{1*} y J. H. Graham²

¹Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid 28040.

²Citrus Research and Education Center (CREC), University of Florida, Florida 33850. EEUU.

La cancrrosis de los cítricos está causada por bacterias pertenecientes a los patovares citri y aurantifolia de la especie *Xanthomonas axonopodis*. Es una enfermedad muy grave que ocasiona importantes pérdidas económicas en los países en los que está presente pues imposibilita la exportación de fruta a zonas libres del patógeno. En algunas áreas afectadas por la cancrrosis se llevan a cabo programas de erradicación encaminados a eliminar por completo la enfermedad. En Florida este programa consiste en el arranque de las plantas con síntomas y también de aquellos cítricos asintomáticos que se encuentren en un radio de unos 580 metros de éstos. La erradicación de la cancrrosis supone un coste para el estado de Florida que va incrementándose año tras año y que implica pérdidas de millones de dólares anuales.

Aunque la mayor parte de las cepas de *X. axonopodis* pv. citri afectan a todas las especies de cítricos, recientemente se han descrito algunas que únicamente dan sintomatología en lima mejicana y *Citrus macrophylla*. Estas cepas se han encontrado en el sudoeste asiático (cepas tipo A*) y en Florida (A^w) conviviendo con cepas de amplio rango de huéspedes (A). Mediante amplificación de secuencias repetidas BOX y ERIC PCR es posible distinguir entre cepas de los patovares citri y aurantifolia y además dentro del patovar citri se pueden diferenciar las de limitado de las de amplio rango de huéspedes. La diferencia principal entre los dos tipos de cepas en los perfiles obtenidos por ERIC PCR radica en la presencia en las de tipo A de una banda que está ausente en las A^w ó A* y que corresponde a un fragmento de un gen de respuesta a leucina (*lrp*). La inexistencia de esta banda en cepas de limitado rango de huéspedes se ha visto que no es debida a la ausencia del gen sino a una mínima variación de nucleótidos que afecta de forma drástica a su amplificación mediante ERIC PCR. El gen *lrp* se ha detectado mediante hibridación y PCR en casi todas las especies del género *Xanthomonas* que posteriormente se han clasificado en función de esa secuencia. Las mínimas diferencias en el gen *lrp* entre cepas de cancrrosis de elevado y limitado rango de huéspedes se han utilizado para el diseño de sondas TaqMan MGB que se emplean en reacciones de discriminación alélica para determinar el tipo de cepa de *X. axonopodis* pv. citri que está infectando un árbol. Asimismo, mediante el protocolo de discriminación alélica desarrollado es posible distinguir cepas de *X. axonopodis* pv. citri de *X. axonopodis* pv. citrumelo que no causan cancrrosis sino una enfermedad mucho más leve denominada mancha bacteriana de los cítricos.

La aplicación de esta técnica en un programa de erradicación de cancrrosis permite la rápida toma de decisiones, de tal manera que si se detecta la presencia de la cepa de limitado rango de huéspedes solo es necesario el arranque en la zona de árboles de lima mejicana o *C. macrophylla*, evitando así la pérdida inútil de plantas no susceptibles.

Búsqueda de variabilidad fenotípica y genotípica en aislados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* de olivo

J. M. Quesada^{1*}, I. Pérez-Martínez², R. Peñalver¹, C. Ramos² y M. M. López¹

¹*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). E-mail: mlopez@ivia.es*

²*Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga*

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Pss) es la bacteria causante de la tuberculosis del olivo, cuyos síntomas más característicos son la aparición de tumores en tronco, ramas, brotes y con menor frecuencia en hojas y frutos. Esta enfermedad está extendida por todas las zonas de producción españolas causando pérdidas importantes, aunque no bien evaluadas. Con vistas a un mejor conocimiento de la bacteria causante, resulta necesario disponer de datos sobre la variabilidad de las mismas. El estudio de la variabilidad bioquímica y fisiológica se realizó inicialmente con una selección de 5 cepas de Pss mediante los sistemas comerciales API50CH (bioMérieux) y BIOLOG (Biolog Inc., USA). Para el análisis de la variabilidad molecular se estudió el perfil de plásmidos, la amplificación aleatoria de los fragmentos polimórficos de ADN (RAPDs), PCR de elementos repetitivos (rep-PCR), análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), *outward-facing*-IS53-PCR y la variabilidad con respecto al patrón del elemento de inserción IS53. El metabolismo de los carbohidratos con el sistema API50CH, reveló resultados variables entre las cepas en la utilización del glicerol, D-xilosa, manitol, sorbitol y D-arabitol. Con el sistema BIOLOG las cepas inicialmente ensayadas fueron variables en la utilización de 13 fuentes de carbono. Las 5 cepas seleccionadas contienen entre 2 y 4 plásmidos y se observaron 4 perfiles plasmídicos distintos. Se ensayaron 100 iniciadores de RAPDs y se seleccionaron 6, que permitieron distinguir entre sí las 5 cepas de Pss de orígenes diversos, aunque el patrón fue homogéneo en el caso de 20 cepas de la Comunidad Valenciana analizadas posteriormente. Los iniciadores REP y ERIC también fueron útiles para distinguir cepas de Pss de distintos orígenes, pero con el iniciador BOX se observó una elevada homogeneidad en el patrón de bandas. La técnica de AFLPs, probada inicialmente con 5 cepas de Pss de orígenes diversos, amplificó 40 bandas polimórficas de un total entre 80 a 100 bandas por cepa. Mediante *outward-facing*-IS53-PCR se distinguieron siete patrones de bandas en un total de 12 cepas ensayadas. Además, el patrón del IS53 mostró que todas las cepas de Pss contenían entre 5 y 9 copias del elemento de inserción. De un total de 43 cepas analizadas se obtuvieron 31 patrones de bandas distintos. Las técnicas que han detectado más variabilidad entre las cepas estudiadas son BIOLOG para la caracterización fenotípica y el patrón del elemento de inserción IS53, *outward-facing*-IS53-PCR y AFLPs para la caracterización genotípica. Dada la gran variabilidad y la estabilidad mostrada *in vitro* e *in vivo* por los distintos patrones del IS53, su utilización sería de gran interés como marcador en estudios epidemiológicos.

Diferenciación de aislados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* mediante análisis de microsatélites en la región codificante del gen *iaaL*

I. M. Matas^{1*}, J. M. Quesada², R. Peñalver² y C. Ramos¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: crr@uma.es

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado oficial, 46113 Moncada, Valencia

La tuberculosis del olivo, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), se caracteriza por la formación de tumores en troncos y ramas, síntoma dependiente de la producción bacteriana de fitohormonas en los tejidos vegetales. La mayoría de las cepas de Pss aisladas de tumores de olivo contienen dos copias cromosómicas de cada uno de los genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis del ácido indol-3-acético (IAA), los genes *iaaM*, *iaaH* e *iaaL*. Este hecho, unido a que el único ensayo descrito hasta la fecha que permite la detección molecular de Pss en muestras vegetales se basa en la amplificación mediante PCR de un fragmento interno de uno de estos genes, el *iaaL*, nos llevaron a comprobar si posibles diferencias en las secuencias de este gen podrían diferenciar molecularmente aislados de Pss de distinta procedencia. La amplificación mediante PCR de un fragmento interno de este gen a partir de 30 aislados diferentes seguida de restricción con la enzima *HaeIII* permitió la agrupación de los mismos en 5 perfiles diferentes de PCR-RFLP (RFLP: *restriction fragment length polymorphism*). El grupo I contiene un único alelo del gen *iaaL* (*iaaL-ps*), mientras los grupos II y III contienen además otro alelo del mismo tamaño (*iaaL-psn*); los grupos IV y V contienen el alelo *iaaL-psn* y un alelo *iaaL-ps* de tamaño superior. La secuenciación de los distintos alelos reveló que el extremo 5' de los amplificados de mayor tamaño contiene una secuencia de 3 nucleótidos (TAC) repetida en *tandem*. Estas repeticiones, se acumulan exclusivamente en el alelo *iaaL-ps*, variando el número de repeticiones de una cepa a otra entre 3 y 19. Este tipo de secuencias, conocidas como microsatélites o SSRs (*short tandem repeats*), se han relacionado en bacterias con estrategias evolutivas desarrolladas para la adaptación rápida a los cambios ambientales. Para determinar el número de repeticiones TAC presentes en cada una de las cepas, se realizó una amplificación de un fragmento de menor tamaño que contenía estas SSRs; la resolución de los mismos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida permitió identificar inequívocamente patrones específicos de algunas de las cepas españolas analizadas. Actualmente, estamos determinando, para un conjunto de cepas representantes de cada uno de los grupos de PCR-RFLP establecidos, la estabilidad de los perfiles así como de las SSRs, tanto en cultivo líquido tras 90 generaciones como *in vivo*. Para llevar a cabo los ensayos de estabilidad *in vivo* las cepas de Pss se inocularon en tallos de plantas de olivo y, tras 6 ó 12 meses de permanencia en los tumores aparecidos, las cepas se aislaron de los mismos y se compararon con las originalmente inoculadas.

Diversidad de *Podosphaera fusca* en España: Análisis biológico y molecular de las poblaciones de oídio de cucurbitáceas

E. Mingorance^{1*}, J. A. Torés², A. de Vicente¹ y A. Pérez-García¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

²Estación Experimental "La Mayora" (CSIC), Algarrobo-Costa E-29750 Málaga.

E-mail: aperez@uma.es

El oídio de las cucurbitáceas es uno de los principales patógenos de origen fúngico que limitan la producción de dichos cultivos a escala mundial. En España, el único agente causal de la enfermedad es *Podosphaera fusca*, cuya sintomatología se caracteriza por la aparición de pequeñas manchas blanquecinas sobre las superficies aéreas de la planta, consecuencia del desarrollo superficial del micelio. *P. fusca* es un hongo heterotálico, capaz de iniciar la fase sexual de su ciclo de vida cuando se enfrentan aislados con tipos de compatibilidad opuestos (MAT 1-1 y MAT 1-2). Gracias a la posibilidad de experimentar recombinación y a la gran capacidad de dispersión del hongo durante la fase asexual, las poblaciones de *P. fusca* pueden incrementar su variabilidad genética y favorecer de este modo la aparición y selección de cepas resistentes a fungicidas o capaces de desarrollarse sobre cultivares en principio resistentes, dando al traste con algunas de las estrategias de control más extendidas.

