



II Reunión del Grupo Especializado Microbiología de Plantas

Programa y Libro
de Resúmenes

Benalmádena (Málaga), 7-9 Marzo de 2007

II Reunión Grupo Especializado SEM
Microbiología de Plantas
Benalmádena (Málaga)
7 – 9 marzo 2007

MiP '07

Con el patrocinio de:

Exmo. Ayuntamiento de
Benalmádena



www.benalmadena.com



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

www.uma.es



www.trops.es



<http://ibercex.com>



www.santander.com



www.bio-rad.com



 **Barloworld Scientific**

www.afora.com



www.dicsa.es



A CH-Werfen Company

www.izasa.es



www.genesys-instrumentacion.es

Comité Organizador:

Juan José Borrego García	Universidad de Málaga
Francisco M. Cazorla López	Universidad de Málaga
Jesús Murillo Martínez	Universidad Pública de Navarra
Alejandro Pérez García	Universidad de Málaga
Cayo Ramos Rodríguez	Universidad de Málaga
Antonio de Vicente Moreno	Universidad de Málaga

Miercoles 7 de Marzo

12:00. Registro y acomodación (Hotel Alay)

14:00. Almuerzo (Hotel Alay)

Sesiones: Salón del Centro Náutico. Puerto Deportivo de Benalmádena

16:00. Inauguración de la reunión

16:30-17:45. Sesión 1. (Moderadores: Enrique Monte y Pablo Llop)

Diagnóstico y Epidemiología

- R1** (16:30) Detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri causante de la canchrosis de los cítricos en frutos comerciales, mediante aislamiento y PCR.
M. Golmohammadi, J. Cubero, J. Peñalver, J.M. Quesada, M.M. López y P. Llop
- R2** (16:45) Biología infecciosa y epidemiología de *Xanthomonas arboricola* pv. juglandis en nogal
G. Santamaría, J. Matías, M. Rovira, N. Aletà, C. Moragrega y E. Montesinos
- R3** (17:00) El fuego bacteriano en Castilla y León. Detección de un nuevo foco en "La Cepeda" (León)
J.L. Palomo
- R4** (17:15) Microorganismos fitopatógenos presentes en semilla de alubia de León
M.P. Campelo, B. Reinoso y A.J. González

Ecología e Interacciones

- E1** (17:30) Aislamiento y análisis funcional del gen *Thc1* que codifica una cutinasa en *Trichoderma harzianum* T34
M.B. Rubio, R.E. Cardoza, M.R. Hermosa, S. Gutierrez y E. Monte

Pausa café (17:45-18:15)

18:15-19:45. Sesión 2. (Moderadores: Manuel Espinosa y José L. Palomo)

Ecología e Interacciones (cont.)

- E2** (18:15) Análisis mediante arrays del transcriptoma de *Trichoderma harzianum* T34 en la interacción con planta de olivo
R. Suárez, M.R. Hermosa, M. Rey, R.M. Jiménez-Díaz y E. Monte
- E3** (18:30) Señalización intercelular en *Pseudomonas putida* KT2440
R. Fernández-Piñar, M.L. Travieso y M. Espinosa-Urgel
- E4** (18:45) ¿Es necesaria la capacidad de formar biofilms para la colonización de la rizosfera?
E. Barahona, A. Navazo, M. Redondo-Nieto, F. Martínez-Granero, M. Martín y R. Rivilla
- E5** (19:00) Análisis comparativo del establecimiento de biofilms de *Pseudomonas putida* sobre superficies abióticas y vegetales
F. Yousef, M.L. Travieso y M. Espinosa-Urgel
- E6** (19:15) Formación de biopelículas por *Agrobacterium* spp. sobre superficies inertes y fragmentos de raíz.
A.M. Abarca-Grau, E. Marco-Noales, M.M. López y R. Peñalver
- E7** (19:30) Tres rutas independientes de señalización regulan negativamente la movilidad de *Pseudomonas fluorescens* F113
A. Navazo, E. Barahona, M. Redondo-Nieto, A. Antequera, J.I. Arcos, F. Martínez-Granero, R. Rivilla y M. Martín

21:30 Recepción Castillo Bil-Bil (Benalmádena Costa)

Jueves 8 de Marzo

9:00-11:00. Sesión 3. (Moderadores: Javier Ruiz y Marta Martín)

Diversidad

- D1** (9:00) Diferenciación de varias especies de la familia *Cryphonectriaceae* (Diaporthales) mediante RAPD
G. González-Varela y *A.J. González*
- D2** (9:15) Análisis genético global de plásmidos de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.
I. Pérez-Martínez, Y. Zhao, J. Murillo, G.W. Sundin y *C. Ramos*
- D3** (9:30) Análisis de la diversidad genética de cepas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* y su correlación con la evolución del complemento de genes de virulencia
M.E. Führer, L. Navarro de la Fuente, L. Rivas, R. Garcidueñas-Piña, J.L. Hernández-Flores, A. Álvarez-Morales y *J. Murillo*
- D4** (9:45) Utilidad del IS53 para estudios de variabilidad genética y tipificación molecular del *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.
J.M. Quesada, I. Pérez-Martínez, C. Ramos, M.M. López y *R. Peñalver*
- D5** (10:00) Evaluación de técnicas fenotípicas y genéticas para el análisis de la diversidad de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aisladas de árboles de mango.
J.A. Gutiérrez-Barranquero, E. Arrebola, J. Murillo, A. de Vicente y *F.M. Cazorla*
- D6** (10:15) Recuperación de poblaciones microbianas de la filosfera para un posterior análisis molecular del gen del rRNA 16S mediante PCR-DGGE.
M. Martínez-Alonso, J. Escolano, M. Mallorquí y *N. Gaju*
- D7** (10:30) Caracterización de la microbiota presente en suelos modificados por enmiendas orgánicas en el cultivo del aguacate.
N. Bonilla, J.A. Torés, J.M. Hermoso, F.M. Cazorla y *A. de Vicente*
- D8** (10:45) La introducción de microorganismos modificados genéticamente diseñados para rizorremediación induce cambios en las bacterias nativas de la rizosfera pero no en las del suelo circundante.
D. Aguirre de Cárcer, M. Martín, U. Karlson y *R. Rivilla*.

Pausa café (11:00-11:30)

11:30-13:30. Sesión 4. (Moderadores: Ramón Peñalver y Ana Bonaterra)

Control biológico

- C1** (11:30) Selección de bacterias con capacidad biocontrol de *Rosellinia necatrix* y determinación de posibles mecanismos de acción
M.A. González-Sánchez, F.M. Cazorla, A. de Vicente y *R.M. Pérez-Jiménez*
- C2** (11:45) Interacciones multitróficas en el control biológico de la podredumbre blanca del aguacate.
C. Pliego, S. de Weert, G.E.M. Lamers, G. Bloembergen, S. Kanematsu, F.M. Cazorla y *C. Ramos*
- C3** (12:00) Genes implicados en la producción de antibióticos en *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 y su papel en biocontrol.
R. Martín-Pérez, J.C. Codina, A. de Vicente y *F.M. Cazorla*
- C4** (12:15) Bioprotección de frutas y vegetales frescos frente a patógenos relacionados con intoxicaciones alimentarias mediante bacterias del ácido láctico.
R. Trias, E. Badosa, L. Bañeras, E. Montesinos
- C5** (12:30) Papel de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en la capacidad de biocontrol de enfermedades bacterianas de filosfera de cucurbitáceas.
H. Zeriuoh, D. Romero, A. de Vicente y *A. Pérez-García*
- C6** (12:45) Aislamiento de bacterias con características de promoción del crecimiento vegetal en los arrozales de

las marismas del Guadalquivir

I. del Castillo, M.S. Domínguez-Sánchez, J. Ojeda, F. Delgado, F. Montes, R. Espuny, R. Bellogín, T. Cubo, J. Ollero, M.S. Dardanelli, M. Aguilar y M. Megías

C7 (13:00) Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras del crecimiento e inductores de resistencia sistémica en melón.

L. García-Gutiérrez, D. Romero, A. de Vicente y A. Pérez-García

C8 (13:15) Incremento de tolerancia al estrés, supervivencia y eficacia mediante osmoadaptación de agentes de biocontrol.

J. Cabrefiga, A. Bonaterra, J. Camps y E. Montesinos

14:00 Almuerzo (Hotel Alay)

16:30 Visita a Benalmádena

21:30 Cena social

Viernes 9 de Marzo

9:00-11:15. Sesión 5. (Moderadores: Emilia Lopez y Ester Marco)

Patogénesis

- P1** (9:00) El perfil patogénico específico de las cepas de raza 5 de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola se debe a la carencia del gen de efectores *avtPphC*.
A. Iturbe, G. Tsiamis y J. Murillo
- P2** (9:15) Análisis del comportamiento de mutantes en motilidad de *Dickeya dadantii* (ex *Erwinia chrysanthemi*).
M. Antúñez-Lamas, E. Cabrera-Ordoñez, E. López-Solanilla, A. Rodríguez-Moreno, O. Trelles-Salazar y P. Rodríguez-Palenzuela
- P3** (9:30) La isla de patogenicidad para la biosíntesis de faseolotoxina ha invadido *Pseudomonas syringae* repetidamente.
L. Navarro de la Fuente, M.E. Führer, K. López, A. Álvarez-Morales y J. Murillo
- P4** (9:45) Búsqueda de dianas de interacción en la planta con efectores TTSS de *Pseudomonas syringae* con actividad proteasa de SUMO.
C.M. Guevara, E.R. Bejarano y J. Ruiz-Albert
- P5** (10:00) Clonaje, mutagénesis y caracterización en *Dickeya dadantii* de genes relacionados con patogénesis: un posible transportador de histidina y *rcsB*.
M. Sena-Vélez, M. Antúñez-Lamas, E. López-Solanilla, R. Cuartas-Lanza, A. Llama-Palacios, C. Rojas y P. Rodríguez-Palenzuela
- P6** (10:15) Generación de mutantes simples y múltiples del género *Pseudomonas*.
A. Zumaquero y C.R. Beuzón
- P7** (10:30) Índice de competitividad: un método sensible y preciso para el análisis genético de la virulencia en *Pseudomonas syringae*.
A.P. Macho, A. Zumaquero, I. Ortiz-Martín y C.R. Beuzón
- P8** (10:45) Análisis genético de la expresión del sistema de secreción tipo III Hrp en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola.
I. Ortiz-Martín, R. Thwaites, J.M. Mansfield y C.R. Beuzón

Pausa café (11:00-11:30)

11:30-13:30. Sesión 6. (Moderadores: Rafael Rivilla y Juan A. Torés)

Patogénesis (Cont.)

- P9** (11:30) Proteína fluorescente verde (Gfp) aplicada al estudio de la infección de olivo por *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi
L. Rodríguez-Moreno, I. Pérez-Martínez y C. Ramos
- P10** (11:45) Análisis de la virulencia de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi mediante Signature Tagged Mutagenesis (STM).
I.M. Matas, L. Lambertsen y C. Ramos

Estrés y Resistencia

- S1** (12:00) Análisis a nivel genómico de la respuesta a péptidos antimicrobianos en *Dickeya dadantii*.
R. Cuartas, A. Llama-Palacios, C. Rojas, P. Rodríguez-Palenzuela y E. López-Solanilla
- S2** (12:15) Efecto de la limitación prolongada de nutrientes en la supervivencia y patogenicidad de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 en agua natural.
B. Álvarez, E.G. Biosca y M.M. López
- S3** (12:30) Modificación del medio B de King para la recuperación de células estresadas de *Erwinia amylovora*.

M. Ordax, E.G. Biosca, M.M. López y E. Marco-Noales

S4 (12:45) Bases moleculares de la resistencia a estrobilurinas en *Podosphaera fusca*.

D. Fernández-Ortuño, J.A. Torés, A. de Vicente y A. Pérez-García

S5 (13:00) Resistencia a fungicidas inhibidores de la enzima C14 α -demetilasa en *Podosphaera fusca*.

F.J. López-Ruiz, A. Pérez-García, C.J. Ridout, L. Chartrain, A. de Vicente, J.K.M. Brown y J.A. Torés

13:15. Clausura de la II Reunión del MiP

14:00. Almuerzo

DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA

Detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causante de la cancrrosis de los cítricos en frutos comerciales, mediante aislamiento y PCR

M. Golmohammadi¹, J. Cubero², J. Peñalver¹, J. M. Quesada¹, M. M. Lopéz¹ y P. Llop¹

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Valencia*

²*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Madrid.*

E-mail: morteza@ivia.es

Los países mediterráneos producen más de 5.6 millones de Tm de cítricos y se encuentran entre los principales productores del mundo. Entre ellos, España cultiva más de 300.000 ha de cítricos, y es el líder mundial en la producción y la exportación de fruta fresca. La cancrrosis de los cítricos, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, es una de las enfermedades bacterianas más grave de estos cultivos. Se caracteriza por lesiones eruptivas en las hojas, frutos, ramas y disminución de la calidad y la producción de los frutos. Sin embargo, esta enfermedad no se ha detectado en ningún país de la Unión europea (UE), y por la importancia de las pérdidas que causa, está considerada como organismo de cuarentena según la legislación de la UE. La diseminación de la cancrrosis se debe principalmente al movimiento de material vegetal contaminado y a la actividad humana. Según la legislación comunitaria las importaciones de frutos cítricos a la UE solamente se permiten de áreas donde está presente la bacteria, si han sido desinfectados y están libres de síntomas de la enfermedad. Los frutos con síntomas, si se confirma que los mismos son producidos por *X. a. pv. citri* no pueden ser exportado a la UE, a pesar de los tratamientos aplicados. Según la legislación de la UE, en todos los países europeos y por ello en España, se deben analizar las muestras de frutos importados y con síntomas sospechosos cuando se importan de áreas donde está presente esta enfermedad. Se han propuesto varios protocolos para la detección rutinaria del agente causal de la cancrrosis, pero no se han aplicado específicamente a la detección de *X. a. citri* en frutos comerciales importados. Para ello, se ha evaluado un enfoque integrado que combina el aislamiento en medio cultivo y métodos basados en PCR convencional y a tiempo real. Se comparó la eficiencia del aislamiento de la bacteria, seguido del análisis de la patogenicidad en hoja de pomelo, y la de tres protocolos convencionales de PCR y dos protocolos de PCR a tiempo real (con SYBR Green y una sonda TaqMan), para la detección de *X. a. pv. citri*. Dichas técnicas se han comparado en frutos con síntomas de cancrrosis, importados a España en los últimos años de varios países sudamericanos donde está presente esta enfermedad (Argentina, Uruguay, Brasil y México). Se propone un protocolo de análisis integrado para la detección fiable de la bacteria en lesiones de frutos, empleando varias técnicas y con PCR a tiempo real con sonda TaqMan como primer método de screening. Dicho protocolo se ha validado como método rápido y sensible, y se consolida como una herramienta útil para el diagnóstico de la enfermedad en frutos comerciales.

Biología infecciosa y epidemiología de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal

G. Santamaría¹, J. Matías², M. Rovira², N. Aletà², C. Moragrega¹, E. Montesinos¹

¹Instituto de Tecnología Agroalimentaria - CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona.