Con el objetivo de dilucidar la estructura genética de las poblaciones de *P. fusca* y determinar la importancia de la reproducción sexual sobre la epidemiología de la enfermedad en España, en nuestro grupo de investigación estamos estudiando una serie de caracteres biológicos y moleculares que nos permitan realizar una caracterización detallada de las poblaciones de *P. fusca*. A tal efecto, se han seleccionado una serie de aislados obtenidos en prospecciones realizadas en distintas provincias de la mitad sur de España, tanto en invernaderos como en cultivos al aire libre. Entre los caracteres biológicos, se están analizando el tipo de compatibilidad sexual, la raza fisiológica y el rango de hospedador de los distintos aislados.

En los últimos años, se ha detectado la presencia de ambos tipos de compatibilidad sexual, si bien los resultados obtenidos hasta la fecha parecen indicar el incremento de la frecuencia de aislados pertenecientes al tipo MAT 1-1 en detrimento de los aislados de tipo MAT 1-2, siendo la campaña del 2002 el momento a partir del que se establece un claro desequilibrio en las proporciones observadas para cada uno de los tipos de compatibilidad descritos.

En lo referente a la raza fisiológica de los aislados, los resultados de los que disponemos ponen de manifiesto la presencia de aislados pertenecientes a las razas 1, 2, 4 y 5, siendo la raza 4 la más abundante, con independencia del hospedador y de la zona de aislamiento. Por el contrario, no hemos encontrado ningún aislado perteneciente a la raza 3 del patógeno. Para la determinación del rango de hospedador o patotipo estamos inoculando cultivares comerciales pertenecientes a 5 especies de cucurbitáceas diferentes: Cabello de Ángel (calabaza), Diamant (calabacín), Marketer (pepino), Rochet (melón) y Sugar Baby (sandía).

Al tratarse de un hongo biotrofo estricto de crecimiento exclusivo sobre material vegetal, el abordaje de la caracterización genética de las poblaciones de *P. fusca* se ha centrado en el empleo de métodos moleculares basados en técnicas de PCR. En concreto, estamos realizando ensayos de RAPD y rDNA-RFLP para obtener información sobre el grado de variación genética existente dentro y entre las poblaciones de oídio de las cucurbitáceas en España.

Diversificación genética durante la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas fluorescens*. Variación de fase y aumento de la competitividad

| D5

F. Martínez-Granero, J. Larenas, A. Navazo, R. Rivilla y M. Martín*

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid

Pseudomonas fluorescens F113 con capacidad biocontroladora de amplio espectro sufre variación de fase tras la colonización de la rizosfera de alfalfa. Estos variantes de fase se caracterizan por presentar una capacidad de movimiento mayor que la estirpe salvaje en condiciones de *swimming*. La aparición de los variantes de fase está claramente relacionada con la acción de dos recombinasas específicas de sitio: *sss* y *xerD*. Ambas recombinasas inducen su expresión cuando la bacteria se encuentra en contacto directo con la superficie de la raíz. Los mutantes afectados en ambas recombinasas independientemente, dan lugar a un número muy reducido de variantes de fase tanto en condiciones de cultivo prolongado en el tiempo, como tras la colonización de la rizosfera; si se compara con la estirpe silvestre. La sobreexpresión de cualquiera de estas dos recombinasas resulta en un incremento en la aparición de estos variantes. Por otro lado la sobreexpresión del gen *sss* suprime la mutación en *xerD*. Sin embargo, la sobreexpresión de *xerD* no suprime la mutación en *sss*. Parece ser que *xerD* tiene un papel marginal cuando *sss* se está expresando a alto nivel.

El análisis genético de los variantes fenotípicos obtenidos tras la sobreexpresión de las recombinasas tanto en cultivos prolongados como en la colonización de la rizosfera, muestra que estos variantes son mutantes en el sistema de dos componentes *gacA/gacS* que está implicado en la activación del metabolismo secundario de la bacteria. Por tanto las recombinasas específicas de sitio están implicadas en la aparición mutantes en el sistema *gacA/gacS* que son variantes de fase más móviles que la estirpe silvestre. Cuando se analiza la movilidad de los variantes de fase tanto en cultivos prolongados como tras la colonización de la rizosfera, se observa una presión selectiva por parte de la rizosfera de variantes mucho más móviles que además de tener mutado el sistema de dos componentes *gacA/S* presentan mutaciones adicionales. Estos variantes son mucho más competitivos, desplazando completamente a la estirpe silvestre en ensayos de competitividad.

Discusión General

Papel de los lipopéptidos en la capacidad de biocontrol de cepas de *Bacillus subtilis* contra *Podosphaera fusca*

| C1

D. Romero*, A. Pérez-García, F. M. Cazorla y A. de Vicente

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: diegor@uma.es

El oídio es una enfermedad de origen fúngico común en cultivos de cucurbitáceas tanto al aire libre como en invernadero que puede ser causada por dos especies, *Golovinomyces cichoracearum* o *Podosphaera fusca*, siendo éste último el único agente responsable de la enfermedad descrito en el sur de España. Las dos principales estrategias de control de la enfermedad, el empleo de cultivares resistentes y el uso intensivo de fungicidas, presentan limitaciones en su eficacia. En este escenario, el control biológico ha surgido como una interesante estrategia de control que puede paliar algunas de estas deficiencias contribuyendo a mejorar el control de la enfermedad. Puesto que *P. fusca* es un hongo biotrofo con desarrollo ectoparasítico, asumimos que éste podría ser eficazmente controlado por microorganismos productores de antibióticos. En nuestro laboratorio se han aislado 4 cepas de *Bacillus subtilis* que han demostrado capacidad de reducir el desarrollo de *P. fusca* en ensayos de biocontrol con células lavadas tanto *in vitro* como en plántula. Paralelamente la capacidad inhibitoria observada para los filtrados libres de células en ensayos de biocontrol *in vitro* contra *P. fusca* señalaba a la antibiosis como principal mecanismo de acción de estas cepas. Con el objetivo de corroborar esta, se planteó el llevar a cabo la identificación de los posibles compuestos antifúngicos producidos, así como el análisis de mutantes deficientes en su producción.

Para el análisis de las sustancias antifúngicas producidas se realizó una extracción con n-butanol, fraccionamiento de los compuestos mediante cromatografía FLASH y purificación mediante HPLC preparativa. El empleo de diferentes técnicas analíticas como TLC, HPLC, espectro de masas (MALDI-TOF), análisis de infrarrojos y el análisis de la composición y secuencia de aminoácidos nos permitieron confirmar que las 4 cepas producían surfactina, fengicina y bacilomicina o iturina, lipopéptidos producidos por diferentes cepas de *Bacillus* y con demostrada capacidad antifúngica. La actividad antioídio de cada lipopéptido fue evaluada *in vitro*, sobre discos de cotiledón de calabacín, midiendo el porcentaje de germinación de esporas de *P. fusca* y puso de manifiesto que la surfactina no reducía significativamente el porcentaje de germinación de esporas mientras que la fengicina y bacilomicina retenían la mayor capacidad inhibitoria entre un 55% y 63% respectivamente, aunque siempre inferior a la observada para el sobrenadante (88%). No obstante, para obtener un mayor conocimiento sobre la implicación de cada lipopéptido en la capacidad de biocontrol de estas cepas, se está llevando a cabo un abordaje molecular centrado en la generación de mutantes mediante mutagénesis dirigida, utilizando plásmidos de integración que portan una secuencia entre 300-2000 pb del gen diana y un marcador de resistencia para *Bacillus*. Sin embargo, las cepas estudiadas se mostraron recalcitrantes a la transformación por todas las técnicas descritas hasta el momento, lo que ha dificultado el avance de este estudio. Actualmente, hemos puesto a punto una técnica de transformación y los transformantes obtenidos están siendo analizados por TLC y HPLC para constatar la producción o no de lipopéptidos.

Control biológico de enfermedades bacterianas de filosfera de cucurbitáceas

H. Zeriuoh*, D. Romero, A. de Vicente y A. Pérez-García

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.
E-mail: aperez@uma.es*

El cultivo de las cucurbitáceas tiene gran importancia económica en España. Al igual que ocurre con la mayoría de las plantas cultivadas, estos cultivos están sometidos a diversas enfermedades que pueden causar importantes mermas en la producción. El control químico es, sin lugar a dudas, la principal herramienta de control utilizada para combatir estas enfermedades. No obstante, ante la creciente demanda de la sociedad para el desarrollo de una agricultura sostenible, el control biológico de estas enfermedades ha emergido como una estrategia alternativa aparentemente más respetuosa con el medio ambiente.

En nuestro laboratorio se seleccionaron una serie de cepas de *Bacillus subtilis* por su capacidad de producción de sustancias antifúngicas y de biocontrol del oídio de las cucurbitáceas. Con el objetivo último de introducir el uso de estas cepas como agentes de control biológico en programas de control integrado de enfermedades en cucurbitáceas, en este trabajo se pretende evaluar la capacidad de biocontrol de estas cepas frente a otros patógenos aéreos de origen bacteriano de filosfera de cucurbitáceas.

Para ello, estamos evaluando la capacidad de biocontrol de estas cepas de *B. subtilis* frente a las enfermedades causadas por aislados naturales o de colección de las bacterias patógenas *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* y *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, mediante un ensayo sobre hoja cortada de melón en el sistema de doble placa de Petri. Inicialmente fue necesario diseñar los correspondientes ensayos de patogenicidad y para ello, se determinaron las dosis mínima de inóculo (DI₉₀) que producían síntomas visibles en las hojas de melón. Para las tres especies ensayadas se ha estandarizado como dosis de inóculo 10⁵ ufc.

Para determinar la actividad antibacteriana de estas cepas e identificar las sustancias que producen, se están analizando filtrados libres de células mediante ensayos de inhibición del crecimiento de *X. campestris* pv. *cucurbitae*. La actividad antibacteriana de los filtrados se caracteriza por su resistencia a altas temperaturas, pH extremos y degradación proteolítica. Además, dicha actividad se mantiene tanto en las fracciones de un tamaño molecular >3 kDa como en las inferiores. Actualmente se están realizando extracciones con diferentes compuestos orgánicos para establecer la naturaleza química de la sustancia o sustancias con actividad antibacteriana.

Recientemente se ha descrito que algunas bacterias del género *Bacillus* pueden interferir sobre la expresión de factores de virulencia de bacterias patógenas gram-negativas mediante la producción de lactonasa (*aiiA*), enzima que degrada N-acyl homoserina lactona (AHL), la molécula señal del sistema de regulación denominado "Quorum sensing". Por tanto, hemos creído oportuno comprobar si nuestras cepas de *B. subtilis* producen o no lactonasa. Para ello, se ha evaluado la actividad lactonasa mediante ensayos de degradación de AHL en placas multipocillos, no observándose dicha actividad. Para comprobar la ausencia del gen *aiiA* se realizarán ensayos de PCR y de Southern blot.

Evaluación de un procedimiento para el control biológico de podredumbres fúngicas y de bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias en fruta y hortalizas frescas

E. Badosa^{1*}, R. Trias¹, D. Parés¹, M. Pla¹, L. Bañeras² y E. Montesinos¹

¹*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CerTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: esther.badosa@udg.es*

²*Instituto de Ecología Acuática. Universitat de Girona. Campus Montilivi, 1707 Girona*

En los últimos años se ha detectado en diversos países un incremento de la incidencia de toxiinfecciones alimentarias debidas al consumo de productos vegetales frescos contaminados por bacterias patógenas. Estas toxiinfecciones causadas principalmente por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* pueden ser consecuencia de contaminaciones debidas a ciertas prácticas agrícolas, así como a una manipulación o procesado inadecuado de las frutas y hortalizas frescas. El objetivo del presente trabajo es evaluar la viabilidad de un sistema de bioprotección de la fruta y hortalizas procesadas para el consumo en fresco basado en la aplicación mediante tratamiento preventivo con cepas de diversas especies bacterianas que forman parte de la microbiota de las plantas. En primer lugar, se han optimizado los protocolos para el uso de la PCR convencional y a tiempo real acopladas a enriquecimientos de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en distintos productos vegetales (uva, manzana, tomate, soja germinada y canónigos). En segundo lugar, se ha realizado un estudio prospectivo de la calidad microbiológica en frutas y hortalizas frescas (envasadas, no envasadas, productos de cuarta gama) de distintas procedencias, mediante recuento de aerobios mesófilos, hongos y levaduras y coliformes totales. Utilizando los protocolos de detección por PCR puestos a punto en este trabajo, se analizó la presencia de *Salmonella* spp por PCR convencional y de RTi-PCR para *Listeria* spp.

Paralelamente, se han aislado y seleccionado bacterias del ácido láctico para estudiar la posibilidad de su uso como agentes bioprotectores en frutas y productos vegetales frescos. La capacidad antagonista de los aislados se ha determinado *in vitro* frente a distintas bacterias patógenas como son *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*.

Mecanismos de acción de *Pantoea agglomerans* EPS125 en el control biológico de la podredumbre azul y el fuego bacteriano en frutales

M. C. Moreno^{1*}, E. Badosa¹, P. Rodríguez-Palenzuela², E. López-Solanilla² y E. Montesinos¹

¹*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Campus Montiliv i s/n, 17071 Girona.*

²*Departamento de Biotecnología, Unidad de Bioquímica, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid.*

El agente de biocontrol *Pantoea agglomerans* EPS125 fue seleccionado por su elevada eficacia en la inhibición de la infección causada por *Penicillium expansum* en pera. Para comprobar el espectro de acción de este agente se llevaron a cabo diferentes bioensayos mostrando ser muy eficaz frente a diversos patógenos de origen fúngico responsables de elevadas pérdidas económicas en poscosecha como son *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia laxa*, y sobre diferentes frutos como manzanas, peras, nectarinas, cerezas, fresas y melocotones. Además, *P. agglomerans* EPS125 ha mostrado capacidad inhibitoria en ensayos *in vitro* contra *Erwinia amylovora*, agente causal del fuego bacteriano. En diversos estudios preliminares sobre los posibles mecanismos de biocontrol de *P. agglomerans* EPS125 en el control de la podredumbre azul se observó que el contacto directo entre los dos microorganismos era una condición imprescindible para que el agente biocontrolador pudiera inhibir la germinación de las esporas y el posterior proceso de infección por parte del patógeno. Para demostrar cuál o cuáles son los mecanismos de biocontrol utilizados por *P. agglomerans* EPS125 se procedió a la realización de mutagénesis con el minitransposón GUS, obteniéndose así una colección de 4032 mutantes no auxotróficos donde cada uno de los mutantes contenía el minitransposón insertado en su DNA genómico de manera aleatoria. A continuación se realizó un primer cribado para seleccionar aquellos mutantes defectivos en la capacidad inhibitoria en alguno de los 2 patosistemas analizados, en bioensayos de inhibición de la infección provocada por el hongo *P. expansum* en manzana y en ensayos de inhibición *in vitro* contra *E. amylovora*. Para corroborar la consistencia de los fenotipos de los mutantes que mostraron ser defectivos en la primera selección, se realizaron 2 cribados más. De esta manera, fueron seleccionados 58 mutantes de los cuáles 8 eran defectivos en la capacidad inhibitoria de la infección causada por *P. expansum* en manzana, 7 eran defectivos en la capacidad de inhibición *in vitro* contra *E. amylovora* y 43 eran defectivos en ambos ensayos. A continuación se procedió al estudio de los fenotipos de 8 mutantes en comparación con la cepa silvestre en ensayos de supervivencia en manzana, crecimiento en cultivo líquido y estudios de interacción entre los mutantes y *P. expansum* tanto *in vitro* como en bioensayos en manzana mediante microscopía electrónica de rastreo. Finalmente, se realizó un análisis genético de 4 mutantes mediante la secuenciación de las zonas flanqueantes al punto de inserción del minitransposón, con la finalidad de conocer cuáles son los genes responsables de la capacidad biocontroladora de *P. agglomerans* EPS125 que habían sido afectados.

Desarrollo de un método de trazabilidad del agente de control biológico del fuego bacteriano *Pseudomonas fluorescens* EPS62e mediante PCR en tiempo real

C5

M. Pujol*, E. Badosa, C. Manceau y E. Montesinos

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CerTA-CIDSAV. Universitat de Girona.
Campus Montilivi 17071. Girona. E-mail: marta.pujol@udg.es*

Pseudomonas fluorescens EPS62e fue seleccionada por su capacidad de controlar infecciones causadas por *Erwinia amylovora* tanto en flores como en frutos inmaduros y plantas jóvenes de peral. Se ha puesto a punto una técnica molecular que permite su análisis cuantitativo y trazabilidad. En una primera etapa se buscaron marcadores moleculares mediante RAPD que permitieron diferenciar la cepa EPS62e de cepas de la misma especie y de otras fitobacterias. Se seleccionaron dos fragmentos de amplificación RAPD específicos de EPS62e, que fueron secuenciados en su totalidad estudiándose sus posibles homologías con otras secuencias de la base de datos del GenBank. Al no encontrar homologías, se llevó a cabo la segunda etapa basada en el diseño de dos parejas de cebadores SCAR con el fin de disponer de una técnica de PCR clásica de detección e identificación de la cepa. La especificidad de las dos parejas de cebadores SCAR diseñados fue confirmada frente a 162 cepas de *P. fluorescens* y 71 cepas de otras especies relacionadas. La tercera etapa consistió en el diseño de una PCR en tiempo real dentro de cada fragmento de amplificación SCAR. Los productos de amplificación fueron reducidos al tamaño óptimo y se diseñó una sonda de tipo TaqMan[®] para cada fragmento. La especificidad de los dos diseños de PCR en tiempo real se evaluó frente a 68 cepas de la misma especie y 30 cepas de otras especies. Finalmente, se realizó la validación de la técnica frente a la técnica de trazabilidad microbiológica basada en el recuento de viables en placa. El ensayo se llevó a cabo en parcelas de manzanos Golden en floración pulverizados con un mutante espontáneo de la cepa EPS62e resistente al ácido nalidíxico. Periódicamente se recogieron muestras que fueron analizadas mediante ambas técnicas. No se observaron diferencias significativas entre los niveles poblacionales estimados mediante PCR en tiempo real y mediante recuento de viables en placa. Asimismo, la cepa EPS62e colonizó satisfactoriamente las flores y posteriormente los frutos de manzano llegando a unos niveles poblacionales de hasta 10^8 ufc/corimbo, 55 días después de su aplicación.

Estudio de la expresión de proteínas PR en peral y tomate inducidas por la aplicación de productos fitosanitarios y bacterias fitopatógenas

L. Ruz*, C. Moragrega y E. Montesinos

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona.
Campus Montilivi 17071. Girona. E-mail: lidia.ruz@pas.udg.es*

Se ha estudiado el efecto de diversos productos en la expresión de determinadas proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRs) en peral y en tomate. Los productos consistieron en compuestos comerciales (Bion y Ethrel) y no comerciales (péptidos de bajo peso molecular) con un determinado efecto biológico en el control de enfermedades o en el incremento del desarrollo de la planta. En peral se observó la expresión de un quitinasa 5 días después de la aplicación de Bion, y de una glucanasa 5 días después de aplicación de Ethrel, mientras que otras proteínas PR estudiadas no se expresaron en respuesta al tratamiento. Ambos productos presentaron un efecto moderado en control del fuego bacteriano en ensayos previos. En tomate, se observó la expresión de una glucanasa y de una quitinasa 24 horas después de la aplicación de un producto a base de péptidos de bajo peso molecular. Este producto había mostrado en ensayos anteriores un efecto en el incremento del desarrollo de plantas de tomate. También se ha estudiado el efecto de determinadas bacterias, fitopatógenas (*Erwinia amylovora* EPS101 cepa virulenta y cepa mutante avirulenta PMV6076) y no fitopatógenas (*Pseudomonas fluorescens* EPS62e descrita como agente de biocontrol del fuego bacteriano) en la expresión de determinadas PRs en peral y en manzano.

Evaluación de bacterias de suelo y rizosfera como agentes de biocontrol de la podredumbre blanca radicular en aguacate

| C7

M. A. González-Sánchez^{1*}, T. Zea-Bonilla¹, P. M. Martín-Sánchez¹, F. M. Cazorla², C. Ramos³, A. de Vicente² y R. M. Pérez-Jiménez¹

¹IFAPA-CIFA. Cortijo de la Cruz s/n, 29140, Churriana, Málaga. Correo electrónico: patología@olinet.es.

²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071-Málaga. ³Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071-Málaga

El ascomycete *Rosellinia necatrix* Prill. es el agente causal de la podredumbre blanca radicular en numerosas especies vegetales, especialmente frutales. La amplia distribución que presenta este patógeno en plantaciones comerciales de aguacate en Andalucía hace que esta enfermedad sea un factor limitante del cultivo. El control biológico de la enfermedad mediante el uso de portainjertos tolerantes a *R. necatrix* junto a la incorporación de microorganismos de suelo como agentes de biocontrol se presenta como sistema alternativo o complementario a los actuales métodos de lucha: solarización del suelo, aplicación de fungicidas y distintas prácticas culturales.