²Departamento de Arboricultura Mediterránea – IRTA Mas Bové. Constantí. Tarragona

E-mail: concepcio.moragrega@udg.es

La bacteriosis del nogal causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* es la principal enfermedad bacteriana de este cultivo y actualmente es un importante factor limitante de la producción. Su control se basa en la aplicación de derivados cúpricos durante todo el período vegetativo. Se ha observado que la reducción en el número de aplicaciones de cobre realizadas en función del estado fenológico de los árboles tiene el mismo efecto en el control de la enfermedad que aplicaciones continuadas durante todo el período vegetativo. Sin embargo, para la racionalización de los tratamientos es necesario el conocimiento de la biología infecciosa de la bacteria y de la epidemiología de la enfermedad. *X. arboricola* pv. *juglandis* sobrevive de un año a otro en yemas y lesiones de brotes y las yemas vegetativas y de flor sirven de reservorio de inóculo que infectará hojas y frutos. Por tanto, establecer la dinámica poblacional de la bacteria en las yemas durante el invierno y en prefloración nos permitirá conocer el inóculo potencial de la plantación y estimar los daños que se producirán en la fase productiva del cultivo. En este trabajo se presenta la dinámica poblacional del inóculo en yemas, hojas y frutos a lo largo de un año (2006) en una finca de nogal de Tarragona y se relaciona con parámetros ambientales y los niveles de enfermedad observados en hojas y frutos en primavera y verano. Por otra parte, se realizaron ensayos de laboratorio y en condiciones de ambiente controlado para determinar el efecto de la temperatura en la multiplicación *in vitro* de la bacteria y en la infección en plantas y frutos inmaduros de nogal. La temperatura óptima para el crecimiento de la bacteria y el desarrollo de infecciones se estableció en 26-27 °C. Además, se estudió la sensibilidad del huésped a la enfermedad en función de su estado fenológico. Se evaluó la sensibilidad de frutos de las variedades Vina y Chandler recolectados de árboles en plantación en los estadios de desarrollo GF, GF+15, GF+30, GF+45 y GF+60 y se observó que la máxima sensibilidad de los frutos a la infección por la bacteria se produce en los estadios iniciales del desarrollo (GF y GF+15), a partir de GF+30 la sensibilidad de los frutos es menor y se mantienen valores de severidad similares hasta que los frutos son maduros y el endocarpo se ha lignificado (GF+60). La sensibilidad de las hojas de nogal de diferentes edades se determinó en plantas de nogal en contenedor de 2-3 años de la variedad Chandler. Las plantas habían sido forzadas a brotar 1 mes antes de las inoculaciones y presentaban brotes con hojas en distintos estadios de desarrollo (viejas o adultas y jóvenes). Las hojas jóvenes se mostraron significativamente más sensibles a la infección por la bacteria que las adultas. Los niveles de severidad en las hojas jóvenes oscilaron entre el 70 y el 80% mientras que en las adultas fueron inferiores al 25%.

El fuego bacteriano en Castilla y León. Detección de un nuevo foco en “La Cepeda” (León)

M
R3

J.L. Palomo

*Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo.61 37080 Salamanca.
E-mail: palgomjo@jcyL.es*

El fuego bacteriano, enfermedad causada por la bacteria *Erwinia amylovora*, es un patógeno de cuarentena incluido en la lista B de la U.E. (organismos nocivos cuya introducción y propagación deben prohibirse en algunas zonas protegidas), que afecta a varias especies de la familia de las rosáceas. España se considera zona protegida frente a esta enfermedad, realizándose controles periódicos en plantas hospedadoras. Para ello se han establecido itinerarios provinciales de prospección en zonas con especies sensibles (frutales, ornamentales, forestales). El primer foco de fuego bacteriano en España se detectó en Guipúzcoa en 1995. En Castilla y León se detectó por primera vez en 1996, en un vivero ornamental de la provincia de Segovia, dentro de una partida de plantas procedentes de Bélgica. Desde 1994 hasta 2006 se han analizado 564 muestras, detectándose casos puntuales en las provincias de Segovia, Burgos, Palencia, Valladolid y León. En todos los casos se han aplicado medidas de erradicación.

En agosto de 2006 se recibieron en el laboratorio unas muestras de peral procedentes de la localidad de Quintana del Castillo (León) con sintomatología típica de fuego bacteriano, que dieron resultado positivo para *Erwinia amylovora*. Como consecuencia de esta detección se inició una investigación para determinar el alcance de la enfermedad, detectándose muestras positivas en los términos municipales de Quintana del Castillo, Villamejil, Villagatón, Riello y Carrocera, en la provincia de León. Se están aplicando las medidas de erradicación contempladas en el R.D. 1201/1999 por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano. La mayor parte de las detecciones se realizaron en plantas de peral con sintomatología clara, pero la bacteria también se encontró en muestras de manzano con síntomas poco claros. No se ha detectado en las muestras de *Sorbus* y *Cotoneaster* recibidas.

La metodología de análisis empleada se basa en el protocolo de la OEPP para muestras sintomáticas. Como prueba inicial se realizó un aislamiento en medios de cultivo (CCT y Levano). Para ello se seleccionaron muestras con síntomas (tallos, brotes, frutos, hojas, etc.) tomando una porción del borde de ataque en condiciones estériles. Se depositaron en bolsas de plástico añadiendo 3 ml de tampón de extracción, dejándolas en maceración 15 minutos. Se machacaron parcialmente, recogiendo 2 ml del extracto. Se sembraron 20 µl del extracto y sus diluciones en medio CCT y Levano. Las placas se incubaron durante 3-5 días seleccionándose las colonias tipo levano en ambos medios. Paralelamente y como prueba complementaria se realizó PCR con el protocolo de Bereswill *et al.* (1992) y el protocolo de extracción de Llop *et al.* (1999). Para la identificación de los aislados se utilizó una técnica serológica (inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales, Loewe) y una técnica molecular (PCR con el protocolo de Bereswill *et al.* con una extracción rápida a 100°C en NaOH), y de forma complementaria una identificación bioquímica. La confirmación del poder patógeno se efectuó mediante inoculación de peras inmaduras.

Microorganismos fitopatógenos presentes en semilla de alubia de León

M.P. Campelo¹, B. Reinoso² y A.J. González³

¹Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales, Fundación Chicarro-Canseco-Banciella, E.S.T.Ingeniería Agraria, Universidad de León.

²Departamento de Ingeniería Agraria, E.S.T.Ingeniería Agraria, Universidad de León.

³Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Gobierno del Principado de Asturias.

⁽¹⁾E-mail: piedad.campelo@gmail.com

La alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo tradicional en los regadíos de la provincia de León reconocido mediante la Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) “Alubia de La Bañeza-León”, que protege cuatro de las variedades locales más apreciadas: Riñón-menudo, Canela, Pinta y Plancheta. El cultivo en esta región se ve afectado por numerosas enfermedades de etiología fúngica, bacteriana y vírica cuya transmisión por semilla ha sido descrita. En el Laboratorio de Diagnóstico se ha llevado a cabo un trabajo de detección de los principales patógenos presentes en los 19 lotes de siembra de la mencionada I.G.P. para las campañas 2004 (ocho lotes), 2005 (cuatro lotes) y 2006 (siete lotes). El inventario de la microbiota presente se realizó, para cada lote, sembrando 100 semillas sin desinfectar en medio agar de patata glucosado (PDA), incubando en bancada (18-25°C) durante 15 días y haciendo recuento de semillas afectadas, colonias y géneros presentes a los seis días y al final de ensayo. El análisis de bacterias se llevó a cabo mediante el método de remojo en solución salina empleando medio kilogramo de semillas por lote y utilizando el medio King-B tanto para el recuento de colonias tras la incubación (48 horas, 25°C) como para su aislamiento. En el caso de los virus se valoró, sobre muestras de 100 semillas por lote, la incidencia de *Potyvirus* mediante ELISA-Indirecto con anticuerpos monoclonales. En el análisis de hongos se detectó una contaminación superior al 30% en todos los lotes y se obtuvieron un total de 1847 colonias, pertenecientes a 14 géneros: *Penicillium* (42%), *Rhizopus* (17%), *Aspergillus* (10%), *Cladosporium* (8%), *Alternaria* (7%), *Botrytis* (5%), *Fusarium* (3%), *Trichoderma* (2%), *Mucor* (1%), *Sclerotinia* (<1%), *Ulocladium* (<1%), *Trichothecium* (<1%), *Chaetomium* (<1%) y *Stemphylium* (<1%), algunos de los cuales incluyen especies citadas como patógenos severos en este cultivo. Por lo que respecta a bacterias, se obtuvieron un total de 78 aislamientos; de ellos, sólo siete emiten fluorescencia bajo luz ultravioleta (366 nm) y son oxidativos, mostrando perfil LOPAT coincidente con *Pseudomonas syringae* tres de estos (dos en un lote de la variedad Canela y el otro en uno de Riñón-menudo). En cuanto a la infección por *Potyvirus* cabe destacar que en ninguna de las 600 alubias de Riñón-menudo analizadas se detectó la presencia de *Potyvirus*, detectándose infección viral en el resto de los lotes y observándose mayor incidencia en los siete de la variedad Pinta (22%) que en los de las otras dos variedades: cinco de Canela (13%) y uno de Planchada (2%). Este trabajo se continuará completando la identificación de los aislamientos obtenidos y estudiando el poder patógeno de los mismos. Su utilidad será importante para seguir desarrollando un programa de saneamiento de alubia cuyo objetivo final es poner a disposición de los agricultores semilla con garantía sanitaria.

ECOLOGÍA E INTERACCIONES MICROBIANAS

Aislamiento y análisis funcional del gen *Thcut1* que codifica una cutinasa en *Trichoderma harzianum* T34

M
E1

M.B. Rubio¹, R.E. Cardoza², M.R. Hermosa¹, S. Gutiérrez² y E. Monte¹

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

²Area de Microbiología, Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud, Universidad de León.
E-mail: emv@usal.es

Trichoderma spp. es un hongo filamentoso de gran importancia económica, ya que actúa como agente de biocontrol inhibiendo el crecimiento o destruyendo hongos fitopatógenos que pueden atacar a una gran variedad de cultivos (Monte, 2001). Diferentes especies de este género producen una batería de enzimas extracelulares involucradas en el antagonismo de hongos patógenos de plantas. El sistema de quitinasas, mutanasas, laminarinasas y proteasas juega un papel importante en el micoparasitismo de *Trichoderma* spp., por ejemplo en la degradación de paredes celulares de hongos (Sanz et al., 2004; Suárez et al., 2005). Además, *Trichoderma* spp. secreta enzimas, como celulasas, xilanasas o pectinasas, capaces de degradar la materia orgánica vegetal. En el proyecto *TrichoEST*, sobre genómica funcional de *Trichoderma*, y con objeto de identificar genes y productos génicos de este hongo, se generó una colección de ESTs a partir de diferentes especies de *Trichoderma* cultivadas en condiciones que simulaban procesos de biocontrol (Vizcaíno et al., 2006). Se seleccionó la EST 2104 debido a su alto grado de similitud con secuencias de genes relacionados con cutinasas depositadas en bases de datos. La cutina es el principal componente de la cutícula de la planta, capa epidérmica protectora compuesta de ácidos grasos esterificados, que sólo está presente en las partes aéreas. Los monómeros de cutina y sus productos catabólicos pueden actuar como moléculas señalizadoras de reacciones de defensa de la planta. A su vez, la mayoría de los estudios de cutinasas fúngicas se dirigen a conocer su papel en los procesos patogénicos. Este no es el caso de *Trichoderma* spp. ya que se trata de un hongo que establece interacciones avirulentas con la planta. Se llevó a cabo el aislamiento del gen *Thcut1* que codifica una cutinasa de la cepa *T. harzianum* T34 (CECT 2413). Se analizaron los perfiles de expresión del gen y los niveles de actividad del enzima en la cepa T34, bajo diferentes condiciones de cultivo. El análisis funcional de *Thcut1* se realizó por expresión de este gen en la levadura *Pichia pastoris*. Este tipo de enzimas puede desempeñar un papel importante en las rutas de señalización durante la interacción *Trichoderma*-planta, a la vez que puede aumentar la eficacia de procesos industriales de degradación de material vegetal al facilitar a otros enzimas hidrolíticos su acceso a distintos polímeros estructurales de la planta.

Monte 2001. *Int. Microbiol.* 4:1-4

Sanz et al. 2004. *Curr. Genet.* 46: 277-286

Suárez et al. 2005. *Fungal Genet. Biol.* 42: 924-934

Vizcaíno et al. 2006. *BMC Genomics* 7:193

Análisis mediante arrays del transcriptoma de *Trichoderma harzianum* T34 en la interacción con plantas de olivo

R. Suárez¹, M.R. Hermosa¹, M. Rey², R.M. Jiménez-Díaz³ y E. Monte¹

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

²Newbiotechnic S.A. (NBT, Sevilla).

³Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, e Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

E-mail: rhp@usal.es

Las cepas del género *Trichoderma* se vienen utilizando con éxito en el control biológico de hongos fitopatógenos en ambiente natural (Monte, 2001). Las especies de *Trichoderma* han atraído el interés de fitopatólogos y microbiólogos por su capacidad antagonista contra diversos agentes fitopatógenos a través del micoparasitismo, la antibiosis y la competición por nutrientes o *loci* de infección en el nicho rizosférico. Además de la actividad como antagonistas microbianos, en los últimos años se ha descrito la capacidad de *Trichoderma* spp. para interactuar de manera íntima con las plantas, dando lugar a la estimulación del crecimiento de éstas y a la inducción en ellas de respuestas de resistencia sistémica como consecuencia de interacciones fisiológicas entre hongo y planta. Este proceso implica una invasión de la epidermis radical de la plantas por las hifas de *Trichoderma* spp. En el año 2001, se inició el proyecto de genómica funcional *TrichoEST* con el objeto de identificar genes y productos génicos de *Trichoderma* spp., con valor biotecnológico (Rey y col., 2004). Se generó una colección de ESTs, producidas en condiciones que simulaban procesos de biocontrol como pueden ser el micoparasitismo, la interacción con planta o los estreses nutritivos (Vizcaíno y col., 2006). Se utilizó una aproximación mediante arrays con objeto de estudiar los cambios que ocurrían en el transcriptoma de la cepa *T. harzianum* T34 tras una interacción con una planta de olivo. Por un lado, se utilizaron membranas que contenían, en duplicado, productos de PCR obtenidos a partir de 3000 ESTs únicas de la cepa T34. Por otro lado, *T. harzianum* T34 se cultivó en paralelo, en presencia y en ausencia de una planta de olivo. Los micelios se utilizaron para la extracción del RNA total y, a su vez, éste se empleó para la obtención de las sondas relativas. En el estudio se incluyeron condiciones de interacción de 4, 8 y 24 h, así como, dos variedades de olivo, Picual (susceptible a *Verticillium dahliae*) y Frantoio (resistente a *V. dahliae*). Las imágenes que se obtuvieron después de hibridar las membranas con las diferentes sondas se analizaron con el programa informático Phoretix Array. Con este programa se retiró el background, se normalizaron las señales y se calculó la media aritmética entre las dos replicas depositadas de cada EST. Posteriormente, se identificó a que ESTs correspondían las señales que se seleccionaron por mostrar una intensidad diferencial cuando se hibridaron con sondas obtenidas de cultivos de T34 en presencia y en ausencia de plantas de olivo. Hubo ESTs que se expresaron diferencialmente en ambas situaciones, como una con alta homología con un gen de trehalosa sintetasa, que se están utilizando en el aislamiento y la caracterización de sus genes relativos.

Monte, 2001. *Int. Microbiol.* 4:1-4

Rey et al. 2004. *Trichoderma* genomics. En *Fungal Genomics* vol 4. Elsevier.