El objetivo del estudio que estamos realizando es seleccionar bacterias de suelo y/o de rizosfera de aguacate que puedan ser utilizadas como agentes de biocontrol de *R. necatrix*. Para iniciar este trabajo se han visitado fincas comerciales de la zona donde se recogieron muestras de suelo y raíz de distintos árboles de aguacate. De estas muestras se realizó el aislamiento de bacterias cultivables, diferenciando entre muestras de suelo y de raíz, y se generó una colección de bacterias con más de 300 aislados. La evaluación de la capacidad de biocontrol de las bacterias de esta colección se está realizando con un modelo experimental *Rosellinia*/aguacate; en este modelo se utilizan plántulas de aguacate de tres meses de edad obtenidas mediante la germinación de embriones *in vitro*. La aplicación de la bacteria se realiza mediante inmersión de raíces en una suspensión bacteriana y, seguidamente, las plantas se transplantan a macetas con vermiculita donde se realiza la inoculación con el patógeno incorporando granos de trigo colonizados por el hongo. Con este modelo, y utilizando un número bajo de repeticiones, se está estudiando toda la colección para identificar aislados con capacidad de biocontrol. De estos experimentos ya se han seleccionado varias cepas las cuales se seguirán evaluando en nuevos bioensayos, en este caso con plántulas clonales -obtenidas mediante técnicas de micropopagación o multiplicación vegetativa- con un mayor número de repeticiones y modificando factores bióticos como el potencial de inóculo.

Paralelamente, se está determinando el antagonismo *in vitro* de estos aislados bacterianos frente a aislados con distinto grado de virulencia de *R. necatrix* y también frente a *Phytophthora cinnamomi*, patógeno de gran importancia en plantaciones de aguacate a nivel mundial. Adicionalmente, se están estudiando características potencialmente implicadas en el biocontrol de los aislados preseleccionados como son la producción de sustancias antifúngicas; antibióticos, exoenzimas y otros compuestos tóxicos, la capacidad de colonización raíces de aguacate y la promoción de crecimiento de la planta. Por otro lado, se pretende realizar la identificación taxonómica de estos aislados mediante la secuenciación de ribosómico 16s y pruebas bioquímicas específicas.

Mecanismos bacterianos implicados en el control biológico de la podredumbre blanca del aguacate causada por *Rosellinia necatrix*

C. Pliego^{1,3*}, F. M. Cazorla², R. M. Pérez-Jiménez³ y C. Ramos¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: crr@uma.es

²Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071-Málaga

³IFAPA-CIFA-Málaga, Cortijo de la Cruz s/n, 29140-Churriana, Málaga

El uso de agentes de biocontrol se está incrementando en la actualidad debido a su importante contribución en el desarrollo de una agricultura sostenible y menos agresiva con el medio ambiente. Actualmente, se han comercializado alrededor de cincuenta productos utilizables en biocontrol (de entre los cuales once son bacterias) y se trabaja activamente en el desarrollo de nuevas formulaciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos los mecanismos implicados en el antagonismo entre el agente de biocontrol y el patógeno no se conocen en profundidad. Hasta la fecha, los estudios dirigidos a la identificación de genes bacterianos implicados en colonización de la rizosfera de plantas se han basado en el análisis de mutantes obtenidos mediante transposición, o bien, en la identificación de promotores inducibles *in vivo* utilizando tecnología IVET (*in vivo expression technology*). En este proyecto proponemos el abordaje de este objetivo utilizando STM (*signature tagged mutagenesis*) que combina la fuerza del análisis mutacional con la habilidad de seguir simultáneamente el comportamiento de un gran número de mutantes. Como material de partida, hemos utilizado una colección de diez cepas bacterianas seleccionadas por su capacidad de colonizar la rizosfera de aguacate y su poder antagonista *in vitro* frente a *R. necatrix*, principal amenaza para las plantaciones comerciales de la costa sur de España. Las cepas seleccionadas se clasificaron en función de las siguientes características: perfil de resistencia natural a antibióticos, test API 20NE, secuenciación del ADN16S, movilidad (*swimming*, *swarming*, *twitching*), producción de homoserinas lactonas (AHLs) responsables de la regulación por *quorum sensing* y producción de actividades antagonistas (sideróforos, antibióticos, HCN y enzimas hidrolíticas). Todos los aislados analizados mostraron al menos dos tipos de movilidad y, tres de ellos, producen AHLs detectables mediante inducción del promotor del operón *lux* de *Vibrio fischeri*. De entre las actividades antagonistas probadas, todas las cepas mostraron al menos una de las siguientes: lipasas, quitinasas, celulasas, β -glucanasa, compuestos volátiles, antibióticos y/o sideróforos. De entre las cepas caracterizadas, se seleccionaron tres aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* que aceptan mini-*tn5* etiquetados, base de la técnica STM, a frecuencias de aproximadamente 10^{-5} - 10^{-6} transconjugantes/receptor.

Ensayos de biocontrol frente a *R. necatrix* llevados a cabo bajo condiciones de invernadero, muestran que al menos uno de los aislados induce retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad. Paralelamente, ensayos de persistencia realizados en plantas de aguacate de 3 ó 24 meses de edad han demostrado la capacidad de estos aislados de establecerse y sobrevivir en la rizosfera de aguacate hasta al menos 6 semanas después de la inoculación, alcanzándose densidades celulares que fluctúan entre 10^{-5} y 10^{-6} UFC/g de raíz. En la actualidad, y con el objetivo de identificar la cepa/s más adecuada para la utilización del abordaje STM, estamos llevando a cabo un análisis de detección mediante hibridación *Southern* de las etiquetas STM en cada una de las tres cepas.

Análisis del papel en biocontrol de la producción del antibiótico 2-hexil, 5-propil resorcinol por *Pseudomonas fluorescens* PCL1606

C9

D. J. Ruiz-Romero*, A. de Vicente y F. M. Cazorla

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.
E-mail: fitomicro@uma.es*

La cepa *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 (*Pf* PCL1606) ha sido aislada desde rizosfera de aguacate y seleccionada por su elevada capacidad antagonista frente a numerosos hongos fitopatógenos de suelo. Además, mediante ensayos de biocontrol en cámaras de cultivo, se ha comprobado que *Pf* PCL1606 protege a plantas de aguacate y tomate frente al ataque por los hongos fitopatógenos *Rosellinia necatrix* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, respectivamente. El análisis de las sustancias antifúngicas producidas por *Pf* PCL1606 sólo pone de manifiesto la producción del antibiótico 2-hexil 5-propil resorcinol (HPR).

Con el fin de conocer el papel de la producción del antibiótico HPR en la actividad de biocontrol, se ha construido una colección de mutantes *Tn5* empleando el plásmido pRL1063a. De una colección de aproximadamente 5000 mutantes, 6 han mostrado una reducción importante de la capacidad antifúngica en ensayos en placa. El análisis de las secuencias flanqueantes del gen interrumpido en los distintos mutantes parecen indicar la implicación de genes con homología para aciltransferasas, metiltransferasas de los sistemas T de rotura de glicina, así como del sistema regulador global Gac, entre otros.

La caracterización fenotípica de estos mutantes mostraron que los mismos no estaban afectados en sus propiedades de crecimiento en medio mínimo, persistencia en la raíz, etc. De forma paralela, se han localizado secuencias homólogas a los genes interrumpidos en una genoteca de la cepa *Pf* PCL1606, con objeto de realizar experimentos de complementación y comprobación de la restauración de la actividad antifúngica.

Finalmente, el efecto sobre la capacidad de biocontrol de las mutaciones en la producción del antibiótico HPR, resultó en una reducción de la capacidad de protección frente al ataque de hongos fitopatógenos de suelo usando los dos modelos experimentales tomate/*Fusarium* y aguacate/*Rosellinia*, aunque sin perder totalmente dicho efecto protector, lo que sugiere que la cepa *Pf* PCL1606 posee más de un mecanismo implicado en el control biológico.

Efecto de rizobacterias en la promoción del crecimiento y en el control biológico de patógenos de *Fragaria* sp. y *Prunus* sp.

L. Agustí*, A. Bonaterra, C. Moragrega y E. Montesinos

*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona,
Campus Montilivi, 17071 Girona*

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) son bacterias del suelo que colonizan la rizosfera y las raíces y estimulan su crecimiento mediante determinados mecanismos. Muchas PGPRs promueven el crecimiento de las plantas indirectamente, controlando los microorganismos perjudiciales o patógenos. Se han descrito diversas bacterias (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) con capacidad de colonizar las raíces de las plantas, promover su crecimiento y controlar patógenos.

En el presente trabajo se seleccionaron 58 cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pantoea agglomerans* que eran promotoras del crecimiento de rosáceas, antagonistas frente a diferentes patógenos o con capacidad de producir metabolitos relacionados con la promoción del crecimiento y el control biológico. Estas cepas se ensayaron en dos sistemas huésped-patógeno consistentes en el sistema *Fragaria* sp.-*Phytophthora cactorum* y el sistema *Prunus* sp.-*Meloidogyne javanica*.

Se seleccionaron las 10 cepas más efectivas en el control de *Phytophthora cactorum* *ex vivo* en hojas de fresa (*Fragaria x ananassa*) de las variedades Camarosa y Diamante. Posteriormente se evaluó la capacidad promotora del crecimiento y el control biológico de *P. cactorum* de estas 10 cepas en plantas de fresa de la variedad Diamante. Aunque en general no se obtuvieron efectos significativos en la promoción del crecimiento, algunas cepas sí redujeron significativamente la severidad de la enfermedad.

La capacidad promotora del crecimiento de las 58 cepas bacterianas seleccionadas se evaluó en portainjertos GF677 de *Prunus* sp. con y sin infección por el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*. Varias cepas produjeron una reducción significativa de las infecciones por nematodos. Otras mostraron una actividad promotora del crecimiento significativa, mientras que en algunos casos se observaron cepas que tuvieron efectos indeseados ya que estimularon significativamente las infecciones.

Adherencia de *Penicillium oxalicum* a las raíces del tomate

| C11

P. Sabuquillo*, A. Sztejnberg, A. De Cal y P. Melgarejo

Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA. Carretera de La Coruña km 7, 28040-Madrid. E-mail: mpsc@inia.es

Penicillium oxalicum (PO) es un agente de biocontrol que induce resistencia frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y/o *Verticillium dahliae*, causantes de la marchitez vascular del tomate. PO regenera y/o prolonga la actividad del cambium mediante la formación de nuevos vasos del xilema y disminuyendo la colonización de los vasos por el patógeno en las plantas de tomate tratadas. La reducción de la marchitez se obtiene aplicando conidias de PO en forma de riego a plántulas de tomate en semillero 7 días antes del trasplante. La producción en masa de conidias de *P. oxalicum* se realiza en fermentación sólida. Las conidias son posteriormente sometidas a un proceso de eliminación de agua mediante secado en lecho fluido, obteniéndose un polvo muy hidrofóbico.

La adherencia de las conidias a las raíces de las plantas de tomate depende de la hidrofobicidad de dichas raíces y de la hidrofobicidad de la pared celular de las conidias, aunque también el medio y las condiciones de crecimiento influyen en la adhesión. Las conidias secas de PO que han sido expuestas a aire caliente presentan un considerable incremento en la hidrofobicidad de las mismas.