Vizcaíno et al. 2006. *BMC Genomics* 7:193

Señalización intercelular en *Pseudomonas putida* KT2440

R. Fernández-Piñar, M.L. Travieso, M. Espinosa-Urgel

*Departamento de Protección Ambiental. Estación Experimental del Zaidin. CSIC.
Profesor Albareda, 1. Granada-18008*

M
E3

Uno de los temas candentes en microbiología de plantas es el estudio de procesos de señalización intercelular de tipo “quorum sensing”, tanto por su impacto en las asociaciones planta-bacteria como por las posibilidades que ofrece de manipular externamente las interacciones en la rizosfera (la denominada “ingeniería de la rizosfera”). Algunos procesos regulatorios implicados en la persistencia de PGPR en la rizosfera y en la síntesis de metabolitos con actividad de biocontrol están mediados por señales de “quorum sensing”, cuya síntesis ha sido observada en microcolonias asociadas a raíces (Steidle et al., 2001) y en poblaciones epifitas de patógenos vegetales (Quiñones et al., 2005). Además, las plantas exhiben respuestas a este tipo de señales y a su vez pueden producir moléculas que las imitan (Shiner et al., 2005). Por otro lado, hay microorganismos rizosféricos capaces de degradar dichas señales, o de interferir con ellas (el denominado “quorum quenching”). La bacteria *Pseudomonas putida* KT2440, una eficaz colonizadora de la rizosfera de distintas plantas, no parece producir acil-homoserina lactonas (AHL), las moléculas señalizadoras más comunes en bacterias Gram-negativas, ni otras moléculas descritas como autoinductores. Sin embargo, nuestro grupo ha identificado un gen implicado en adhesión a semillas, que hemos denominado *ddcA*, cuyo patrón de expresión es dependiente de la densidad celular. Esta era la primera evidencia de algún mecanismo de comunicación intercelular de tipo “quorum sensing” en KT2440. La naturaleza de la señal, que podría ser de carácter volátil, está siendo analizada actualmente en nuestro laboratorio, y se han identificado genes implicados en su transducción. Entre ellos, cabe destacar un sistema de dos componentes que además modula la movilidad de tipo “swarming”, así como la actividad de la citocromo oxidasa insensible a cianuro (CIO). Esta y otras evidencias sugieren que la detección de la densidad de población está íntimamente relacionada con el estado redox de las células de *P. putida* KT2440. El aminoácido prolina podría participar también, de forma directa o indirecta, en este proceso de señalización.

¿Es necesaria la capacidad de formar biofilms para la colonización de la rizosfera?

E. Barahona, A. Navazo, M. Redondo-Nieto, F. Martínez-Granero, M. Martín y R. Rivilla

*Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. E-mail:
emma_bara@hotmail.com*

La movilidad es uno de los caracteres más importantes para la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas fluorescens*, siendo los mutantes con movilidad restringida muy malos competidores. Además la rizosfera selecciona variantes fenotípicos hipermóviles, que en el caso de las cepas v5, v12 y v35, aisladas de la rizosfera después de inocular con la estirpe F113, son más competitivas que la estirpe original (Martínez-Granero et al. 2006). Por otro lado, a la ocupación por parte de las bacterias del rizoplano se le denomina frecuentemente biofilm. Por biofilm se entiende generalmente una agrupación de bacterias altamente estructurada y sostenida por una matriz producida por la propia bacteria. ¿Son biofilms en sentido estricto las agrupaciones de bacterias en la rizosfera? Trabajos recientes contraponen un estilo de vida planctónico caracterizado por la movilidad con un estilo de vida sésil en forma de biofilm, estando regulada la transición entre ambos estados por los niveles de diGMP cíclico, a su vez controlados por las actividades diguanilato ciclasa (proteínas con dominios GGDEF) y fosfodiesterasa (proteínas con dominios EAL o HD). En este sentido, mutantes incapaces de formar biofilms, presentan niveles bajos de diGMPc y suelen presentar mayor movilidad que la estirpe silvestre. Para comprobar la necesidad de formar biofilms para colonizar efectivamente la rizosfera, hemos utilizado mutantes hipermóviles de *P. fluorescens* F113 como *wspR*⁻, *sadB*⁻ y *gacS*⁻ y los variantes hipermóviles v5, v12 y v35, que además presentaban mayor capacidad de colonización competitiva. Experimentos de formación de biofilms en placas multipocillo, mostraron que el mutante *gacS* formaba biofilms con la misma eficiencia que la cepa F113. Sin embargo, los mutantes *sadB* y *wspR* estaban muy afectados en la formación de biofilms en estas condiciones, tal como había sido descrito para otras pseudomonas. Mediante ensayos de colonización, observamos que la capacidad de colonización del ápice de la raíz era indistinguible entre la estirpe F113 y los dos mutantes (aprox 10⁷ UFC/g) indicando que estos mutantes que no son capaces de formar biofilms no tienen afectada la capacidad de colonizar la raíz. Además, los variantes v5, v12 y v35, que colonizan la rizosfera más eficientemente que la estirpe silvestre, estaban muy afectados en su capacidad de formar biofilms en placas multipocillo, lo que demuestra que la competitividad para la colonización de la rizosfera no requiere la formación de biofilms. Por todos estos resultados proponemos que el término biofilm no es apropiado para denominar a las agrupaciones de bacterias formadas durante la colonización de la rizosfera y consideramos más apropiado denominarlas microcolonias.

Martínez-Granero et al. 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3429-3434.

Análisis comparativo del establecimiento de biofilms de *Pseudomonas putida* sobre superficies abióticas y vegetales

M
E5

F. Yousef, M.L. Travieso, M. Espinosa-Urgel

*Departamento de Protección Ambiental. Estación Experimental del Zaidín. CSIC.
Profesor Albareda, 1. Granada 18008.*

El establecimiento de comunidades multicelulares adheridas a superficies sólidas (biofilms o biopelículas) es una de las estrategias fundamentales de persistencia de las bacterias en el medio ambiente, y a veces causa graves problemas en la industria y en medicina. Sin embargo, la colonización de la superficie de raíces o semillas por bacterias beneficiosas es clave para el éxito de procesos de control biológico y de mejora del crecimiento vegetal. Aunque los procesos de formación de biofilms sobre superficies abióticas están siendo estudiados en detalle, las bases moleculares de la adhesión bacteriana a superficies vegetales son menos conocidas. Nuestro trabajo se ha centrado en la caracterización de determinantes genéticos de la adhesión y colonización de semillas por *Pseudomonas putida* KT2440, una bacteria con actividad PGPR. Se ha analizado el papel de estos genes en el establecimiento de poblaciones rizosféricas, así como su posible implicación en la formación de biofilms sobre superficies abióticas, con el fin de comparar ambos procesos. Hemos aislado y caracterizado 35 mutantes con capacidad reducida de colonizar semillas de maíz. Entre los genes afectados se encuentran genes relacionados con la síntesis o funcionalidad del flagelo, síntesis de LPS y de hemo, la adhesina LapA, y proteínas que podrían estar relacionadas con el mantenimiento del estado redox de la célula bacteriana. Se ha ensayado la capacidad de colonización de la rizosfera de maíz de varios mutantes en competición con la cepa silvestre. En algunos casos, la menor capacidad de adhesión a semillas no se traduce en una menor competitividad en la rizosfera. Sin embargo, varios mutantes son desplazados por la cepa silvestre, lo que indica que algunas funciones necesarias para la adhesión a semillas son también importantes a más largo plazo en la interacción planta-*Pseudomonas*. Estas incluyen, entre otras, la síntesis de LPS, ensamblaje de la citocromo oxidasa cox y LapA. Esta proteína es una adhesina multifuncional implicada también en la formación de biofilms sobre superficies abióticas. Sin embargo, no todos los mutantes afectados en la colonización de superficies vegetales son deficientes en la formación de biofilms. Estos resultados indican la existencia de dos vías diferenciadas para el establecimiento de comunidades sésiles, en función de la superficie a colonizar, aunque algunos elementos son comunes y necesarios para ambos procesos.

Formación de biopelículas por *Agrobacterium* spp. sobre superficies inertes y fragmentos de raíz

A.M. Abarca-Grau, E. Marco-Noales, M.M. López y R. Peñalver

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada, Valencia
E-mail: rpenal@ivia.es

Varias especies de *Agrobacterium* causan tumores en numerosas plantas cultivadas. Las células de esta bacteria colonizan la raíz, y cuando encuentran una herida penetran y se unen a células vegetales dañadas, lo cual constituye el primer paso en el proceso de infección. Además, las células de *Agrobacterium* pueden sintetizar polímeros extracelulares permitiendo la formación de agregados que unen a las bacterias entre sí y con los tejidos de la planta huésped. A estos agregados que constituyen estructuras más o menos complejas se les denomina biopelículas (“biofilms”), las cuales pueden conferir al patógeno ciertas ventajas en la colonización y supervivencia en la rizosfera. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de formar biopelículas de tres especies de *Agrobacterium*: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis*, tanto sobre superficies inertes como sobre la superficie de fragmentos de raíz. Mediante tinción con cristal violeta en placas de microtitulación, se observaron diferencias entre las tres especies en la capacidad de formar biopelículas sobre poliestireno y polipropileno. *A. rhizogenes* no fue capaz de formar biopelícula sobre poliestireno, mientras que fue *A. vitis* la que mostró generalmente valores más altos de adhesión en los dos materiales. La formación de biopelículas sobre cubreobjetos de borosilicato se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y se observó que las tres especies formaron biopelículas, aunque hubo diferencias en la extensión de la mismas y su grado de compactación. Por lo tanto, la capacidad de formar biopelículas sobre las superficies inertes ensayadas estaría influida por el tipo de material y la cepa estudiada. Como primera aproximación al estudio de la formación de biopelículas sobre superficies vivas, se realizaron ensayos “*in vitro*” sobre fragmentos de raíz de tomate. Para ello, se utilizaron cepas de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* marcadas o no con la proteína verde fluorescente (gfp). La presencia de agregados celulares más o menos estructurados sobre la superficie radicular, según las observaciones mediante microscopía confocal y SEM, muestran la formación de biopelículas en las primeras etapas de interacción de la bacteria con tejidos de una planta huésped. Todos estos resultados sugieren que la formación de biopelículas puede estar asociada a la colonización de la rizosfera por *Agrobacterium* spp., pudiendo constituir una estrategia para su supervivencia en la planta.

Tres rutas independientes de señalización regulan negativamente la movilidad de *Pseudomonas fluorescens* F113.

A. Navazo, E. Barahona, M. Redondo-Nieto, A. Antequera, J.I. Arcos, F. Martínez-Granero, R. Rivilla y M. Martín

*Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.
E-mail: ana_navazo@hotmail.com*

La movilidad es uno de los factores que más afectan a la capacidad de colonizar competitivamente la rizosfera, siendo los mutantes inmóviles o con movilidad restringida muy malos competidores. Igualmente, la rizosfera selecciona variantes fenotípicas que presentan mayor movilidad que la cepa inoculada y que en ocasiones son mejores competidoras que ésta. Una característica común a estos variantes más móviles, es la presencia de mutaciones en el sistema de dos componentes GacA/GacS, que en respuesta a señales ambientales regula buena parte del metabolismo secundario de esta bacteria. Mediante mutagénesis por inserción en los genes *gacA* y *gacS* hemos demostrado que el sistema Gac efectivamente reprime la movilidad de *P. fluorescens*. Además, esta regulación se lleva a cabo a través de las proteínas RsmA y RsmE, y afecta a la expresión de *fleQ*, que codifica el regulador principal de la síntesis del filamento flagelar. Sin embargo, muchos de los variantes hipermóviles seleccionados en la rizosfera, en especial aquellos más competitivos, presentan mutaciones adicionales que incrementan la movilidad. Para identificar que genes podrían estar afectados en estos variantes, hemos mutagenizado *P. fluorescens* F113 con transposones derivados de *Tn5* que contienen orígenes de replicación de *E. coli*, por lo que permiten rescatar en forma de plásmido la región adyacente a la inserción del transposón. El análisis de 3000 inserciones, nos ha permitido identificar genes que codifican represores de la movilidad en esta bacteria. Entre los genes identificados destacan: *kinB* (que codifica el sensor de un sistema de dos componentes), *sadB* (que codifica una proteína con dominios sensores y efectores y ha sido relacionada con la formación de biofilms y la movilidad tipo swarming) y *wspR* (que codifica una proteína con un dominio CheY y otro dominio GGDEF y que es esencial para la formación de biofilms). El análisis de estos mutantes y de mutantes dobles y triples, nos ha permitido demostrar que la mutación en *gacS* es epistática sobre la mutación en *kinB*, por lo que ambos genes se encuentran en una misma ruta de señalización. Por el contrario, las mutaciones en *sadB*, *wspR* y *gacS* son aditivas, lo que implica que cada uno de estos genes participa en una ruta de señalización que de forma independiente reprime la movilidad de *P. fluorescens*. Es destacable, que el fenotipo del triple mutante es igual al fenotipo de los variantes fenotípicos aislados de la rizosfera que presentaron mayor movilidad y mayor capacidad de colonización competitiva.

DIVERSIDAD

Diferenciación de varias especies de la familia *Cryphonectriaceae* (Diaporthales) mediante RAPD

G. González-Varela y A. J. González

Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).

E-mail: ggonzalez@serida.org

En los últimos años ha aumentado el número de técnicas moleculares empleadas tanto en la identificación inter-especie de hongos fitopatógenos, como en la diferenciación intra-especie. Estas técnicas ofrecen resultados fiables y, generalmente, más rápidos que las pruebas basadas en las características morfológicas, y pueden constituir un apoyo a las técnicas clásicas de identificación. La técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste en la amplificación aleatoria de secuencias de ADN polimórficas de las que se desconoce su función; el perfil de bandas resultante se utiliza como base para la tipificación de las cepas y constituye un RAPD-tipo. En nuestro laboratorio esta técnica ha sido optimizada y aplicada con éxito para caracterizar y tipificar especies de bacterias fitopatógenas. El objetivo de este trabajo se centró en evaluar la utilidad de la técnica RAPD como marcador genético de varios géneros y especies pertenecientes a la familia *Cryphonectriaceae*. Se seleccionaron ocho aislamientos asturianos de *Cryphonectria parasitica* (LPPA-229, LPPA-228, LPPA-206, LPPA-205, LPPA-265, LPPA-217, LPPA-159, LPPA-160), cinco cepas de colección de *C. parasitica* (CBS-114.13, ATCC-52571, CCP-19, CCP-47, CCP-42), una cepa de *Cryphonectria cubensis* (CBS-101281, actualmente *Chrysosporthe cubensis*), *Cryphonectria nitschkei* (CBS-109776), *Cryphonectria radicalis* (CBS-112917), *Cryphonectria macrospora* (CBS-109764), *Cryphonectria havanensis* (CBS-505.83, actualmente *Chrysosporthe cubensis*) y *Cryphonectria gyrosa* (IMI-281618). En trabajos anteriores se habían ensayado con cepas asturianas de *C. parasitica* trece iniciadores de los cuales, cuatro nos habían dado RAPD-tipos idénticos para todas las cepas ensayadas, lo que nos hizo suponer que podrían ser marcadores de especie de *C. parasitica*. Dos de ellos, Inic-7 e Inic-13, se han usado en este trabajo. Con el Inic-13 se han obtenido cinco RAPD-tipos distintos. El R-A1 agrupa los aislamientos de *C. parasitica* de origen europeo y a la especie *C. gyrosa*. El R-A2 agrupa a los aislamientos de origen americano de *C. parasitica*. El R-A3 agrupa las cepas *C. cubensis* y *C. havanensis*, circunstancia que coincide con que estas dos cepas en la actualidad se corresponden con la especie *Chr. cubensis*. El R-A4 agrupa a las cepas de *C. nitschkei* y *C. macrospora*. El R-A5 se corresponde con la cepa de *C. radicalis*. Con el Inic-7 se han obtenido otros cinco RAPD-tipos. El R-B1 agrupa a todas las cepas de *C. parasitica* ensayadas además de la cepa de *C. gyrosa*. El R-B2 agrupa a las cepas de *C. nitschkei* y *C. macrospora*. El R-B3 coincide con la cepa de *C. cubensis*, el R-B4 con la de *C. havanensis* y el R-B5 con la de *C. radicalis*. Los tipos R-B3 y R-B4 son muy similares diferenciándose sólo en una banda. Por tanto la técnica RAPD ha sido útil para diferenciar especies de la familia *Cryphonectriaceae* y ha permitido agrupar cepas de distintos orígenes.