Para intentar mejorar el biocontrol de PO sobre la marchitez del tomate se debe estudiar el proceso de interacción del mismo con la raíz de la planta. Para ello se estudió el comportamiento de adhesión de las conidias de PO secas (control) a la raíz en agua comparándolo con un producto comercial específico para la mejora de la adherencia, Nu-film 17. Se observó que, en menos de 30 minutos, sólo un 35% de las conidias secas de PO se adherían a las raíces de tomate, frente a más del 50% en el caso del Nu-film 17. Con el objetivo de mejorar la adherencia de las conidias secas de PO a las raíces de tomate se han aplicado distintas dosis de aditivos de diferente naturaleza química (azúcares, detergentes, etc.) en los distintos pasos de producción de PO: fermentación y secado. Estos resultados serán objeto de discusión.

Discusión General

Fluorescencia de imagen aplicada al estudio de infecciones bacterianas de plantas

| P1

L. Rodríguez-Moreno^{1*}, M. Pineda², J. Soukupová³, A. Macho¹, C. R. Beuzón¹,
L. Nedbal³, C. Ramos¹ y M. Barón²

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: crr@uma.es

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18010-Granada

³Institute of Physical Biology, University of South Bohemia and Institute of Landscape Ecology, AVCR Zámek 136, 37333- Nové Hradky, República Checa

Los sistemas de captación de imágenes de fluorescencia roja emitida por la clorofila (FI) pueden mostrar cambios en distintos parámetros, que anteceden a la aparición de síntomas visuales en plantas infectadas por un agente patógeno. Esta técnica, permite analizar la eficiencia fotosintética de una hoja completa, así como los procesos disipativos no fotoquímicos, mostrando la heterogeneidad metabólica de hojas de plantas infectadas. Aunque la FI se ha utilizado en el análisis de infecciones víricas y fúngicas, su utilidad en el estudio de infecciones bacterianas no ha sido demostrada hasta la fecha y será el objetivo de este trabajo. Como modelo, se han utilizado plantas de olivo (*Olea europaea* L. var. Arbequina) cultivadas *in vitro* e inoculadas con *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), agente causal de la tuberculosis, y plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* var. Canadian Wonder) infectadas con *P. syringae* pv. *phaseolica* (Pph), causante de la grasa de la judía. Además, ambas plantas se inocularon con *P. syringae* pv. *tomato* (Pto), inductora de la reacción de hipersensibilidad (HR). Las medidas de FI y el seguimiento de la sintomatología se realizaron a distintos tiempos post-infección (dpi) durante 15 días. Entre los parámetros de fluorescencia analizados, el *quenching* no fotoquímico (NPQ), que mide la energía no utilizada en fotosíntesis, se reveló como aquél que mejor refleja las diferencias pre-sintomáticas entre los distintos tipos de infección y entre plantas infectadas y no infectadas. El seguimiento de NPQ se llevó a cabo en la cinética de inducción de la fluorescencia de la clorofila, utilizando el protocolo de análisis de coeficientes de *quenching*, obteniéndose a su vez las correspondientes imágenes en puntos de interés de la cinética. En el caso de las plantas de judía infectadas con Pph, las diferencias en NPQ más significativas con respecto a las otras inoculaciones aparecieron a 9 dpi, este momento antecede a la aparición de células viables en la hoja vecina a la inoculada a pesar de la ausencia de síntomas en la misma. En olivo cultivado *in vitro* e inoculado con Pss, fue posible relacionar los cambios en NPQ a lo largo del tallo con la zona de aparición de la hiperplasia característica de esta enfermedad, antes de que ésta se produzca. Estos resultados abren las puertas a la utilización de la FI para la detección pre-sintomática de ambas enfermedades vegetales, así como para el análisis cuantitativo de la virulencia de agentes bacterianos durante el proceso de infección de sus plantas huéspedes.

Caracterización del sistema polifenol oxidasa de la bacteria patógena de plantas *Ralstonia solanacearum* y su posible papel fisiológico

D. Hernández-Romero^{1*}, F. Solano-Muñoz² y A. Sánchez-Amat¹

¹Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. 30100 Espinardo. Murcia

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. 30100 Espinardo. Murcia

Las polifenol oxidasas (PPO) son enzimas ampliamente distribuidas en toda la escala filogenética desde bacterias hasta el hombre. Estas enzimas son cobre proteínas que oxidan fenoles utilizando el O₂ y de ellas existen dos tipos: lacasas y tirosinasas que se diferencian, entre otras características, en el rango de sustratos que son capaces de oxidar. Las lacasas oxidan preferentemente *p*-difenoles, mientras que las tirosinasas muestran tanto actividad cresolasa o monofenol monooxigenasa como catecol oxidasa oxidando *o*-difenoles.

Se han descrito pocos ejemplos de PPO bacterianas, entre las que se encuentran las tirosinasas y lacasas de *Streptomyces*, *Sinorhizobium meliloti* y *M. mediterranea*. La secuenciación del genoma de diversos microorganismos ha revelado que la distribución de las PPO está restringida a unos pocos géneros bacterianos, entre los que se encuentran microorganismos que interaccionan con plantas como el patógeno *Ralstonia solanacearum*.

Para poder comprobar si esos genes eran realmente expresados, ensayamos las actividades lacasa, cresolasa y catecol oxidasa en extractos de *R. solanacearum* optimizando las condiciones de medida para cada sustrato seleccionado en parámetros como pH y concentración de SDS. Los resultados obtenidos permitieron detectar la expresión de todas estas actividades.

Mediante la generación de mutantes nulos para los genes que de acuerdo a la secuencia genómica disponible podrían codificar actividades PPO y la evaluación de los cambios generados en las actividades de estos mutantes respecto a la cepa silvestre, se ha demostrado la expresión de tres PPOs diferentes y se ha establecido una correlación clara entre las actividades enzimáticas medidas y los genes que codifican las enzimas responsables de las mismas.

Se ha determinado que la proteína codificada por el locus RSp1530 es una cobre-proteína azul con actividad lacasa. Los genes RSc0337 y RSc1501, codifican proteínas con alta homología con tirosinasas. RSc0337 muestra una alta actividad tirosina hidroxilasa y está involucrada en la síntesis de melaninas en *R. solanacearum*. La enzima codificada por el locus Rsc1501, muestra mayor actividad sobre *o*-difenoles.

La elevada sensibilidad que los mutantes obtenidos muestran frente a varios fenoles ensayados indica que las PPO expresadas en *R. solanacearum* podrían participar en la resistencia a compuestos fenólicos, lo que podría estar relacionado con la patogenicidad de la bacteria, evitando la resistencia de las plantas hospedadoras mediada por compuestos fenólicos.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BIO2004-4803 del MEC.

Estudio de genes implicados en la producción de mangotoxina en *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y su papel en la virulencia

M. A Vázquez*, E. Arrebola, A. de Vicente y F. M. Cazorla

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: cazorla@uma.es

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (*P.s.s.*) es una especie bacteriana presente en la microbiota epifita de un gran número de especies vegetales. Se comporta como patógeno cuando el huésped está sometido a algún tipo de estrés, ocasionando síntomas necróticos y/o cloróticos. Producen distintos factores de virulencia, entre los que destacan las fitotoxinas por ser las causantes de la mayor parte de los síntomas.

Un gran número de las cepas de *P.s.s.* aisladas de árboles de mango, donde causan la necrosis apical del mango, producen mangotoxina, toxina antimetabolito que actúa sobre la ruta de biosíntesis de ornitina y arginina, inhibiendo a la enzima ornitina acetiltransferasa (OAT).

En este trabajo se han identificado y caracterizado algunos de los genes implicados en la producción de mangotoxina de la cepa *P.s.s.* UMAF0158. Para ello se obtuvieron mutantes defectivos en la producción de dicha toxina (Tox⁻) por inserción del transposón miniTn5Km2. Los genes interrumpidos se localizaron en nueve mutantes Tox⁻. A partir de una genoteca de la cepa *P.s.s.* UMAF0158, se seleccionaron clones genómicos correspondientes a las regiones interrumpidas en los mutantes defectivos, con los que, mediante ensayos de complementación con sus correspondientes mutantes, se pudo restablecer la producción de mangotoxina, confirmando la importancia de los genes interrumpidos en la biosíntesis de la toxina.

Se ha secuenciado uno de los clones genómicos (pCG2-6) que complementa la mutación de *P.s.s.* UMAF0158-6γF6, donde la inserción transposón miniTn5Km2 interrumpe un gen con homología para una peptidosintetasa no ribosomal (NRPS). Se ha realizado un estudio detallado del fragmento de DNA cromosómico de 10,5 Kb que porta el plásmido pCG2-6, identificando los ORFs, las secuencias promotoras y de unión de ribosomas. Cabe destacar la presencia de ORFs con homología elevada a una NRPS, a un regulador transcripcional perteneciente a la familia de reguladores Gnt y a una oxidorreductasa. También se han encontrado secuencias correspondientes a tres posibles promotores, dos de ellos delimitando a un operón, que contiene al citado ORF homólogo a la NRPS. El análisis de las secuencias de unión de ribosomas sugiere una posible traducción acoplada de varios de estos ORFs.

Por otro lado, se ha establecido el papel de la mangotoxina en la virulencia de *P.s.s.* tras la inoculación de folíolos de tomate. Los mutantes defectivos muestran una disminución en el nivel de los síntomas necróticos inducidos. Al complementar los mutantes con sus respectivos clones genómicos se restaura la virulencia, alcanzando niveles de necrosis similares a los ocasionados por la cepa silvestre, revelando la importancia de la producción de mangotoxina para la virulencia de estas cepas de *P.s.s.*

La región de biosíntesis de faseolotoxina está conservada en *P. syringae* pvs. phaseolicola y actinidiae, pero no en *P. syringae* pv. syringae

L. Navarro^{1*}, K. López-López², N. Mateo¹, S. Aguilera-Aguirre², A. Álvarez-Morales² y J. Murillo¹

¹Lab. Patología Vegetal, ETSI Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; ²Depto. Ingeniería Genética, CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato, Méjico.