Análisis genético global de plásmidos de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Isabel Pérez-Martínez¹; Youfu Zhao²; Jesús Murillo³; George W. Sundin⁴ y Cayo Ramos¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071 Málaga.

²Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, IL 61801, EEUU;

³Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona;

⁴Department of Plant Pathology, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, EEUU.

E-mail: crr@uma.es

Los aislados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Psv*), agente causal de la tuberculosis del olivo, portan entre 2 y 7 plásmidos nativos pertenecientes a la familia de pPT23A (*PFPS*), caracterizada por la presencia del gen de la replicasa *repA*. Se ha demostrado la implicación en patogénesis, virulencia y supervivencia en la planta huésped de algunos de los *PFPS* encontrados en otros patovares de *P. syringae*. Además de la existencia en algunos de los plásmidos de *Psv* del gen *avrB2*, que determina un efector del sistema de secreción tipo III (TTSS), y de genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas (ácido indol-3-acético y citoquininas), no se ha descrito hasta la fecha la presencia en los mismos de otros genes implicados en la virulencia de estas cepas. Con el objetivo de analizar de una forma rápida y global el contenido génico de los plásmidos de *Psv*, se diseñó un macroarray que contenía 134 fragmentos de ADN pertenecientes a genes codificados en diversos *PFPS*. Para ello se aislaron 33 plásmidos, 24 *PFPS* y 9 no *PFPS* (*nPFPS*), procedentes de 10 cepas de *Psv* y se hibridaron con este macroarray. El análisis de las hibridaciones reveló la existencia, entre otros, de genes pertenecientes al sistema de secreción tipo IVA (T4SS) en ambos tipos de plásmidos; sin embargo, genes relacionados con el sistema tipo IVB solo se encontraron en *PFPS*. La mayoría de los plásmidos hibridaron con genes codificadores de efectores putativos del TTSS o factores de virulencia descritos en *P. syringae*. Además, todos los plásmidos hibridaron con uno o más genes codificadores de transposasas pertenecientes a secuencias de inserción. Estos resultados sugieren que los plásmidos *nPFPS* también contribuyen a la virulencia y supervivencia *in planta* de *Psv*. El contenido génico de estos plásmidos, su información repetida, reordenamientos en mosaico y secuencias de inserción, sugiere un posible papel de los mismos en la adaptación de las cepas de *Psv* a diversas condiciones ambientales. En la actualidad, estamos llevando a cabo la curación de todos los plásmidos presentes en la cepa de referencia *Psv48* (NCPPB-3335). Para ello, estamos utilizando la siguiente estrategia: i) transposición de un mini-Tn5-Km que confiere sensibilidad a sacarosa mediante la acción del gen *sacB*, ii) selección de transconjugantes Km^R, y iii) selección de la pérdida del plásmido marcado en medio con sacarosa. Los perfiles de plásmidos de las cepas derivadas revelaron que *Psv48* contiene tres plásmidos, uno de aproximadamente 73 kb (*pPsv48A*) y otros dos, prácticamente indistinguibles por su migración en gel de agarosa, de alrededor de 40 Kb. La ausencia de *pPsv48A* (cepa *Psv48DA*) tiene como consecuencia una alteración en el tamaño y morfología de los tumores formados en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. En la actualidad, estamos llevando a cabo la secuenciación de este plásmido.

Análisis de la diversidad genética de cepas de *P. syringae* pv. phaseolicola y su correlación con la evolución del complemento de genes de virulencia

M.E. Führer¹, L. Navarro de la Fuente¹, L. Rivas¹, R. Garcidueñas-Piña², J.L. Hernández-Flores², A. Álvarez-Morales² y J. Murillo¹

¹Dpto. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, España.

²Cinvestav, IPN Unidad Irapuato, Dpto. Ingeniería Genética, Irapuato, 36500 Méjico
E-mail: jesus@unavarra.es

Pseudomonas syringae pv. phaseolicola (Pph) es un patógeno de importancia económica en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y, desde hace años, un modelo de investigación en fitobacteriología. La patogenicidad de Pph se debe a la posesión de un sistema de secreción de tipo III que inyecta diversas proteínas, conocidas como efectores, al interior de la célula vegetal, donde inactivan los sistemas de defensa de la planta. El análisis del genoma de la cepa 1448A de Pph ha permitido identificar 19 genes de efectores, de los cuales siete se agrupan en una isla de patogenicidad plasmídica, que es esencial para la producción de enfermedad en judía y soja. Además, las cepas de Pph producen la fitotoxina faseolotoxina, que podría aumentar la agresividad del patógeno *in planta*, y cuyos genes de biosíntesis se agrupan en una isla de patogenicidad cromosómica. El análisis de diversas poblaciones de Pph ha puesto de manifiesto, sin embargo, una importante variación en el complemento de genes de virulencia, tanto en número como en organización. Por ejemplo, nuestro grupo ha descrito la existencia de cepas de Pph que no poseen la isla de patogenicidad de biosíntesis de faseolotoxina. Con el propósito de estudiar la evolución de los genes de virulencia en Pph, nos hemos planteado en primer lugar la construcción de una genealogía de las diferentes líneas genéticas de Pph. Para realizar los análisis, hemos elegido 32 cepas de Pph que nos han parecido representativas de la variabilidad en este patovar, bien por su huésped de aislamiento como por sus características bioquímicas o genéticas. Igualmente, se han analizado tres cepas de *P. syringae* pv. *glycinea* elegidas arbitrariamente, ya que es un patovar filogenéticamente muy próximo a Pph. La variabilidad genética se evaluó mediante análisis de los patrones de hibridación con el operón *rrn* (ribotipado) y con cuatro elementos de inserción, utilizando dos enzimas de restricción diferentes; igualmente, se analizó el perfil de macrorrestricción por electroforesis con campos pulsados (PFGE) de una selección de estas cepas. El ribotipado dio lugar a 16 bandas polimórficas, mientras que la hibridación con elementos de inserción reveló entre 19 y 42 bandas polimórficas, con un total de 229 bandas polimórficas. A partir de los patrones de bandas se construyeron dendrogramas de distancia utilizando diversos índices y los algoritmos Neighbor Joining y UPGMA, con los programas NTSYSpc y FreeTree. En todos los análisis realizados se distinguieron tres grupos bien definidos de cepas de Pph, y un grupo con las cepas de Pgy. Los dendrogramas resultantes fueron en todos los casos muy similares, difiriendo únicamente en la posición relativa de dos de los grupos de Pph. Para dotar a estos dendrogramas de significado filogenético, y determinar el orden de ramificación, se evaluó la existencia de indels específicos mediante PCR, en todas las cepas analizadas. Sólo los dendrogramas generados con el índice de Jaccard por UPGMA fueron compatibles con la presencia o ausencia de estos marcadores, e indican que las dos islas de patogenicidad descritas en Pph han sido adquiridas recientemente en la evolución.

Utilidad del IS53 para estudios de variabilidad genética y tipificación molecular de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

J.M. Quesada¹, I. Pérez-Martínez², C. Ramos², M.M. López¹ y R. Peñalver¹

¹*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Moncada, Valencia.*

²*Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.
E-mail: rpenal@ivia.es*

La variabilidad genética y la tipificación molecular de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), causante de la tuberculosis del olivo, han sido escasamente abordados hasta la fecha, pese a la importancia de los marcadores moleculares en la realización de estudios epidemiológicos. Los trabajos de variabilidad basados en elementos de inserción (ISs) pueden ser de gran utilidad en la tipificación molecular de bacterias, si se dispone de información sobre la ubicuidad y estabilidad de los ISs empleados. El elemento IS53 fue inicialmente identificado en el plásmido pIAA2, portador de los genes de la síntesis del ácido indol-3-acético, en una cepa de *P. savastanoi* aislada de adelfa. Para evaluar la utilidad del IS53 en estudios de tipificación molecular de aislados de olivo de Psv se analizó la presencia de este IS en una colección mundial de 62 aislados (44 de 16 provincias españolas) mediante hibridación de su ADN genómico con una sonda específica del IS53. También se estudió si el IS53 se localizaba en los plásmidos de 6 aislados de Psv mediante hibridación de su ADN cromosómico y plasmídico con la sondas IS53 y una sonda específica de la familia de plásmidos del pPT23 (*repA*). Además, se analizó la estabilidad *in vitro* del IS53 en 5 aislados de Psv tras 390 generaciones e *in vivo* en 7 aislados tras inoculación en plantas de olivo.

El IS53 se encontró en todos los aislados de Psv con un número de copias comprendido entre 4 a 10. El IS solo presentó copias en el cromosoma y no en plásmidos en los aislados analizados y no se observó transposición en los aislados de Psv multiplicados *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el grado de polimorfismo en los fragmentos de restricción que contenían IS53 fue muy elevado. La diversidad genética de esta colección mundial de aislados de Psv, basada en 47 patrones (38 específicos de cepa), permitió agrupar todas las cepas en 8 grupos a un nivel de similitud del 60% y en 6 de ellos se encontraron las 44 cepas españolas. La filogenia de las cepas de Psv basada en los patrones del IS53 no está asociada al cultivar de olivo, ni al origen geográfico de los aislados. Debido a su presencia en todas las cepas de Psv ensayadas, a la alta estabilidad y a su alto grado de polimorfismo, la tipificación molecular de Psv mediante el patrón del IS53 es una excelente herramienta para estudios epidemiológicos.

Evaluación de técnicas fenotípicas y genéticas para el análisis de la diversidad de cepas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aisladas de árboles de mango

J.A. Gutiérrez-Barranquero¹, E. Arrebola¹, J. Murillo², A. de Vicente¹ y F.M. Cazorla¹

¹Laboratorio de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. E-mail: jagutierrez@uma.es

²Laboratorio de Patología Vegetal, ETS de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. Pamplona.

El mango es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, perteneciendo al grupo de frutos con mayor producción, llegando a los 25 millones de toneladas al año. En Europa, este cultivo se encuentra localizado principalmente en el área mediterránea y la principal enfermedad que afecta al mango en esta zona, es la Necrosis Apical del Mango producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Durante estudios previos, se han obtenido aislados de esta bacteria fitopatógena en distintas fincas y épocas del año de la principal zona productora, la Axarquía (Málaga), así como de otras zonas de la Costa del Sol, Huelva, Canarias, Italia, Israel y Portugal. En este trabajo se han puesto a punto distintas técnicas tanto fenotípicas como genéticas para poder analizar la diversidad existente entre los aislados.

En una primera fase se han sido seleccionadas 11 cepas aisladas desde tejido infectado de mango junto con tres cepas de referencia. Se han ensayado tres métodos para el estudio de la diversidad fenotípica: Galería Api 50CH para estudiar el patrón en cuanto a la utilización de carbohidratos como única fuente de carbono, la resistencia a cobre y la producción de fitotoxinas (Mangotoxina y siringomicinas).

La diversidad genética de las 14 cepas de *Pseudomonas syringae* seleccionadas ha sido abordada por distintas técnicas como: rep-PCR y PCR-RFLP del DNAr 16 S. Para la técnica de rep-PCR se han ensayado siete tipos diferentes de secuencias repetitivas (ERIC1R-ERIC2, BOXA1R, (GTG)₅, IS50, M13/pUC Forward, M13/pUC Reverse y (CAG)₅). De estas combinaciones de cebadores, BOXA1R y ERIC son los que ofrecen una mayor diversidad entre los aislados. También se lleva a cabo el estudio de los perfiles de plásmidos nativos de las cepas seleccionadas. Existen varios plásmidos descritos, destacando principalmente la frecuente presencia de plásmidos de 62 Kb que presentan homología con secuencias importantes para la supervivencia de la bacteria, como la del operón *copABCD*, que confiere resistencia a cobre, y los genes *ruLAB* que confieren resistencia a luz UV. El análisis de los datos obtenidos nos permitirá realizar un futuro estudio epidemiológico para determinar el origen de los aislados patógenos y su distribución.

Recuperación de poblaciones microbianas de la filosfera para un posterior análisis molecular del gen del rRNA 16S mediante PCR-DGGE

M. Martínez-Alonso, J. Escolano, M. Mallorquí y N. Gaju

Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biociencias. Universidad Autónoma de Barcelona

El estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas es intrínsecamente difícil, puesto que todos los métodos desarrollados hasta la fecha tienen limitaciones. Las técnicas tradicionales cultivo-dependientes permiten detectar menos de un 10% de las poblaciones microbianas presentes en un determinado ambiente natural. La introducción de técnicas moleculares en la ecología microbiana ha permitido la caracterización filogenética de una gran cantidad de microorganismos no cultivables en medios sintéticos. El propósito de esta investigación es el análisis de la diversidad microbiana de la filosfera. Un paso crítico en dicho estudio es la recuperación de las poblaciones microbianas de la superficie de las hojas, ya que, muchas veces, el resultado final suele ser la obtención de una mezcla de células vegetales y microbianas. Cuando esta mezcla se utiliza para la extracción de los ácidos nucleicos totales, y, posteriormente, se lleva a cabo un análisis molecular del gen del rRNA 16S mediante PCR-DGGE, se observa una gran interferencia sobre la señal microbiana como consecuencia del rRNA presente en los ribosomas del cloroplasto vegetal. Para realizar una descripción más fiable de la comunidad microbiana, se ha optimizado el método de recuperación de dichas poblaciones, para minimizar la co-extracción del material vegetal. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los protocolos que implican homogeneización no son convenientes porque con ellos se obtiene un cociente DNA microbiano:DNA vegetal bajo; y por lo tanto, el resultado final es una infravaloración de la diversidad microbiana. Sin embargo, con el uso de la sonicación y la agitación la recuperación de material vegetal junto con las células microbianas es baja, reduciéndose en gran medida la interferencia. Sin embargo, ambos métodos sólo permiten el análisis de microorganismos epífitos, ya que la recuperación de las poblaciones endófitas requiere métodos más drásticos. Otro parámetro esencial para minimizar la interferencia del material vegetal en el estudio de la microbiota de la filosfera mediante PCR-DGGE es la elección de unos cebadores que presenten una baja homología con el rRNA del cloroplasto. Los siguientes cebadores (341F/907RM, 968F/1401R, 63R/518R, 341F/518R) han permitido obtener un buen patrón de bandas de la comunidad microbiana presente en la superficie de las hojas con una mínima interferencia del material vegetal, a la vez que su utilización conjunta proporciona una visión más completa de la biodiversidad existente.