Diversos patovares de *Pseudomonas syringae* producen toxinas extracelulares que pueden incrementar la virulencia del patógeno *in planta* o aumentar su capacidad de competir con otros microorganismos. La faseolotoxina es un tripéptido que bloquea la conversión de ornitina a citrulina mediante la inhibición irreversible de la ornitina transcarbamilasa (OCTasa). El patógeno se defiende de su propia toxina sintetizando una OCTasa adicional resistente a la faseolotoxina, que está codificada por el gen *argK*. La secuencia de *argK* es idéntica en cepas de *P. syringae* pv. phaseolicola y *P. syringae* pv. actinidiae, a pesar de la distancia filogenética que separa estos dos patovares, lo que sugiere que el gen *argK* podría haberse adquirido recientemente mediante transferencia horizontal. La capacidad de producir faseolotoxina también se ha descrito en una única cepa de *P. syringae* pv. syringae, la cepa CFBP3388, que no ha sido caracterizada molecularmente. Nosotros hemos abordado el estudio de los genes de biosíntesis de faseolotoxina (cluster *argK-tox*) para evaluar si están igualmente conservados en *P. syringae* e investigar los posibles mecanismos de dispersión de estos genes. Mediante hibridación Southern con los cósmidos p12G7 y p1516A6, que abarcan el cluster *argK-tox* y DNA adyacente, hemos identificado una región de DNA de aprox. 37 kb que está presente en cepas productoras de faseolotoxina (Tox+) de pv. phaseolicola y en *P. syringae* pv. actinidiae NCPPB3871, pero no en cepas de *P. syringae* pv. phaseolicola no productoras de la toxina. La conservación de esta región es muy alta en ambos patovares, ya que el correspondiente patrón de hibridación fue idéntico en todas las cepas Tox+ y porque todas ellas dieron lugar a idénticos productos de amplificación utilizando cebadores específicos de ORFs adyacentes en el cluster *argK-tox*. Sin embargo, el cluster *argK-tox* no parece estar conservado en *P. syringae* pv. syringae CFBP3388, ya que el DNA genómico de esta cepa mostró una hibridación débil con los dos cósmidos anteriores y un patrón de hibridación distinto al de otras cepas Tox+. Igualmente, no se obtuvieron productos de amplificación por PCR con 9 parejas de cebadores, de 12 ensayadas, específicas de ORFs internas y adyacentes en el cluster *argK-tox* o con diversos cebadores específicos de *argK* o de una desaturasa de ácidos grasos. La secuencia de un fragmento de 2403 nt, que contiene parcialmente el gen *amtA*, fue idéntica en dos cepas del pv. phaseolicola y en pv. actinidiae NCPPB3871, y mostró un 83% de identidad con la secuencia correspondiente de CFBP3388 (2439 nt). En conjunto, nuestros datos sugieren que el cluster *argK-tox* fue adquirido tempranamente durante la evolución de *P. syringae*, aunque recientemente se ha transferido horizontalmente entre cepas de los patovares phaseolicola y actinidiae.

Factores de virulencia en *Erwinia amylovora*: papel del plásmido ubicuo pEA29

| P5

P. Llop^{1*}, J. Cabrefiga², E. Montesinos² y M. M. López¹

¹Laboratorio de Bacteriología. IVIA. 46113, Moncada; ²Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona, 17071 Girona.

Se acepta generalmente que todas las cepas patógenas de *E. amylovora*, bacteria causante del fuego bacteriano de las rosáceas, poseen un plásmido de 29kb, al encontrarse en todos los aislados obtenidos en la naturaleza. Por ello se generó un gran número de estudios para establecer su papel en la patogénesis y la virulencia de esta bacteria. Estos estudios se abordaron mediante la eliminación del plásmido en algunas cepas y observación de los efectos que su ausencia producía, en comparación con las mismas cepas que lo conservaban. Se observó que la ausencia del plásmido provocaba un retraso en la aparición de los síntomas, y una disminución de su intensidad. El efecto fisiológico más llamativo fue el retraso en la velocidad del crecimiento en medio mínimo en ausencia de tiamina y un menor crecimiento. Otros trabajos se centraron en la secuenciación del plásmido y el análisis de los genes que contenía. Se observó que no poseía genes de transferencia o conjugación, ni se identificaron genes de patogenicidad o virulencia. Sin embargo, sí se observaron genes que intervienen en la síntesis de la tiamina, lo que explica el comportamiento auxotrófico de las cepas sin el plásmido en medio mínimo, y esto parece dar una ventaja selectiva a la presencia del pEA29.

Con los datos actuales, sin embargo, sigue sin conocerse el papel exacto del plásmido en el desarrollo de la enfermedad, y la forma de actuación de los genes involucrados en la virulencia. El aislamiento reciente en España de cepas naturales patógenas a partir de plantas con síntomas, que no poseen el plásmido pEA29, abre nuevas vías de estudio del papel del plásmido, además de provocar nuevos interrogantes sobre los factores que intervienen en la virulencia y el desarrollo de la enfermedad.

Se están llevando a cabo estudios de comparación de patogenicidad y virulencia entre cepas naturales sin el plásmido pEA29, procedentes de España y Serbia-Montenegro, aisladas de *Crataegus*, *Pyracantha*, peral y manzano, y las mismas cepas a las que se les ha introducido el plásmido pEA29. Se compararán diversos parámetros (dosis infectiva mínima, velocidad de aparición de síntomas, virulencia) con los que se pretende describir con mayor claridad el/los efectos que el plásmido proporciona.

Una segunda parte del trabajo se realizará mediante el empleo de la tecnología de microarrays, e incluirá estudios sobre el efecto de genes cromosómicos de *E. amylovora* en la patogenicidad y virulencia, a través del estudio de la relación entre la reacción de hipersensibilidad (HR) y la virulencia en distintas cepas modelo. A partir de las secuencias del genoma de *E. amylovora* en fase de secuenciación y de los genes relacionados con la formación de HR y de los síntomas en material vegetal procedentes de bancos de datos, se diseñarán diversas sondas que se emplearán en un microarray, que se usará en el análisis de identificación de los genes que se expresan durante la elicitación de HR y la aparición de síntomas en material vegetal, mediante la comparación de cepas naturales que poseen comportamientos diferentes en su producción de HR y virulencia.

Resistencia de *Erwinia chrysanthemi* a los mecanismos de defensa de la planta

A. Llama-Palacios*, E. López-Solanilla, A. Maggiorani, M. Antúñez-Lamas y P. Rodríguez-Palenzuela

*Dpto. de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
Universidad Politécnica de Madrid*

La mayoría de las bacterias fitopatógenas colonizan el apoplasto de la planta. Este nicho es ácido (pH 4.5-6.5), pobre en nutrientes y posee diversas sustancias antimicrobianas. *Erwinia chrysanthemi* es un agente causal de podredumbres blandas en diversas especies vegetales. Su comportamiento patogénico está caracterizado por una rápida necrosis de los tejidos parenquimáticos, debido a la secreción de enzimas pectolíticas. Se sabe que este proceso conduce a la muerte de la célula vegetal, a la liberación de los contenidos celulares al apoplasto vegetal y a la alcalinización del apoplasto. Esto favorece el crecimiento bacteriano y la actividad de las enzimas pectolíticas, abriendo un proceso que eventualmente produce la maceración de áreas mayores.

Las bacterias fitopatógenas tienen que adaptarse a las condiciones particulares que se encuentran en el apoplasto durante los primeros estadios de la infección, y en este sentido, en *E. chrysanthemi* se han descrito varios mecanismos implicados en esta adaptación y se ha puesto de manifiesto su implicación en la virulencia de dicha bacteria. Este es el caso de la resistencia a péptidos antimicrobianos, estrés oxidativo o pH ácido (1,2,3,4).

Con la secuenciación del genoma completo de esta bacteria (www.tigr.org), han surgido nuevas herramientas que facilitan el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la interacción de este patógeno con sus hospedadores. Entre las líneas de investigación que estamos desarrollando en nuestro grupo, se encuentra el análisis de la implicación en virulencia de transportadores implicados en la expulsión de sustancias tóxicas como los MDR. Los resultados obtenidos nos indican que estos transportadores tienen un papel relevante en la interacción de *Erwinia* con sus huéspedes, y que la contribución a la virulencia de éstos varía según el tipo de huésped. Otra de las aproximaciones al estudio de la patogénesis de *E. chrysanthemi* que desarrollamos en el laboratorio, se basa en el análisis del fenómeno de quimiotaxis en esta bacteria. Hemos generado mutantes en distintos genes implicados en estos mecanismos y estamos analizando su implicación en virulencia.

Basándonos en técnicas de transcriptómica y proteómica, hemos iniciado el análisis de la respuesta de este patógeno a los distintos factores de la planta.

- 1.- López-Solanilla, E., García-Olmedo, F., and Rodríguez -Palenzuela, P. (1998). *Plant Cell* 10: 873-876.
- 2.- Miguel, E., Poza-Carrión, C., López-Solanilla, E., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., García-Olmedo, F., and Rodríguez-Palenzuela, P. (2000). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 421-429.
- 3.- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F., and Rodríguez-Palenzuela, P.(2003). *Mol. Microbiol.* 49: 347-357.
- 4.- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., and Rodríguez-Palenzuela, P. (2005). *J. Bacteriol.* 187: 2157-2162.

Infecciones mixtas para el análisis genético de la interacción *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* con judía

A. P. Macho*, A. Zumaquero, I. Ortiz-Martín y C. R. Beuzón

*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética,
Universidad de Málaga*

La replicación de *Pseudomonas syringae* en un hospedador susceptible depende de un gran número de factores de virulencia y está directamente relacionada con su capacidad patogénica (Ercolani y Crosse, 1966). La pérdida de uno o varios de esos factores conlleva en muchos casos una reducción del crecimiento de la bacteria *in planta* asociado a una atenuación de los síntomas que produce. La determinación del papel que estos factores juegan en la infección, así como las relaciones funcionales entre ellos, precisa métodos sensibles de cuantificación y análisis genético de la virulencia. En sistemas animales, las infecciones mixtas han permitido llevar a cabo este tipo de análisis, así como la puesta a punto de métodos de alto rendimiento para la búsqueda de nuevos factores de virulencia (Beuzón y Holden, 2001). De este modo se ha conseguido establecer relaciones funcionales entre factores de virulencia, incluyendo su asignación a circuitos de regulación, secreción o transporte en patógenos como *Salmonella* o *Streptococcus* (Beuzón *et al*, 2000; Beuzón *et al*, 2001; Brown *et al*, 2002, Ramos-Morales *et al*, 2003).

En este trabajo, hemos desarrollado un método que permite el análisis genético de la virulencia de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* en judía, basado en el uso de infecciones mixtas. El método cumple dos premisas básicas: reproducibilidad en el análisis de estirpes con igual capacidad patogénica en experimentos independientes, y ausencia de complementación en *trans* de mutantes afectados en virulencia cuando son co-inoculados con la estirpe silvestre. Hemos demostrado la validez de este sistema mediante el análisis de la virulencia de mutantes afectados en el sistema Hrp de secreción tipo III o de sus efectores, atenuados o causantes de respuesta de hipersensibilidad (HR) en judía.