Caracterización de la microbiota presente en suelos modificados por enmiendas orgánicas en el cultivo del aguacate

J
D7

N. Bonilla¹, J.A. Torés², J.M. Hermoso², F.M. Cazorla¹, A. de Vicente¹

¹*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. E-mail: fitomicro@uma.es*

²*Estación Experimental “La Mayora” (CSIC) 29750 Algarrobo Costa, Málaga.*

Las podredumbres radiculares por hongos de suelo constituyen uno de los mayores problemas fitosanitarios en el cultivo del aguacate (*Persea americana Mill.*) En Andalucía, están causadas principalmente por el hongo *Rosellinia necatrix* y por el oomycete *Phytophthora cinnamomi*. Se están desarrollando diversas estrategias para su control, aunque sólo algunas son compatibles con el cultivo ecológico. Entre ellas se encuentra el uso de enmiendas orgánicas, que han sido aplicadas previamente en este y otros cultivos para el control de hongos fitopatógenos con resultados prometedores. Estas enmiendas parecen prevenir la enfermedad mediante su influencia en el equilibrio entre las poblaciones microbianas del suelo y mediante la estimulación de distintas actividades con efecto antifúngico. En este sentido, se está desarrollando un estudio sobre la aplicación de distintos tipos de enmiendas orgánicas en árboles de aguacate, con el objetivo de conocer cómo dichas enmiendas afectan a la microbiota bacteriana y fúngica del suelo y elucidar los posibles modos de acción de su capacidad supresora. Se están llevando a cabo distintos abordajes experimentales que incluyen el estudio de la diversidad de microorganismos cultivables y no cultivables. El análisis de microorganismos cultivables se realiza mediante aislamiento y recuento en placa sobre distintos medios selectivos, caracterizando los aislados más representativos de cada muestra. Un segundo abordaje contempla el uso de varias técnicas independientes de cultivo adecuadas para el estudio de comunidades microbianas de suelo, como ARISA, SSCP o DGGE. Actualmente se ha iniciado el estudio mediante la aplicación de PCR-DGGE, sin descartar el uso de otras técnicas en el futuro. Para esta técnica se lleva a cabo la extracción de ADN del suelo y su amplificación por PCR usando cebadores universales de ADNr 16s y 18s. El producto de PCR se somete a DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) con la que se separan los fragmentos de ADNr correspondientes a los distintos microorganismos, ya sean cultivables o no cultivables, obteniendo un patrón de bandas único para cada tipo de suelo.

La introducción de microorganismos modificados genéticamente diseñados para rizorremediación induce cambios en las bacterias nativas de la rizosfera pero no en las del suelo circundante.

D. Aguirre de Cárcer, M. Martín U. Karlson y R. Rivilla*

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

Para estudiar el impacto ejercido por la introducción de microorganismos modificados genéticamente sobre las poblaciones bacterianas del suelo y la rizosfera en tratamientos de rizorremediación, hemos realizado experimentos de larga duración (168 días) en microcosmos, utilizando un suelo con un historial de contaminación por PCBs. Se construyeron dos tipos de microcosmos, con o sin plantas de *Salix viminalis* que fueron inoculados con dos cepas diferentes de *Pseudomonas fluorescens* modificadas o bien con la cepa silvestre. Se analizaron tanto muestras de suelo como de rizosfera. Las diferencias en la función de las comunidades fueron inferidas analizando sus patrones fisiológicos basados en la utilización de 31 fuentes de carbono ecológicamente relevantes. La estructura genética de las comunidades de *Eubacteria*, α y β -*Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria* fueron analizadas mediante PCR-TGGE. Los resultados muestran que los transgenes introducidos no tuvieron efecto en la función o estructura de las comunidades edáficas. Sin embargo los transgenes influenciaron el desarrollo de comunidades bacterianas estructural y funcionalmente diferentes en la rizosfera. Además, se observaron diferencias estructurales y funcionales entre suelo plantado y sin plantar y entre las muestras de suelo y rizosfera. En el caso de las diferentes estructuras específicas de grupo estudiadas, se observaron diferencias entre grupos debidas a la evolución temporal, efecto rizosférico y cepa bacteriana introducida.

CONTROL BIOLÓGICO

Selección de bacterias con capacidad biocontrol de *Rosellinia necatrix* y determinación de posibles mecanismos de acción

**M.A. González-Sánchez¹, F.M. Cazorla², A. de Vicente²
y R.M. Pérez-Jiménez¹**

¹IFAPA-CICE. Cortijo de la Cruz s/n, 29140, Churriana, Málaga. E-mail:
rosa.perez.jimenez.ext@juntadeandalucia.es

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

El ascomiceto *Rosellinia necatrix* Prill. es el agente causal de la podredumbre blanca radicular, enfermedad limitante del cultivo del aguacate en España. Dentro de los métodos propuestos para el control de esta enfermedad se encuentra el uso de bacterias como agentes de control biológico. En una fase anterior de este trabajo, se aisló a partir de muestras de suelo y raíz de aguacate, una colección de 330 cepas bacterianas, y se caracterizó su antagonismo *in vitro* frente a *R. necatrix*.

Además de la producción de sustancias antifúngicas, se han descrito otros modos de acción en agentes de control bacterianos frente a patógenos fúngicos de suelo. Por este motivo, se realizaron ensayos de biocontrol en plántulas de aguacate donde se evaluaron el total de aislados con actividad antifúngica *in vitro* (26 aislados), más 117 aislados que no mostraron tal actividad. A partir de estos ensayos se han seleccionado 25 aislados bacterianos (12 de ellos antagonistas *in vitro*), que redujeron el desarrollo de la enfermedad más de un 20%. La identificación de los aislados seleccionados, llevada a cabo mediante secuenciación de ADNr 16s y test API 20, mostró que éstos pertenecían a especies del género *Pseudomonas* spp. (14 aislados), *Bacillus* spp. (10 aislados) y *Enterobacter* sp. (1 aislado).

Adicionalmente, se está caracterizando los distintos mecanismos de acción que puedan estar implicados en la actividad biocontrol de los aislados seleccionados: producción de actividades antagonistas (antibióticos, sideróforos, exoenzimas y enzimas hidrolíticas), capacidad de colonización de raíces de aguacate, y promoción del crecimiento de la planta (PGPR).

Interacciones multitróficas en el control biológico de la podredumbre blanca del aguacate.

C. Pliego², S. de Weert³, G.E.M. Lamers³, G. Bloemberg³, S. Kanematsu⁴, F.M. Cazorla⁵, C. Ramos¹.

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

²IFAPA, Centro de Churriana. Málaga.

³Institute of Molecular Plant Sciences, University of Leiden, The Netherlands.

⁴National Institute of Fruit Tree Science, Department of Apple. Morioka, Japón

⁵Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga, Málaga.

El conocimiento sobre las interacciones espacio-temporales establecidas entre bacterias, rizosfera y hongos fitopatógenos resulta esencial para el desarrollo de estrategias novedosas de control biológico de enfermedades vegetales. Aislados bacterianos diferentes colonizan la rizosfera de plantas o el micelio de ciertos hongos de forma variable; sin embargo, hasta la fecha no se han relacionado patrones específicos de colonización con la capacidad de biocontrol de diferentes aislados. En una fase anterior de este proyecto se seleccionaron 2 cepas bacterianas (*Pseudomonas* spp. Avo73 y Avo110) colonizadoras de la raíz de aguacate y antagonistas *in vitro* frente al agente causal de la podredumbre blanca del aguacate, *Rosellinia necatrix*. A pesar del mayor número de propiedades antagonistas mostradas por Avo73, esta cepa no es capaz de inhibir el crecimiento del hongo *in vivo*; por el contrario, Avo110 reduce el desarrollo de la enfermedad en un 20%. El patrón de colonización de la rizosfera de aguacate y de las hifas de *R. necatrix* se analizó para ambos aislados mediante microscopía láser confocal (MLC) utilizando derivados marcados con la proteína verde fluorescente (Gfp) o con una versión derivada de ésta que emite fluorescencia azul (Bfp). Avo110 coloniza eficientemente las uniones entre células epidérmicas de la raíz y las hifas del patógeno, sin embargo, Avo73 se encontró fundamentalmente asociada a pelos radiculares y en unión débil con *Rosellinia*. La interacción de ambas cepas con *R. Necatrix* se ha analizado además en ensayos de co-inoculación *in vitro*. Avo110 persiste durante al menos una semana en medio mínimo inoculado con *Rosellinia*, por el contrario, la densidad celular de Avo73 disminuye drásticamente en estas condiciones. Ensayos de formación de biopelícula sobre superficies abióticas mostraron que la cobertura de las formadas por Avo110 es superior a las de Avo73. Las diferentes interacciones descritas entre ambas cepas bacterianas con la rizosfera de aguacate y el hongo fitopatógeno podrían reflejar su diferente capacidad de biocontrol de la podredumbre blanca. Con el objetivo de estudiar en detalle el proceso de infección de raíces de aguacate por *R. necatrix*, así como de las interacciones establecidas *in vivo* con agentes bacterianos de biocontrol, hemos construido recientemente derivados de varias cepas de *R. necatrix* que expresan la Gfp. En el futuro, utilizaremos MLC para el seguimiento *in vivo* de ambos procesos.

Genes implicados en la producción de antibiótico en *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 y su papel en biocontrol

J
C3

R. Martín-Pérez, J.C. Codina, A. de Vicente y F.M. Cazorla.

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga; E-mail: fitomicro@uma.es

La rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* PCL 1606 ha sido aislada en estudios previos por su elevada actividad de biocontrol frente a distintos hongos patógenos de suelo, especialmente frente a *Rosellinia necatrix* en aguacate. La actividad antagonista de esta cepa parece estar directamente relacionada con la producción del antibiótico 2-hexyl,5-propylresorcinol (HPR). En este trabajo se profundizará en el estudio de los genes implicados en la producción del HPR y su posible papel en la actividad de biocontrol. Para ello, se ha llevado a cabo la construcción de mutantes defectivos en la actividad antagonista de la cepa *P. fluorescens* PCL 1606 mediante dos estrategias de mutagénesis, al azar y dirigida. Para la mutagénesis al azar sobre el genoma de *P. fluorescens* PCL 1606 se empleó el plásmido pRL1063a que contiene un transposón Tn5. Para la mutagénesis dirigida, se actuó sobre genes del operon *dar*, previamente descrito como uno de los responsables en la producción del HPR en otras especies bacterianas, y presente al menos parcialmente en *P. fluorescens* PCL1606. Los resultados de la mutagénesis al azar indican la implicación de genes que codifican para putativas metil-transferasas, aril sulfatasas o genes reguladores con alta identidad con GacA y GacS. Por otro lado, los resultados obtenidos hasta el momento sólo muestran la presencia del gen *darB* en la cepa *P. fluorescens* PCL 1606, por lo que la estrategia de mutagénesis dirigida se llevó a cabo sobre este gen. Las cepas derivadas de este proceso de mutagénesis dirigida mostraron una reducción parcial de la actividad antagonista. En la actualidad, se está llevando a cabo el rastreo de una genoteca de ADN genómico de *P. fluorescens* PCL1606, con objeto de estudiar la organización de los genes *dar* y posteriormente llevar a cabo experimentos de complementación. Para ello, en todos los mutantes y en los complementantes que se obtengan, se estudiará la capacidad de producción del HPR, así como la actividad de biocontrol empleando los sistemas experimentales aguacate/*Rosellinia* y tomate/*Fusarium*.

Bioprotección de frutas y vegetales frescos frente a patógenos relacionados con intoxicaciones alimentarias mediante bacterias del ácido láctico.

R. Trias¹, E. Badosa¹, L. Bañeras², E. Montesinos¹

¹ Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071. Girona. E-mail: rtrias@intea.udg.es

² Instituto de Ecología Acuática. Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071. Girona.

La incidencia de toxiinfecciones alimentarias debidas al consumo de productos vegetales frescos contaminados por bacterias patógenas ha aumentado considerablemente en los últimos años. Estas toxiinfecciones se relacionan principalmente con los patógenos *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* y pueden estar causadas por contaminaciones debidas a ciertas prácticas agrícolas o a una manipulación o procesado inadecuado de estos productos. El objetivo de este trabajo es la selección de cepas de Bacterias del Ácido Láctico con capacidad bioprotectora de frutas y vegetales frescos. Se aislaron 496 bacterias lácticas de productos vegetales frescos y se determinó la capacidad de inhibición *in vitro* contra bacterias y hongos fitopatógenos (*Erwinia carotovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Monilinia laxa*) y patógenos humanos relacionados con toxiinfecciones alimentarias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*). Los resultados de éste ensayo permitieron la selección de 23 cepas con potencial antagonista para estudios posteriores, que fueron identificadas genéticamente y caracterizadas en base a sus características fisiológicas. La identificación mostró que la mayoría de las cepas antagonistas pertenecían a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, y en menor grado a *Weissella*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Se determinó la capacidad de crecimiento de las bacterias lácticas y los patógenos en dos modelos vegetales: Lechuga Iceberg y Manzana Golden así como su efecto en el aspecto general del producto. Finalmente se seleccionaron 6 cepas y se determinó la capacidad de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *E. coli* en los mismos modelos. Se comprobó que la aplicación de bacterias lácticas inhibía completamente *Listeria monocytogenes*, reduciendo el número de viables por debajo de los límites de detección. Los niveles de *Salmonella typhimurium* fueron reducidos 10-100 veces, y el crecimiento de *E. coli* no pudo ser inhibido. La eficacia de la bioprotección de frutas y vegetales frescos frente a *Listeria monocytogenes* fue probada con ensayos dosis-respuesta. Los resultados obtenidos permiten considerar a las bacterias del ácido láctico como a buenos agentes de bioprotección de frutas y hortalizas frescas.

Papel de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en la capacidad de biocontrol de enfermedades bacterianas de filosfera de cucurbitáceas

J
C5

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

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

Las cucurbitáceas son un cultivo de gran importancia en España. Estos cultivos están sometidos a diversas enfermedades que pueden causar importantes mermas de la producción. La mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y la podredumbre blanda por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* son unas de las principales enfermedades de etiología bacteriana que afectan a estos cultivos en España. El control químico, mediante el empleo de compuestos a base de cobre, es la principal estrategia de control de las bacteriosis. En consecuencia, el desarrollo de resistencia por parte de muchos patógenos bacterianos a estos compuestos ha favorecido el desarrollo del control biológico como una de las estrategias alternativas más interesantes. En nuestro laboratorio se han seleccionado cuatro cepas de *B. subtilis* por su capacidad antagonista frente a un amplio rango de patógenos fúngicos y bacterianos. Los ensayos de biocontrol realizados *in vitro* sobre hojas de melón mantenidas en el sistema de doble placa, demostraron que estas cepas de *B. subtilis* eran capaces de controlar enfermedades bacterianas como la mancha bacteriana y la podredumbre blanda. La gran capacidad inhibitoria observada para los filtrados libres de células en ensayos *in vitro* contra *X.c. cucurbitae* y *E.c. carotovora* señalaba a la antibiosis como el principal mecanismo de acción empleado por estas cepas. Con el objetivo de corroborar esta hipótesis, nos planteamos identificar los posibles compuestos antibacterianos producidos por estas cepas y analizar su implicación en la capacidad de biocontrol de *B. subtilis*.

El análisis cromatográfico de los sobrenadantes de cultivos bacterianos reveló la presencia de lipopéptidos de las familias de las iturinas, fengicinas y surfactinas, todos ellos compuestos de conocida actividad antimicrobiana. La implicación de estos lipopéptidos en la capacidad de biocontrol se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida, lo que nos permitió generar una colección de mutantes simples incapaces de producir iturina A, bacilomicina o fengicina. En los ensayos de biocontrol usando células lavadas, observamos como los mutantes en iturina A y bacilomicina perdían completamente la actividad supresora de enfermedad, mientras que los mutantes en fengicina retenían cierta capacidad de biocontrol aunque ésta era siempre inferior a la obtenida con las cepas parentales. Estos resultados han permitido confirmar el papel esencial de los lipopeptidos de la familia de las iturinas y fengicinas en la actividad de biocontrol de estas cepas de *B. subtilis*.

Aislamiento de bacterias con características de promoción del crecimiento vegetal en los arrozales de las marismas del Guadalquivir

I. Del Castillo¹, M.S. Domínguez-Sánchez¹, J. Ojeda¹, F. Delgado², F. Montes², R. Espuny⁴, R. Bellogín⁴, T. Cubo⁴, J. Ollero⁴, M.S. Dardanelli¹, M. Aguilar³, M. Megías¹

¹*Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.*

²*Federación de Arroceros de Sevilla*

³*Centro "Las Torres-Tomejil" IFAPA.*

⁴*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.*

Las marismas del río Guadalquivir es una de las zonas de cultivo de arroz más importantes de la Comunidad Europea, tanto por extensión (supone el 8% de la superficie total europea dedicada a este cultivo) como por producción (con una media de 8.500 kg/ha) y calidad del cultivo.

La proximidad que existe entre esta región y el Parque Nacional de Doñana, preocupa a la hora de efectuar prácticas agrícolas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente y condiciona la investigación que se lleva cabo en el sector arrocero. En este sentido, en el año 1.997 se elaboró un Reglamento Específico de Producción Integrada del Arroz según el cual se desarrollaban una serie de normas, fundamentalmente en lo referente a una utilización más adecuada de productos agroquímicos, para promover un cultivo de arroz que respetando el medio ambiente no viera mermada su calidad y su producción.

Hasta el momento las experiencias realizadas se habían enfocado desde un punto de vista agronómico y buscando un aumento de la producción mediante el uso de variedades de arroz más resistentes a los problemas más comunes en la zona. Pero otras alternativas son posibles para afrontar estas dificultades, como el empleo de bacterias que promuevan y protejan el crecimiento del arroz.

En función de estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias de arrozales de las Marismas del Guadalquivir, seleccionando como criterio de aislamiento dos problemas fundamentales para el arroz tales como la concentración salina del agua de riego e incidencia de *Pyricularia* sp., diferenciándose cuatro parcelas en las que se combinaban ambos factores con distintos niveles de influencia de cada uno. Se consiguieron aislar un total de 813 cepas basándonos en las diferencias morfológicas de las colonias obtenidas en muestreos realizados en dos años consecutivos, 2004 y 2005, tanto de bacterias epifíticas de raíz como endofíticas y epifíticas del tallo.

Con el propósito de identificar entre las bacterias obtenidas aquellas con capacidad de promoción del crecimiento vegetal (PGPR) se han realizado pruebas para la caracterización fenotípica y genotípica de los organismos aislados. También se han estudiado aquellas propiedades que podrían ser de mayor utilidad para alcanzar una explotación mas eficiente de los recursos del suelo así como una disminución en el consumo de productos de origen químico, tales como la capacidad que poseen algunos microorganismos de fijar nitrógeno atmosférico, capacidad de solubilizar fosfatos, producción de sideróforos, resistencia a salinidad y biocontrol de la enfermedad causada por *Pyricularia* sp. o *Bipolaris* sp.. Con estos datos se han elaborado tres grupos de bacterias autóctonas de la zona que, en asociación con bacterias con propiedades PGPR conocidas, constituyen lo que se ha denominado *consorcios*, grupos de bacterias dirigidos al control de salinidad, biocontrol de enfermedades propias del arroz como la provocada por el hongo *Pyricularia*, y solubilización de fosfatos. Proyecto AGL2006-13758-C05.

Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia sistémica en melón

J
C7

L. García-Gutiérrez, D. Romero, A. de Vicente, A. Pérez-García

Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. 29071-Málaga.

E-mail: aperez@uma.es

El oídio es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas, no sólo en España sino también en el resto del mundo. Esta enfermedad puede ser causada por dos especies, *Golovinomyces cichoracearum* y *Podosphaera fusca*, siendo esta última el único agente causal de esta enfermedad en la mitad 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 este escenario, el control biológico ha surgido como una estrategia interesante que puede paliar alguna de estas deficiencias y contribuir a mejorar el control que actualmente se realiza de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue el aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia sistémica en melón para su empleo como agentes de control biológico contra el oídio, principalmente en cultivos a campo abierto.

Para realizar este estudio obtuvimos una colección de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. de diferentes orígenes, por ser los principales grupos taxonómicos donde las actividades PGPR e ISR están bien caracterizadas. A partir de esta colección, se seleccionaron las cepas como posibles inductoras de ISR en melón en base a la evaluación de diferentes características relacionadas con la actividad PGPR, como la presencia de actividad antifúngica y antibacteriana mediante ensayos de antagonismo en placa; la formación de biopelículas, relacionado con la capacidad de colonización, y la actividad promotora de crecimiento en ensayos de bacterización de semillas de melón y pepino. Posteriormente, con los resultados obtenidos en todas las pruebas, se calculó el coeficiente de concordancia de Kendall que nos permitió seleccionar dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* UMAF6031 y UMAF8402 y tres cepas *Bacillus subtilis* UMAF6614, UMAF6639 y UMAF8564 como las más favorables para ser incluidas en los experimentos con plántulas. Estas cepas fueron a continuación evaluadas mediante ensayos de bacterización de raíces de plántulas de melón para dos características: i) promoción del crecimiento y ii) inducción de resistencia sistémica frente a oídio de cucurbitáceas. Los resultados obtenidos mostraron como todas las cepas ensayadas inducían un mayor crecimiento de las plantas con respecto a las plantas control sin bacterizar. En los ensayos de inducción de resistencia sistémica, los tratamientos con bacterias de las cepas *P. fluorescens* UMAF6031 y UMAF8402 y *B. subtilis* UMAF6639 provocaron reducciones de la severidad de la enfermedad similares a los observados en plantas tratadas con silicato potásico y las cepas *P. putida* WCS358r y *P. fluorescens* WCS374r previamente caracterizadas como inductoras de ISR en otras plantas. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas *P. fluorescens* UMAF6031 y UMAF8402 y *B. subtilis* UMAF6639 son buenas candidatas para su uso como promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia sistémica en melón.

Incremento de tolerancia al estrés, supervivencia y eficacia mediante osmoadaptación de agentes de biocontrol

J. Cabrefiga, A. Bonaterra, J. Camps, y E. Montesinos

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona.
E-mail: jordic@intea.udg.es*

La aplicación de agentes de biocontrol en la superficie de las plantas puede ser en ocasiones inefectiva, especialmente cuando el tratamiento y la inoculación del patógeno se encuentran separados por un periodo de condiciones ambientales desfavorables. Esto es debido a la rápida disminución de la viabilidad de los agentes de biocontrol introducidos “de novo” en las superficies de las plantas o en los frutos. También, durante el proceso de formulación de los agentes de biocontrol se producen condiciones de estrés térmico y osmótico que disminuyen la supervivencia de las células.

Se ha desarrollado un proceso de osmoaptación de bacterias durante la producción del inóculo que tiene como objetivo incrementar la viabilidad de las células cuando están sometidas a condiciones desfavorables. El método consiste en la combinación del estrés salino con la adición de osmolitos en el medio de cultivo usado para la producción del agente de biocontrol. Se han realizado distintos experimentos con *Pantoea agglomerans* EPS125 agente de biocontrol de enfermedades de poscosecha y con *Pseudomonas fluorescens* EPS62e agente de biocontrol del fuego bacteriano.

En condiciones de estrés osmótico las células acumulan intracelularmente distintos solutos compatibles pero crecen muy lentamente por lo que se obtienen producciones de células muy bajas. La adición de glicina betaina al medio de cultivo salino permite restaurar los parámetros de crecimiento hasta niveles equivalentes a cuando no están sometidas al estrés. Las células osmoadaptadas muestran un incremento significativo en la tolerancia a la desecación y al estrés térmico. Además, la osmoadaptación también incrementa la supervivencia de las células en la superficie de las plantas y la eficiencia en el biocontrol en condiciones de baja humedad relativa.

PATOGENESIS

El perfil patogénico específico de las cepas de raza 5 de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* se debe a la carencia del gen de efectores *avrPphC*

A. Iturbe¹, G. Tsiamis² y J. Murillo¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, Depto. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, España

²Dept. Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, Grecia.
E-mail: jesus@unavarra.es

La mayoría de las bacterias patógenas de plantas poseen un sistema de secreción de tipo III que les permite inyectar un conjunto de proteínas bacterianas al interior de la célula vegetal. Estas proteínas, o efectores, son esenciales para la producción de enfermedad y se piensa que actúan inhibiendo la respuesta de defensa del huésped mediante la interacción específica con proteínas del huésped. A veces, esta interacción da lugar a la inducción de una intensa respuesta de defensa, la respuesta hipersensible (HR), que permite a la planta ser resistente a la enfermedad. Además, se producen interacciones entre efectores que modulan la respuesta de la planta, de manera que un efector puede bloquear la producción de HR por otro efector distinto. La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* es la causante de la grasa de la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), y puede dividirse en nueve razas de acuerdo con su patogenicidad en ocho cultivares diferenciales de judía. Las razas pueden explicarse por la variación en el contenido de cinco genes de efectores, de los cuales se han clonado y caracterizado tres. Uno de ellos, *avrPphF*, que está presente en las razas 1, 5, 7 y 9, es un paradigma de la multiplicidad de fenotipos conferidos por un efector, ya que actúa como un gen de virulencia en algunos cultivares de judía y en soja, mientras que induce resistencia en los cultivares de judía que portan el gen de resistencia *R1*. Igualmente, se sabe que el gen *avrPphC* suprime la HR que causa *avrPphF* en judía cv. Canadian Wonder. Uno de los efectores que quedan por clonar es el gen *A4*, que sería responsable de la capacidad de las cepas de raza 5 para inducir la HR en judías que portan el gen de resistencia *R4*. Nuestras evidencias preliminares indicaban, sin embargo, que el fenotipo *A4* podría deberse a la carencia del gen *avrPphC*. Para evaluar esta hipótesis, se transfirió el clon pDAHR15, que expresa *avrPphC*, a la cepa de Pph HRI27098a (raza 5), y la cepa resultante se inoculó junto con los controles pertinentes en judías cv. A53 y A43, que contienen el gen *R4*, y en cv. Canadian Wonder. La cepa silvestre, HRI2708a, produjo HR en los cv. A53 y A43 y enfermedad en Canadian Wonder, como era esperable, mientras que el clon con pDAHR15 produjo síntomas de enfermedad en los tres cvs. Igualmente, las poblaciones bacterianas de HRI2708[pDAHR15] fueron 2 a 4 órdenes de magnitud mayores que las de la cepa silvestre en plantas *R4*. La identificación del gen responsable de la HR se está abordando actualmente mediante mutagénesis dirigida de diversos genes de efectores. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la aparición de cepas de *Pph* raza 5 se debe a la pérdida del gen *avrPphC*, y no a la adquisición de un nuevo gen de efectores.

Análisis del comportamiento de mutantes en motilidad de *Dickeya dadantii* (ex-*Erwinia chrysanthemi*)

M. Antúñez-Lamas¹, E. Cabrera-Ordoñez¹, E.M. López-Solanilla¹, A. Rodríguez-Moreno², O.E. Trelles-Salazar² y P. Rodríguez-Palenzuela¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Dpto. Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I Agrónomos, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

²Arquitectura de Computadores, Universidad de Málaga. E.T.S. Ingeniería Informática, Campus de Teatinos, 29071 Málaga.

Dickeya dadantii es agente causal de la podredumbre blanda de los vegetales, una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Los principales factores de virulencia que se han identificado hasta la fecha en esta bacteria incluyen enzimas hidrolíticas, sideróforos y sistemas de detoxificación. El objetivo fundamental de este trabajo ha sido evaluar la importancia de los fenómenos de motilidad y quimiotaxis en el proceso de patogénesis de esta bacteria.

En primer lugar, se comprobó la capacidad de *Dickeya dadantii* para realizar “swimming” y “swarming” en placas de agar al 0,3% y 0,7% respectivamente. Posteriormente se identificaron por métodos bioinformáticos diversos genes posiblemente relacionados con el sistema de quimiotaxis (*cheW*, *cheB*, *cheY* and *cheZ*) así como un gen esencial del motor flagelar (*motA*). Los genes correspondientes se amplificaron mediante PCR, se clonaron y se generaron los mutantes mediante “marker-exchange”. Se comprobó que los mutantes tenían un crecimiento normal tanto en medio rico como en medio mínimo, y presentaban una motilidad reducida en placa. Asimismo, se analizó el comportamiento de la bacteria en medio líquido mediante microscopía óptica, comprobándose que las alteraciones de la motilidad de los mutantes (carreras y tumbos) eran congruentes con las observaciones publicadas en otras especies de bacterias. El movimiento bacteriano tanto de los mutantes como de la cepa silvestre fue analizado mediante el software Hobson Tracker que analiza parámetros como linealidad, velocidad, espacio recorrido o ángulo de giro.

También se analizó la quimiotaxis de *D. dadantii* a diferentes compuestos de diversa naturaleza como son la serina, glicerol, fructosa, maltosa, galactosa, manitol, cisteína, glutamina, sacarosa, ácido succínico, glicina, alanina, xilosa, prolina, ácido málico y extracto de endivia, así como la utilización de estos mismos como fuente de carbono. Se realizaron ensayos de virulencia de los mutantes *cheW*, *cheB*, *cheY*, *cheZ* y *motA* en endivia y violeta africana mostrando todos ellos una drástica reducción con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados ponen de manifiesto que los fenómenos de motilidad / quimiotaxis juegan un papel esencial en la virulencia de esta bacteria.

En la actualidad se está procediendo a la caracterización genómica de las proteínas sensoras de *Dickeya dadantii*.

La isla de patogenicidad para la biosíntesis de faseolotoxina ha invadido *Pseudomonas syringae* repetidamente

L. Navarro de la Fuente¹, M.E. Führer¹, K. López², A. Álvarez Morales² y J. Murillo¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, Depto. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, España. E-mail: jesus@unavarra.es

²Depto. Ingeniería Genética, CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato, México.

Pseudomonas syringae pv. phaseolicola es el agente causal de la grasa de la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), que se caracteriza por desarrollar lesiones acuosas rodeadas de un halo clorótico. Este halo se produce por la acción de una fitotoxina extracelular producida por la bacteria denominada faseolotoxina. La faseolotoxina es un tripéptido de ornitina alanina y homoarginina unido a un grupo inorgánico, que inhibe de forma irreversible la enzima ornitina-carbamoiltransferasa (OCTasa), necesaria para la conversión de ornitina a citrulina en la ruta de biosíntesis de arginina. Los genes involucrados en la biosíntesis de faseolotoxina se encuentran en una putativa isla de patogenicidad (Pht-PAI) de aproximadamente 37 kb, la cual contiene el gen *argK*, necesario para la producción de OCTasa resistente a la faseolotoxina. La capacidad de producir esta toxina se ha descrito en *P. syringae* pvs. phaseolicola y actinidiae, y en una única cepa del pv. syringae (CFBP3388), denominadas cepas tox+, mientras que las cepas que carecen de Pht-PAI se conocen como tox-. Las secuencias de nucleótidos de la Pht-PAI de que se dispone, son prácticamente idénticas en cepas del pv. phaseolicola y en la cepa Kw11 del pv. actinidiae, lo cual apoya que la Pht-PAI se ha diseminado en *P. syringae* mediante transferencia horizontal. En nuestro grupo hemos abordado el estudio de la conservación de la Pht-PAI en diferentes cepas de *P. syringae* y de los posibles mecanismos de movilización. Mediante comparación de secuencias, PCR e hibridación por Southern blot se constató que la PAI está altamente conservada en cepas toxigénicas de los pvs. phaseolicola y actinidiae, mientras que la conservación es sólo parcial en la cepa CFBP3388 del pv. syringae. La secuencia de un fragmento de 6,5 kb de CFBP3388, mostró un 85,3 % de identidad en comparación con la secuencia correspondiente de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, mientras que los productos deducidos de los cinco genes incluidos en este fragmento mostraron una identidad que oscila entre el 82 y el 93%. La organización del fragmento secuenciado es idéntica en todas las cepas tox+ y la comparación de sus secuencias sugiere que la Pht-PAI ha tenido un origen evolutivo común en *P. syringae*. La región Pht-PAI esta insertada en la misma posición en el genoma en todas las cepas de *P. syringae* pvs. phaseolicola y actinidiae analizadas. Esta especificidad posiblemente se deba a las cuatro integrasas presentes en tándem en uno de sus extremos, ya que estas integrasas están también en la misma posición en *P. syringae* pv. tomato DC3000, aunque asociadas a otro DNA no relacionado con la biosíntesis de faseolotoxina. La cepa CFBP3388, por el contrario, carece de estas integrasas y la Pht-PAI esta insertada en una posición distinta. En conjunto nuestros datos indican que la isla de patogenicidad para la biosíntesis de faseolotoxina ha invadido *P. syringae* repetidamente a lo largo de la evolución.