Referencias

- Beuzón CR, Méresse S, Unsworth KE, Ruiz-Albert J, Garvis SG, Waterman SR, Ryder TA, Boucrot E, Holden DW (2000) *EMBO J.* 19:3235-3249
- Beuzón CR, Holden DW (2001) *Microbes Infect* 3:1345-42
- Beuzón CR, Unsworth KE, Holden DW (2001) *Infect Immun* 69:7254-6
- Brown JS, Gilliland SM, Ruiz-Albert J, Holden DW (2002) *Infect Immun* 70:4389-4398
- Ercolani GL and Crosse JE (1966) *J Gen Microbiol* 45:429-439
- Ramos-Morales F, Prieto AI, Beuzón CR, Holden DW, Casadesús J (2003) *J. Bacteriol.* 185:5328-32

Herramientas moleculares para el análisis de la regulación de la expresión del sistema de secreción tipo III Hrp en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola

I. Ortiz-Martín*, A. P. Macho y C. R. Beuzón

*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética,
Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, Málaga 29071*

Muchos patógenos Gram-negativos, incluyendo *Pseudomonas syringae* poseen sistemas de secreción tipo III (TTSS), capaces de secretar y translocar proteínas (efectores) al citoplasma de la célula hospedadora. En *P. syringae*, existe un TTSS que se conoce como Hrp por ser necesario para la inducción de respuesta hipersensible en plantas resistentes (HR), y para la patogénesis en hospedadores susceptibles. Los genes que codifican el sistema de secreción Hrp están agrupados en una isla de patogenicidad denominada locus *hrp/hrc*. La expresión de los genes *hrp/hrc* se induce en la planta y puede ser reproducida *in vitro* usando medio mínimo que presumiblemente refleja las condiciones que la bacteria encuentra durante la infección. En este proceso participan tres activadores transcripcionales: HrpR y HrpS, que constituyen un sistema de regulación de dos componentes del tipo NtrC y que activan la expresión de HrpL, un factor σ alternativo que activa la expresión de los genes *hrp/hrc*. Adicionalmente, el producto del gen *hrpA* ha sido identificado como necesario para la expresión de estos genes. HrpA es el componente estructural del pilus Hrp y es necesario para la secreción y translocación de efectores. El mecanismo por el cual HrpA afecta a la expresión se desconoce aunque se sabe que está relacionado con variaciones en los niveles de ARNm del operon *hrpRS*. Recientemente, se han identificado además dos reguladores negativos de este sistema: HrpV y Lon. En el primer caso, se ha descrito que una mutación por inserción en el gen *hrpV* incrementa los niveles de expresión y secreción de efectores en la bacteria, mientras que la expresión ectópica del alelo silvestre los reduce. No obstante, el mecanismo por el cual este efecto tiene lugar se desconoce. Por otra parte, Lon es una proteasa dependiente de ATP, descrita y caracterizada extensamente en *E. coli*, que recientemente se ha asociado a la virulencia tanto en *P. syringae* como en *Salmonella*. En *P. syringae*, mutantes por delección de *lon* presentan un incremento de la transcripción de *hrpL* así como de los niveles de HrpR. Lon esta implicada en procesos celulares básicos en *E. coli*, pero se desconoce que otras funciones lleva a cabo en *Pseudomonas*.

El objetivo de este trabajo es profundizar en la regulación de la expresión del sistema Hrp. Para ello hemos construido mutantes por disrupción de *hrpL*, *hrpV*, *hrpA*, y *lon* en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, y estamos construyendo mutantes múltiples con distintas combinaciones de las mismas. Asimismo, hemos generado plásmidos que permiten la expresión constitutiva y estable de cada uno de estos genes en la bacteria, tanto *in vitro* como *in planta*. Adicionalmente, hemos construido mutantes por disrupción de los genes *hrcV* y *hrcC*, esenciales para la secreción Hrp. Con esta colección de herramientas estamos llevando a cabo el análisis genético de la regulación del sistema Hrp, utilizando como ensayos la inducción de HR en tabaco, el crecimiento y la inducción de síntomas en judía, el índice de competitividad, la expresión de genes del sistema, y la secreción *in vitro*.

Interacción entre efectores bacterianos tipo III y el sistema de sumolización de plantas

C. M. Guevara*, E. R. Bejarano y J. Ruiz-Albert

*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética,
Universidad de Málaga*

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosas estrategias para explotar los recursos suministrados por los organismos eucariotas, tanto plantas como animales, que les sirven de hospedador. La invasión y colonización de tejidos eucariotas requiere una gran variedad de proteínas secretadas (efectores), frecuentemente a través de sistemas de secreción tipo III (TTSS) dedicados a virulencia. Ciertos procesos celulares eucariotas, esenciales y por tanto conservados, constituyen dianas para dichos efectores bacterianos. Uno de estos procesos es la sumolización, un sistema eucariota de modificación postraduccional reversible similar a la ubiquitinación. La sumolización consiste en la unión covalente de una pequeña proteína denominada SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) a lisinas específicas de las correspondientes proteínas diana celulares, y puede contribuir a modular la localización, actividad, estabilidad y capacidad de interacción con otras proteínas o con ADN de las proteínas así modificadas. Los patrones de sumolización en eucariotas son regulados de modo dinámico por la acción opuesta de ligasas y proteasas específicas. La interferencia de proteínas de virulencia con los sistemas de sumolización de células eucariotas ha sido descrita en virus y bacterias patógenas, tanto de animales como de plantas. En bacterias se ha demostrado que una serie de proteínas efectoras asociadas a TTSS son capaces de actuar como proteasas específicas y desumolizar proteínas eucariotas conjugadas a SUMO.

En este trabajo se han identificado mediante análisis bioinformático 17 proteínas asociadas a TTSS, presentes en estirpes fitopatógenas pertenecientes a los géneros *Xanthomonas* (siete), *Pseudomonas* (cinco), *Erwinia* (dos) y *Ralstonia* (tres) que podrían actuar como proteasas específicas de SUMO. Los genes bacterianos correspondientes a 7 de estos presuntos efectores han sido amplificados a partir de ADN genómico y clonados en los vectores oportunos. Hemos empleado el sistema del doble híbrido en levadura de modo dirigido, para confirmar una posible interacción con ciertos componentes principales del sistema de sumolización: SCE1-UBC9 (Ubiquitin conjugating enzyme 9), proteína que conjuga SUMO a las proteínas diana, y SUMO. Todos los efectores bacterianos analizados muestran interacción fuerte con SCE1-UBC9. En claro contraste, ninguna de las proteínas ensayadas mostró interacción con SUMO.

Identificación y análisis de genes de virulencia en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

I. Pérez-Martínez^{1*}, L. Lambertsen¹, E. Santilli², S. Tegli², J. Murillo³, C. Ramos¹

¹Área de Genética. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n. 29017 Málaga

²Dpto di Biotecnologie Agrarie, Laboratorio di Patologia Vegetale Molecolare, 50019 Sesto Fiorentino, Florencia, Italia

³Laboratorio de Patología Vegetal, Dpto de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona

Hasta la fecha, pocos estudios se han centrado en la descripción de los procesos moleculares implicados en la interacción que tiene lugar entre *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*), agente causal de la tuberculosis del olivo, y su huésped natural. Estudios realizados en cepas de *P. savastanoi* aisladas de tumores de adelfa (pv. *nerii*) relacionan la aparición de la hiperplasia característica de esta enfermedad con la producción bacteriana en los tejidos vegetales de las fitohormonas ácido indolacético (IAA) y citoquininas, cuyos genes biosintéticos son de localización plasmídica. Aunque la localización de estos genes en *Pss* no se ha estudiado en profundidad, se ha descrito la existencia de varias copias de localización plasmídica del gen *iaaL* en un aislado procedente de tumores de olivo, sin embargo, la localización del resto de los genes implicados en la biosíntesis de IAA (*iaaM* e *iaaH*) parece ser cromosómica. En este trabajo, hemos abordado la determinación mediante hibridación *Southern* del número de copias y localización en *Pss* de cada uno de los tres genes *iaa* y del gen *ptz*, implicado en la biosíntesis de citoquininas. Diez de los once aislados analizados, procedentes de localizaciones geográficas diversas, poseen al menos dos copias cromosómicas de cada uno de los genes *iaa*; el aislado restante, presenta una copia de cada uno de estos genes localizadas en un plásmido de aproximadamente 75Kb. En la mayoría de los aislados de *Pss* analizados existe una sola copia del gen *ptz*, que se localiza en plásmidos de tamaño variable (aproximadamente 42-95Kb); sin embargo, dos cepas parecen contener una o dos copias de *ptz* localizadas en el cromosoma, mientras que el gen no fue detectado en otras dos cepas.

Por otro lado, estudios recientes relacionan la formación de tumores en olivo con el sistema de secreción tipo III (TTSS) de *Pss*, sintetizado por los genes *hrp/hrc*. Aunque se ha demostrado que un mutante en el gen *hrcC* es defectivo en la inducción de síntomas en olivo, el mecanismo responsable de esta respuesta no se ha descrito hasta la fecha. Con el objetivo de determinar si otros genes *hrp/hrc* son necesarios para la inducción de la enfermedad, como ocurre con otras bacteria fitopatógenas, hemos abordado la identificación y construcción de deleciones en algunos de ellos. Mediante intercambio alélico utilizando un plásmido suicida en *Pss*, se aisló un mutante en uno de los genes estructurales esenciales para la formación del complejo TTSS (gen *hrpA*). Este mutante, es incapaz de inducir la respuesta de hipersensibilidad (HR) en tabaco; en la actualidad, estamos determinando el papel de este gen en el proceso de infección de olivo.

Recientemente, hemos iniciado la identificación de otros genes de *Pss* implicados en la interacción con olivo mediante STM (*signature tagged mutagenesis*), estrategia de genómica funcional basada en la identificación *in vivo* de mutantes defectivos en un determinado proceso utilizando transposones etiquetados. Actualmente, estamos abordando el análisis de una colección de aproximadamente 5000 mutantes obtenidos mediante esta técnica.

Participantes

Agustí Alcals, Lourdes

Instituto de Tecnología Agroalimentaria.
Universidad de Gerona
Campus Montilivi. Escuela Politécnica
Superior 1.
17071 Gerona
Tel.- 972418428
E-mail: lagusti@intea.udg.es

Antúnez Lamas, María

Dpto. Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos,
Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Complutense S/N
28040 Madrid
Tel.- 913365709
E-mail: maria.antunez@upm.es

Badosa Romáño, Esther

Instituto de Tecnología Agroalimentaria.
Universidad de Gerona
Campus Montilivi. Escuela Politécnica
Superior 1.
17071 Gerona
Tel.- 972418440
E-mail: ebadosa@intea.udg.es

Beuzón López, Carmen R.