Búsqueda de dianas de interacción en la planta con efectores TTSS de *Pseudomonas syringae* con actividad proteasa de SUMO

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

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: javieruizal@uma.es

Numerosas bacterias patógenas Gram negativas utilizan sistemas de secreción especializados, denominados sistemas de secreción tipo III (TTSS), para introducir proteínas de virulencia (efectores) directamente al citosol de su hospedador. Dichos efectores interfieren con diversos procesos celulares eucariotas, para beneficio de la bacteria. Entre los procesos afectados se encuentra la sumoilación, un mecanismo de modificación postraduccional similar a la ubiquitinación, que consiste en la unión covalente de un pequeño péptido denominado SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier), y puede contribuir a modular la localización, actividad, estabilidad y capacidad de interacción con otras proteínas o con ADN de las proteínas modificadas. La sumoilación es un proceso reversible, en equilibrio dinámico entre la conjugación de SUMO y la desumoilación por acción de proteasas específicas. Una familia de efectores bacterianos secretados por TTSS parecen actuar como proteasas de SUMO en su hospedador eucariota.

En este trabajo hemos realizado una búsqueda de proteínas de la planta que constituyan dianas de efectores de la familia HopZ, efectores que presentan notable parecido de secuencia con proteasas de SUMO y están presentes en diversos patovares de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*. Para dicha búsqueda aplicamos el sistema del doble híbrido en levaduras para escrutar una genoteca de la planta modelo *Nicotiana benthamiana*, utilizando los efectores HopZ1_{pma}, HopZ1_{psy}, HopZ2 y HopZ3 como cebo. Las primeras rondas de escrutinio, todavía no saturantes, nos han permitido identificar una serie de posibles dianas comunes a todos los efectores analizados, entre las que se encuentra la ubiquitina, SUMO, así como una proteína (ELI3) implicada en la respuesta de la planta a infección por *Pseudomonas syringae*, y cuya expresión se induce como respuesta a tratamiento con ácido salicílico.

Clonaje, mutagénesis y caracterización en *Dickeya dadantii* de genes relacionados con Patogénesis: un posible transportador de histidina y *rcsB*.

M. Sena Vélez, M. Antúnez Lamas, E. López Solanilla, R. Cuartas Lanza, A. Llama Palacios, C. Rojas y P. Rodríguez Palenzuela,

Centro de Biotecnología y Genómica de plantas. Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

Dickeya dadantii, anteriormente llamada *Erwinia chrysanthemi* perteneciente a la familia de las Enterobacterias, es un patógeno de plantas que causa podredumbre blanda en un amplio rango de cultivos de importancia económica, como patata, zanahoria, apio, lechuga, algunas crucíferas y violeta africana. La enfermedad se manifiesta generalmente en postcosecha, produciendo grandes pérdidas. La virulencia de la bacteria depende de muchos factores entre ellos enzimas de degradación de la pared vegetal (pectato liasas y enzimas hidrolíticas), exopolisacáridos (EPS), resistencia a pH ácido en el apoplasto, y péptidos antimicrobianos.

En estudios anteriores del laboratorio se observó que en condiciones de bajo pH se producía sobre-expresión de un gen en la cepa EC16. Se ha determinado, por homología con otras bacterias, que podría ser un transportador de histidina. La hipótesis de trabajo es que la bacteria en medio ácido transportaría histidina hacia su interior transformándola en histamina, reacción que consume protones. De este modo la bacteria incrementa el pH intracelular pudiendo crecer a un pH extracelular de 4.

Por esto se decidió construir el mutante del gen en la cepa EC16, mediante la técnica de “marker-exchange”. Actualmente se está realizando dicha construcción. Una vez se haya obtenido, se caracterizará la función del gen, mediante experimentos que incluyen ensayos de virulencia, pruebas de crecimiento a distinto pH y en presencia o déficit de histidina.

El gen *rcsB* es un regulador general conservado en muchas enterobacterias. Entre los procesos regulados por este gen, se encuentran producción de exopolisacáridos (EPS), motilidad, formación de flagelo, producción de biofilm, división celular y virulencia. Con objeto de estudiar la posible influencia de este gen en la virulencia y en procesos relacionados con ella, se construyó, por la técnica descrita anteriormente, el mutante en este gen. Además también se realizó la complementación del mutante y la sobre-expresión del mismo.

Los estudios realizados hasta el momento nos indican que el mutante *rcsB* no presenta diferencias en virulencia con la silvestre, mientras que la cepa que sobre-expresa el gen es más virulenta que la cepa silvestre. Ensayos de motilidad en placa muestran que la capacidad para realizar “swimming” en el mutante es algo mayor que en la cepa silvestre. Con respecto al “swarming”, el avance del mutante es bastante más rápido. Experimentos preliminares parecen indicar que cuando el gen se sobre-expresa, la producción de EPS es mayor.

Generación de mutantes simples y múltiples en el género *Pseudomonas*

A. Zumaquero y C.R. Beuzón

Departamento de Genética, Facultad de ciencias, Universidad de Málaga.

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosas estrategias para colonizar y multiplicarse en sus hospedadores eucariotas. Una de las más importantes en la patogénesis tanto de plantas como de animales es la capacidad de secretar proteínas (efectores) en el citosol de la célula hospedadora mediante complejos sistemas de secreción conocidos como sistemas de secreción tipo III. Una vez en el interior de la célula hospedadora estos efectores son capaces de modificar procesos del hospedador de muy diversas maneras, con un fin común: permitir la supervivencia y multiplicación de la bacteria. La identificación y posterior caracterización funcional de dichos efectores es por tanto de gran interés en la caracterización de los procesos de infección, y la identificación de los procesos implicados en el hospedador. En la actualidad, la caracterización bioquímica y celular de la función de efectores en bacterias patógenas de animales está muy avanzada, sin embargo solo unos pocos han sido caracterizados en bacteria fitopatógenas. La reciente finalización de la secuenciación de los genomas de varias bacterias fitopatógenas ha supuesto un notable incremento en el número de efectores identificados, que en el caso de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 supera los 50 y para *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a son 27. Estos efectores han sido identificados mediante análisis masivo en base a que reúnan una serie de requisitos (análisis bioinformáticos, avirulencia, etc.), pero muy pocos de ellos han sido caracterizados funcionalmente. Para ello el análisis de mutantes en los distintos efectores es fundamental.

Con objeto de analizar el papel de sus distintos efectores en la virulencia de *P. syringae* pv. phaseolicola, hemos diseñado una estrategia para la generación rápida de mutantes en esta bacteria. Esta herramienta nos permitirá disponer de mutantes en todos los efectores de este patógeno cuyo análisis *in planta* será de gran interés.

Índice de competitividad: un método sensible y preciso para el análisis genético de la virulencia en *Pseudomonas syringae*

V
P7

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, Campus de Teatinos 29071, Málaga

El uso de infecciones mixtas para el estudio de patógenos bacterianos está muy extendido en patógenos de animales. No obstante, la aplicación de métodos basados en infecciones mixtas en modelos vegetales ha sido muy escasa hasta el momento, debido, fundamentalmente, a la dinámica de crecimiento descrita para una población mixta dentro de la planta. En patógenos de animales, está descrito que cada bacteria muestra la misma capacidad de multiplicación en una infección mixta que en una infección sencilla, mientras que en patógenos vegetales el crecimiento de las distintas estirpes co-inoculadas se ve afectado por interferencias entre ellas. En este trabajo se utilizan distintas estirpes de *Pseudomonas syringae* para demostrar cómo las diferencias de *crecimiento*, en infección mixta, entre patógenos de plantas y animales, no es algo intrínseco a los diferentes estilos de vida en cada modelo, sino que depende de la dosis del inóculo. También se muestra cómo la dosis mínima de inóculo para evitar interferencias entre distintas estirpes depende de la agresividad del patógeno, así como del tipo de factor de virulencia que diferencia a las estirpes co-inoculadas. De esta forma, se establecen las bases para la aplicación de métodos basados en infecciones mixtas para el estudio de bacterias fitopatógenas. Para demostrar el aumento de precisión y sensibilidad que representa el uso de infecciones mixtas frente a los ensayos tradicionales, se ha aplicado este método al análisis de mutantes levemente atenuados, ya sea por estar afectados en elementos de regulación o en un efector del sistema de secreción hrp tipo III (TTSS).

Análisis genético de la expresión del sistema de secreción tipo III Hrp en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola

I. Ortiz-Martín¹, R. Thwaites², J.M. Mansfield² y C.R. Beuzón¹

¹*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, Málaga 2907*

²*Department of Agricultural Sciences, Imperial Collage London, Wye Campus, Wye, Ashford Kent TN25 5AH, UK*

El análisis molecular de la interacción patógeno-hospedador es esencial para el desarrollo de estrategias de lucha contra la infección en animales y en plantas. El proceso de infección más común es el llevado a cabo por los sistemas de secreción tipo III (TTSS). Los genes que codifican el TTSS Hrp están agrupados en el 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 refleja las condiciones que se dan durante la infección. Mutantes en el locus *hrp* están afectados tanto en la capacidad de inducir HR en plantas resistentes, como en patogénesis en plantas sensibles. En el proceso de infección participan cuatro 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, junto con el factor σ^{54} , activa la expresión de los genes *hrp/hrc*. Adicionalmente, el producto del gen *hrpA*, además de ser la unidad estructural de pilus Hrp, ha sido identificado como necesario para la expresión de estos genes. El mecanismo por el cual HrpA afecta a la expresión se desconoce aunque parece estar relacionado con variaciones en los niveles de ARNm del operon *hrpRS*. 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 *in vitro*, 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 implicada en procesos celulares básicos, asociada a la virulencia en *P. syringae*, ya que degrada a HrpR, pero se desconoce que otras funciones puede llevar a cabo en *Pseudomonas*.

La gran complejidad de los mecanismos moleculares mediante los cuales los TTSS y su suite de efectores llevan a cabo su función, pone de manifiesto la necesidad de analizar interacciones funcionales y fenotipos de virulencia en mutantes múltiples. Con el fin de profundizar en los procesos de regulación que hacen posible la coordinación de todo el sistema, hemos obtenido mutantes por delección de los componentes reguladores del sistema: HrpA, HrpV, HrpL y Lon, así como el mutante doble $\Delta hrpV\Delta lon$, en *Pseudomonas syringae* pv Phaseolicola. Además, hemos construido plásmidos de expresión intermedia con los genes *hrpL*, *hrpV* y *lon*. En las estirpes generadas hemos ensayado el crecimiento y la inducción de síntomas en judía, la inducción de HR en tabaco, el índice de competitividad y la cuantificación de la expresión de diferentes genes del sistema Hrp mediante PCR a tiempo real.

Proteína fluorescente verde (Gfp) aplicada al estudio de la infección de olivo por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

V
P9

L. Rodríguez-Moreno, I. Pérez-Martínez y C. Ramos.

Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

La tuberculosis del olivo, enfermedad causada por la infección de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), se caracteriza por la aparición de tumores o agallas en troncos, ramas, tallos y brotes de las plantas infectadas. Psv presenta una fase epífita durante la cual se multiplica en los tallos y hojas sin producir síntomas. Tras superar la barrera epidérmica del olivo, generalmente a través de heridas, Psv invade y se multiplica dentro de los tejidos vegetales desencadenando la hipertrofia e hiperplasia de los mismos y, en consecuencia, la posterior formación del tumor. Se ha sugerido que Psv podría presentar una fase endófito, durante la cual, el movimiento de Psv a través de los espacios intercelulares y el xilema facilitaría la invasión de zonas adyacentes. Con el objetivo de analizar *in vivo* el proceso de infección de los tejidos vegetales por Psv, se procedió al marcaje con Gfp de la cepa de referencia Psv48 (NCPFB 3335). Para ello, se utilizaron tres construcciones diferentes: 1) inserción aleatoria de un mini-Tn5-gfp-Km, 2) inserción específica de un mini-Tn7-gfp-Km y, 3) transformación con un derivado del plásmido pBBR1-MCS5-Gm (pBBR1-MCS5-gfp-Gm). La expresión de la Gfp en todas estas construcciones se encuentra bajo el control del promotor P_{A1/O4/O3}, constitutivo en *Pseudomonas*. La infectividad de los tres derivados obtenidos se comprobó mediante infecciones llevadas a cabo en plantas de olivo cultivadas *in vitro*; el derivado portador del mini-Tn5-gfp-Km se comprobó además en plantones de olivo de dos años de edad. En todos los casos, los tumores inducidos emitieron fluorescencia verde, si bien, la fluorescencia emitida por los mismos fue muy superior en el transformante portador del plásmido pBBR1-MCS5-gfp-Gm. Utilizando microscopía de epifluorescencia y láser confocal, esta construcción permite visualizar células de Psv en el interior de tumores inducidos en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. En tumores inducidos 30 días después de la infección, la mayoría de las células de Psv se localizan en las cavidades intercelulares formadas tras el colapso de las células vegetales. En la actualidad, estamos analizando la localización dentro de los tejidos vegetales de células de varios mutantes de Psv alterados en la formación de tumores y portadores del plásmido pBBR1-MCS5-gfp-Gm: un mutante *trpE*, auxótrofo para el triptófano e incapaz de sintetizar ácido indol-3-acético, y un mutante *hrpA*, afectado en el sistema de secreción tipo III.

Análisis de la virulencia de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* mediante *Signature Tagged Mutagenesis* (STM)

I.M. Matas, L. Lambertsen y C. Ramos

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

Los procesos moleculares que intervienen en la interacción entre *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) y su planta huésped (*Olea europaea* L.) son prácticamente desconocidos. Tras la penetración de Psv en los tejidos vegetales a través de heridas, la multiplicación del patógeno desencadena una hipertrofia e hiperplasia de los mismos y, en consecuencia, la posterior formación de tumores. En este trabajo utilizamos *Signature Tagged Mutagenesis* (STM) para la identificación de genes de Psv necesarios para su multiplicación dentro de los tejidos del olivo. Esta estrategia, basada en la utilización de una colección de transposones etiquetados (región central variable de 40 pares de bases detectable mediante hibridación *Southern*), combina la fuerza del análisis mutacional con la capacidad de seguir simultáneamente el comportamiento de un amplio número de mutantes en un único hospedador. Se construyó una colección de aproximadamente 5000 inserciones diferentes de la mezcla de transposones *mini-Tn5*-STM (D. Holden, Imperial College, Londres) en los replicones de la cepa de referencia Psv48 (NCPBPB 3335). La frecuencia de auxótrofos (incapaces de crecer en medio mínimo) resultó ser del 1.8 %. De entre los transconjugantes obtenidos (Km^R), se descartaron las posibles integraciones del plásmido suicida (Ap^R) portador de la mezcla de transposones (1.2 %), así como aquellos portadores de etiquetas no identificables mediante hibridación *Southern* (24.4 %). El análisis en masa de los mutantes se está llevando a cabo mediante inoculación simultánea, en plantas de olivo cultivadas *in vitro*, de una mezcla homogénea de 48 mutantes diferentes (en total 10³-10⁴ UFC). Treinta días después de la infección, los tumores desarrollados albergan 10⁶-10⁷ UFC; la proporción de células portadoras de cada una de las etiquetas dependerá de la capacidad del mutante correspondiente de sobrevivir y multiplicarse dentro del tumor. Hasta el momento, se han analizado 1456 mutantes, el 11,6% no se detectaron tras una primera ronda de multiplicación en olivo. Tras una segunda ronda de multiplicación *in vivo*, los mutantes no detectados (58%) se inocularon independientemente en plantas de olivo, o bien, en proporción 1:1 junto con la cepa silvestre. Resultados preliminares, inoculando 22 de estos mutantes, indican que en 12 de las infecciones mixtas analizadas, la población de células silvestres superó a la del mutante 30 días después de la inoculación; 6 de ellos, no indujeron la formación de tumores cuando se inocularon independientemente. En la actualidad, estamos llevando a cabo la identificación del punto de inserción del mini-Tn5-STM en estos 12 mutantes mediante PCR-arbitraria y secuenciación.