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131959
E-mail: cbl@uma.es

Bonaterra Carreras, Anna

Instituto de Tecnología Agroalimentaria.
Universidad de Gerona
Campus Montilivi. Escuela Politécnica
Superior 1.
17071 Gerona
Tel.- 972418440
E-mail: annab@intea.udg.es

Bracamonte Muñoz, Lilian

Dpto. Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos,
Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Complutense S/N
28040 Madrid
Tel.- 913365709
E-mail: bracamonti@hotmail.com

Cazorla López, Francisco M.

Dpto. de Microbiología. Facultad de
Ciencias. Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952137587
E-mail: cazorla@uma.es

Cubero Dabrio, Jaime

Instituto Nacional de Investigaciones
Agrarias.
Ctra. de la Coruña Km 7,5
28040 Madrid
Tel.- 913474162
E-mail: cubero@inia.es

De Vicente Moreno, Antonio

Dpto. de Microbiología. Facultad de
Ciencias. Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131892
E-mail: adevicente@uma.es

Fernández Ortuño, Dolores

Consejo Superior de Investigaciones
Científicas
Estación experimental "La Mayora"
29750 Algarrobo-Costa. Málaga
Tel.- 952552656
E-mail: lolafdez@eelm.csic.es

García Gutiérrez, Laura

Dpto. de Microbiología. Facultad de
Ciencias. Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: lau_gg79@hotmail.com

González Varela, Germán

Servicio Regional de Investigación y
Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)
Apdo. 13.33300. Villaviciosa. Asturias
Tel.- 985890066
E-mail: ggonzalez@serida.org

González Sánchez M^a Ángeles

CIFA-IFAPA Churriana
Cortijo de la Cruz S/N
29140 Churriana. Málaga
Tel.- 951036223
E-mail: esparrago26@mixmail.com

Gutiérrez Barranquero, José Antonio

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: fitomicro@uma.es

Hernández Romero, Diana

Dpto. de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia
Campus de Espinardo
30100 Murcia
Tel.- 968364955
E-mail: antonio@um.es

López González, María Milagros

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5
46113 Moncada, Valencia
Tel.- 963424000
E-mail: mlopez@ivia.es

López Ruiz, Francisco José

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Estación experimental "La Mayora"
29750 Algarrobo-Costa. Málaga
Tel.- 952552656
E-mail: franlr@eelm.csic.es

López Solanilla, Emilia

Dpto. Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Complutense S/N
28040 Madrid
Tel.- 913365709
E-mail: emilia.lopez@upm.es

Llama Palacios, M^a Aránzazu

Dpto. Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Complutense S/N
28040 Madrid
Tel.- 913365709
E-mail: allama@bit.etsia.upm.es

Llop Pérez, Pablo

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5
46113 Moncada, Valencia
Tel.- 963424000
E-mail: pllop@ivia.es

Macho Escribano, Alberto

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: macho@uma.es

Maggiorani Valecillos, Alfredo Emilio

Dpto. Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Complutense S/N
28040 Madrid
Tel.- 913365709
E-mail: maggiora62@hotmail.com

Marco Noales, Ester

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5
46113 Moncada, Valencia
Tel.- 963424000
E-mail: ester.marco@ivia.es

Martín Guevara, Carlos

Dpto. de Biología Celular, Genética y Fisiología. Área de Genética Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131968
E-mail: cmguevara@uma.es

Martín Lasanta, Marta

Dpto. de Biología Universidad Autónoma de Madrid
C/Darwin 2. Campus de Cantoblanco
28049 Madrid
Tel.- 914978188
E-mail: m.martin@uam.es

Martín Sánchez, Pedro María

CIFA-IFAPA Churriana
Cortijo de la Cruz S/N
29140 Churriana. Málaga
Tel.- 951036223
E-mail: pedromaria@amena.com

Matas Casado, Isabel María

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: imatas@uma.es

Mingorance Álvarez, Esther

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: fitolab@uma.es

Moreno González, Mari Carmen

Instituto de Tecnología Agroalimentaria
Universidad de Gerona
Campus Montilivi. Escuela Politécnica
Superior 1.
17071 Gerona
Tel.- 972418428
E-mail: cmoreno@intea.udg.es

Morón Flores, Belén

Dpto. de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla
Tel.- 954556453
E-mail: bmoren@us.es

Murillo Martínez, Jesús

Dpto. de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra
Campus de Arrosadía S/N
31006 Pamplona
Tel.- 948169133
E-mail: jesus@unavarra.es

Navarro de la Fuente, Laura

Dpto. de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra
Campus de Arrosadía S/N
31006 Pamplona
Tel.- 948169717
E-mail: laura.navarro@unavarra.es

Ordax Ibáñez, Mónica

Instituto Valenciano de Investigaciones
Agrarias (IVIA)
Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5
46113 Moncada, Valencia
Tel.- 963424000
E-mail: ordax@ivia.es

Ortiz Martín, Inmaculada

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: inmaom@uma.es

Pérez García, Alejandro

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131890
E-mail: aperez@uma.es

Pérez Jiménez, Rosa M.

CIFA-IFAPA Churriana
Cortijo de la Cruz S/N
29140 Churriana. Málaga
Tel.- 951036219
E-mail: patología@olinet.es

Pérez Martínez, Isabel

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: isaperez@uma.es

Pliego Prieto, Clara

CIFA-IFAPA Churriana
Cortijo de la Cruz S/N
29140 Churriana. Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: clarapliego@uma.es

Pujol Abajo, Marta

Instituto de Tecnología Agroalimentaria
Universidad de Gerona
Campus Montilivi. Escuela Politécnica
Superior 1.
17071 Gerona
Tel.- 972418428
E-mail: mpujol@intea.udg.es

Quesada Pérez, José Miguel

Instituto Valenciano de Investigaciones
Agrarias (IVIA)
Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5
46113 Moncada, Valencia
Tel.- 963424000
E-mail: jquesada@ivia.es

Ramos Rodríguez, Cayo

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131955
E-mail: crr@uma.es

Rodríguez Moreno, Luis Gabriel

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: lgrodriguez@uma.es

Rodríguez Palenzuela, Pablo

Dpto. Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos
Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Complutense S/N
28040 Madrid
Tel.- 913365702
E-mail: pablo.rpalenzuela@upm.es

Romero Hinojosa, Diego Francisco

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: diego.romero@uma.es

Ruiz Albert, Javier

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131959
E-mail: javieruizal@uma.es

Ruiz Romero, Diego José

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: fitomicro@uma.es

Ruz Estévez, Lidia

Instituto de Tecnología Agroalimentaria
Universidad de Gerona
Campus Montilivi. Escuela Politécnica
Superior 1.
17071 Gerona
Tel.- 972418440
E-mail: lruz@intea.udg.es

Sabuquillo Castrillo, M^a del Pilar

Instituto Nacional de Investigaciones
Agrarias.
Ctra. Dela Coruña Km 7,5
28040 Madrid
Tel.- 913476758
E-mail: mpssc@inia.es

Sanchez Amat, Antonio

Dpto. de Genética y Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Murcia
Campus de Espinardo
30100 Murcia
Tel.- 968364955
E-mail: antonio@um.es

Torés Montosa, Juan Antonio

Consejo Superior de Investigaciones
Científicas
Estación experimental "La Mayora"
29750 Algarrobo-Costa. Málaga
Tel.- 952552656
E-mail: tores@eelm.csic.es

Vázquez Sánchez, M^a Ángeles

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: fitomicro@uma.es

Zeriouh, Houda

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952134270
E-mail: fitomicro@uma.es

Zumaquero Jiménez, Adela

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Málaga
Campus de Teatinos S/N
29071 Málaga
Tel.- 952131676
E-mail: adelazj@hotmail.com

Aguilera-Aguirre, S.	32
Agustí, L.	26
Álvarez-Morales, A.	32
Antúñez-Lamas, M.	34
Arrebola, E.	31
Badosa, E.	19, 20, 21
Bañeras, L.	19
Barón, M.	29
Bejarano, E.R.	37
Beuzón, C.R.	29, 35, 36
Biosca, E.G.	8
Bonaterra, A.	26
Cabrefiga, J.	33
Cazorla, F.M.	17, 23, 24, 25, 31
Cubero, J.	11
Dardanelli, M.S.	9
De Cal, A.	27
de Lorenzo L.	9
de Vicente, A.	14, 17, 18, 23, 25, 31
Estévez, J.	9
Fernández-Ortuño, D.	5, 6
González, A.J.	7
González-Sánchez, M.A.	23
González-Varela, G.	7
Graham, J.H.	11
Guevara, C.M.	37
Hernández-Romero, D.	30
Lambertsen, L.	38
Larenas, J.	15
Llama-Palacios, A.	34
Llop, P.	33
López, M.M.	8, 12, 33
López-López, K.	32
López-Ruiz, F.J.	5, 6
López-Solanilla, E.	20, 34
Macho, A.P.	29, 35, 36
Maggiorani, A.	34
Manceau, M.	21
Marco-Noales, E.	8
Martín, M.	15
Martínez-Granero, F.	15
Martín-Sánchez, P.M.	23
Matas, I.M.	13
Mateo, N.	32
Megías, M.	9
Melgarejo, P.	27
Merchán, F.	9
Mingorance, E.	14
Montesinos, E.	19, 20, 21, 22, 26, 33
Moragrega, C.	22, 26
Moreno, M.C.	20
Morón, B.	9
Murillo, J.	32, 38
Navarro, L.	32
Navazo, A.	15
Nedbal, L.	29
Ordax, M.	8
Ortiz-Martín, I.	35, 36
Parés, D.	19
Peñalver, R.	12, 13
Pérez-García, A.	5, 6, 14, 17, 18
Pérez-Jiménez, R.M.	23, 24
Pérez-Martínez, I.	12, 38
Pineda, M.	29
Pla, M.	19
Pliego, C.	24
Pujol, M.	21
Quesada, J.M.	12, 13
Ramos, C.	12, 13, 23, 24, 29, 38
Rivilla, R.	15
Rodríguez-Moreno, L.	29
Rodríguez-Palenzuela, P.	20, 34
Romero, D.	17, 18
Ruiz-Albert, J.	37
Ruiz-Romero, D.J.	25
Ruz, L.	22
Sabuquillo, P.	27
Sánchez-Amat, A.	30
Santilli, E.	38
Solano-Muñoz, F.	30
Soukupová, J.	29
Sousa, C.	9
Sztejnberg, A.	27
Tegli, S.	38
Torés, J.A.	5, 6, 14
Trias, R.	19
Vázquez, M.A.	31
Zea-Bonilla, T.	23
Zeriouh, H.	18
Zumaquero, A.	35