ESTRÉS Y RESISTENCIA

Análisis a nivel genómico de la respuesta a péptidos antimicrobianos en *Dickeya dadantii*

J
E1

R. Cuartas, A. Llama-Palacios, C. Rojas, P. Rodríguez Palenzuela y E. López Solanilla

Departamento de Biotecnología, E.T.S.Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es

La patogénesis de *D. dadantii* se caracteriza por la producción de podredumbre blanda en un gran número de especies vegetales. La colonización de un huésped determinado depende en gran parte de su capacidad de sobrevivir durante los estadios más tempranos de la infección. Una de las barreras iniciales que presentan las plantas frente al ataque de patógenos es la producción de péptidos antimicrobianos. Se ha demostrado que la resistencia a péptidos antimicrobianos en *D. dadantii* juega un papel fundamental en su patogénesis. Hemos abordado el estudio de la respuesta a la presencia de dichos péptidos a nivel genómico con el fin de obtener una visión general de los mecanismos de resistencia de *D. dadantii* y posteriormente analizar la importancia relativa de cada uno de ellos en el proceso de infección.

Hemos llevado a cabo tratamientos con concentraciones subletales de péptidos antimicrobianos y hemos analizado, empleando hibridaciones de microarrays correspondientes al genoma completo de *D. dadantii* 3937, el nivel de expresión a nivel transcripcional. Se ha analizado la respuesta de la cepa silvestre así como la de un mutante afectado en la expresión del sistema de regulación de dos componentes PhoP/PhoQ. Este sistema ha sido previamente involucrado en el control de varios fenómenos relacionados con la patogénesis, y entre ellos con la resistencia a péptidos antimicrobianos.

Los datos obtenidos a partir del análisis de los microarrays han sido validados mediante qRT-PCR, observándose un nivel de correlación muy alto entre ambas técnicas. Los resultados obtenidos muestran la inducción de al menos 17 genes implicados en funciones como la modificación de LPS, regulación génica o el transporte a través de membranas.

Efecto de la limitación prolongada de nutrientes en la supervivencia y patogenicidad de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 en agua natural

B. Álvarez¹, E.G. Biosca² y M.M. López¹

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

²*Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia Estudio General. E-mail: elena.biosca@uv.es*

Ralstonia solanacearum biovar 2 es el agente causal de la marchitez bacteriana de las solanáceas, enfermedad con amplia distribución que produce grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Se trata de un patógeno de cuarentena en la Unión Europea, cuya persistencia en el medioambiente, una vez se ha introducido, constituye un grave problema. A pesar de que se transmite con frecuencia por el agua, se dispone de escasa información sobre su capacidad de supervivencia en ambientes naturales oligotróficos.

El objetivo de este trabajo ha sido investigar el efecto de la limitación de nutrientes a corto y largo plazo, sobre la supervivencia y patogenicidad de *R. solanacearum* biovar 2 en agua de río, en comparación con agua destilada, considerando también condiciones de baja temperatura. Para ello, se inocularon microcosmos de agua de río o destilada estéril con 10^7 ufc/ml de una cepa española de *R. solanacearum* biovar 2 (IVIA-1602.1) y se incubaron a 24°C y 4°C durante cuatro años o hasta la pérdida de cultivabilidad. Periódicamente se realizaron recuentos de células totales, viables y cultivables y ensayos de patogenicidad en plantas de tomate. Durante la limitación de nutrientes a corto plazo (40 días), a 24°C las poblaciones de *R. solanacearum* se mantuvieron en niveles similares a los iniciales, en los dos tipos de agua ensayados. Sin embargo, a 4°C se observó una pérdida de cultivabilidad más pronunciada en agua destilada y, por tanto, dependiente del contenido en nutrientes del agua. Durante la incubación prolongada en condiciones oligotróficas a 24°C, los números de células cultivables de esta bacteria se mantuvieron próximos a los iniciales a lo largo del primer año, pero luego descendieron hasta niveles de 10^4 ufc/ml. Estos descensos no coincidieron con los de las células viables, que se mantuvieron sobre 10^6 células/ml, indicando que una escasez prolongada de nutrientes induce el estado viable no cultivable (VNC) en *R. solanacearum*. No obstante, las células de esta bacteria mantuvieron su poder patógeno durante cuatro años en los microcosmos de agua de río, sin diferenciarse de los controles no sometidos a limitación de nutrientes. Asimismo, a lo largo de este período, las células de *R. solanacearum*, que habitualmente tienen forma bacilar, sufrieron una transición progresiva hacia una predominancia de formas cocoides, al igual que se ha descrito en otros modelos bacterianos frente a condiciones adversas.

En conjunto, estos resultados demuestran la supervivencia durante cuatro años de *R. solanacearum* biovar 2 en agua natural, manteniendo su patogenicidad en plantas susceptibles y, por primera vez, la inducción del estado VNC en esta bacteria tras condiciones prolongadas de limitación de nutrientes. La existencia de dichas células puede tener importantes consecuencias epidemiológicas y plantea nuevos retos tanto en el diagnóstico como en el control de la marchitez bacteriana.

Modificación del medio B de King para la recuperación de células estresadas de *Erwinia amylovora*

M. Ordax¹, E.G. Biosca², M.M. López¹ y E. Marco-Noales¹

¹*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).*

²*Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia.
E-mail: ordax@ivia.es*

La bacteria *Erwinia amylovora* es el agente causal del fuego bacteriano, que afecta gravemente a frutales de pepita y algunas plantas ornamentales de la familia de las Rosáceas. Su aislamiento a partir de muestras sintomáticas es sencillo si el número de células cultivables presentes es elevado, pero se complica cuando los síntomas están muy avanzados, las plantas han sido tratadas o las condiciones ambientales son adversas. Estas situaciones de estrés pueden causar alteraciones fisiológicas en las bacterias, que dificultan o incluso impiden su crecimiento en los medios de cultivo usados habitualmente para su aislamiento. La normativa aconsejada para el diagnóstico de *E. amylovora* (PM7/20, EPPO) exige el aislamiento como prueba definitiva para confirmar la presencia del patógeno. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido modificar la composición del medio no selectivo B de King (KB), utilizado rutinariamente para el aislamiento de *E. amylovora*, con el fin de favorecer la recuperación de este patógeno en distintas condiciones de estrés. De acuerdo con datos previos, se ensayaron en KB líquido varias concentraciones de CuSO₄ (inferiores a la concentración mínima inhibitoria), seleccionándose la de 1.5 mM. Dicha concentración favoreció el crecimiento de *E. amylovora* sin promover el de bacterias epífitas como *Pantoea agglomerans* (*E. herbicola*) o *Pseudomonas fluorescens*. Tras ensayar suspensiones mixtas de estas bacterias y *E. amylovora*, el nuevo medio de cultivo sólido (KBCu), en comparación con otros generales (KB y SNA) y semiselectivos (CCT y MM₂Cu), proporcionó a las 48 h el mayor número de colonias del patógeno, incluso cuando éste se encontraba en una proporción cien veces menor a la de otras bacterias. Además, *E. amylovora* aumentaba su mucosidad en el medio KBCu y presentaba un característico color amarillo, lo que facilitaba la diferenciación de sus colonias. Se observaron resultados similares a partir de muestras sintomáticas de peral y acerolo. Cuando se ensayó la cultivabilidad de células de *E. amylovora* sometidas a distintas situaciones de estrés, como la limitación de carbono, presencia de iones cobre libres o radiación UV, fue también en el medio KBCu donde se obtuvieron los recuentos más altos de células cultivables. Con todo, se concluye que la adición de CuSO₄ a una concentración de 1.5 mM al medio de cultivo KB le confiere un carácter diferencial para *E. amylovora*, favoreciendo además su crecimiento incluso en condiciones ambientales adversas.

Bases moleculares de la resistencia a estrobilurinas en *Podospaera fusca***D. Fernández-Ortuño¹, J.A. Torés¹, A. de Vicente² y A. Pérez-García²**

¹Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), Algarrobo-Costa, 29750 Málaga.
E-mail: tores@eelm.csic.es

²Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada a CSIC. Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. 29071 Málaga.
E-mail: aperez@uma.es

El principal método de control de *Podospaera fusca*, agente causal del oídio de las cucurbitáceas, consiste en el empleo de fungicidas, aunque conlleva el grave problema de la aparición de resistencias. Entre estos compuestos destacan las estrobilurinas, inhibidores de la respiración mitocondrial con diana en el centro Qo del complejo enzimático citocromo *bc₁* (complejo III), por lo que son también llamadas inhibidores Qo (QoI). En estudios recientes de nuestro grupo se ha demostrado una elevada frecuencia de resistencia a QoI en poblaciones de *P. fusca* de diferentes áreas productoras de cucurbitáceas de nuestro país. La resistencia a QoI está normalmente asociada a mutaciones puntuales en el gen citocromo *b* (*CYTB*) que codifica la proteína diana de estos fungicidas, siendo los cambios más frecuentes las sustituciones G143A o F129L. Tras analizar por secuenciación o análisis CAPS el gen *CYTB* en un total de 51 aislados de *P. fusca* se observó que las mutaciones F129L o G143A no eran las responsables de la resistencia a estrobilurinas en *P. fusca* en los 26 aislados resistentes analizados.

La resistencia a QoI también puede estar mediada por la inducción de lo que se conoce como respiración alternativa, en la que está implicada la enzima oxidasa alternativa (AOX) que provoca un “bypass” en la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo succinato-deshidrogenasa (complejo II). Para comprobar la implicación de esta proteína en la resistencia a QoI en *P. fusca*, se han llevado a cabo ensayos de crecimiento y de actividad respiratoria en presencia de QoI y de ácido salicilhidroxámico (SHAM), un inhibidor AOX. El completo desarrollo micelial de los aislados resistentes evaluado sobre discos de cotiledones de calabacín, así como la actividad respiratoria normal observada mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio INT, sugieren que este segundo mecanismo tampoco parece estar implicado en la resistencia a QoI en *P. fusca*.

Aunque el complejo III está formado por distintas subunidades proteicas, son dos las que constituyen los centros de reacción Qi y Qo, fundamentales para realizar la transferencia electrónica hacia otros complejos. El centro Qi, esta formado por citocromo *b* (*CYTB*), sin embargo, el Qo esta formado además de por *CYTB* por la proteína sulfoférrica de Rieske (ISP). Para conocer de forma más exhaustiva estos dos centros de reacción, llevamos a cabo estudios con diferentes inhibidores de estos centros. Los de clase Pf y Pm que inhiben el centro Qo; los de clase N, inhibidores del centro Qi; y los de clase PN, que actúan sobre los sitios Qo y Qi. Tras llevar a cabo un análisis en 14 aislados de *P. fusca* detectamos resistencia cruzada para todos los inhibidores Qo ensayados además de para el inhibidor Qo/Qi en los 7 aislados resistentes examinados. Nuestros resultados sugieren que la resistencia a estrobilurinas en *P. fusca* podría estar asociada al complejo III, siendo nuestra hipótesis actual que un cambio estructural en la proteína ISP podría la responsable de la resistencia a estrobilurinas en las poblaciones españolas de *P. fusca*.

Resistencia a fungicidas inhibidores de la enzima C14 α -demetilasa en *Podosphaera fusca*

F.J. López-Ruiz¹, A. Pérez-García², C.J. Ridout³, L. Chartrain³, A. de Vicente², J.K.M. Brown³ y J.A. Torés¹

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

E-mail: tores@eelm.csic.es

²Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada a CSIC. Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. 29071-Málaga.

³Disease and Stress Biology Department, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK.

Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) forman una extensa clase de antifúngicos de tipo sistémico que se emplean desde la década de los 70 en el tratamiento de las micosis tanto en clínica como en agricultura. Dentro de esta clase, los inhibidores de la demetilasa (DMI) constituyen el mayor grupo, ya que representan casi un tercio de los antifúngicos utilizados en la agricultura. Estos compuestos, que actúan inhibiendo la enzima esterol C14 α -demetilasa (CYP51), representan más del 45% de los productos utilizados en el control del oídio de las cucurbitáceas. Debido a que la aplicación repetida de fungicidas es el principal método de control de la enfermedad, la exposición continuada a estos compuestos constituye una presión de selección que elimina a los individuos que carecen de resistencia frente a dicho agente selectivo y favorece el desarrollo de poblaciones resistentes del patógeno. Con objeto de desarrollar nuevas estrategias que permitan un mejor control de la enfermedad, se evaluaron los niveles de sensibilidad de 50 aislados de *Podosphaera fusca* a tres fungicidas DMI utilizados en el control del oídio de las cucurbitáceas (miclobutanil, triadimenol y fenarimol), empleando para ello un ensayo *in vitro* de discos de hoja. Dicho análisis reveló la existencia de resistencia cuantitativa a triadimenol y fenarimol, detectándose correlación positiva únicamente entre miclobutanil y triadimenol ($P < 0,001$). A continuación, se establecieron una serie de concentraciones discriminatorias con objeto de diferenciar fácilmente entre aislados sensibles y resistentes y evaluar la sensibilidad de 250 aislados de *P. fusca* procedentes de las principales áreas productoras de cucurbitáceas. El análisis por provincias reveló niveles de resistencia de moderados a altos en las zonas con predominio de tratamientos basados en DMI y niveles bajos o nulos en aquellas zonas en las que el uso de estos compuestos era reducido. Los datos obtenidos sirvieron para elaborar un mapa de distribución espacio-temporal de la resistencia que puede ser empleado en el diseño de campañas de control de la enfermedad.

Por otra parte, el estudio de la resistencia cruzada con otros DMI empleados frente a *P. fusca* puso de manifiesto niveles de resistencia más elevados en aislados resistentes a triadimenol y fenarimol que en aislados sensibles. En relación a esto, se está llevando a cabo el aislamiento, clonación y secuenciación del gen *cyp51* de *P. fusca*, debido a que cambios en la secuencia del mismo han sido asociados a incrementos en los niveles de resistencia a fungicidas DMI en otros hongos. Para ello, se diseñaron cebadores degenerados a partir de dominios conservados del gen que ha permitido amplificar un fragmento de 1,1 kb de *cyp51*. Para obtener la secuencia completa del gen se están llevando a cabo ensayos de RACE PCR y “genome walking”. De confirmarse la existencia de cambios en la secuencia, este gen podría ser útil en el diseño de un método rutinario de caracterización de aislados resistentes más rápido y fiable que las técnicas convencionales.

<i>Abarca-Grau, A.M.</i>	20	<i>Del Castillo, I.</i>	40
<i>Aguilar, M.</i>	40	<i>Delgado, F.</i>	40
<i>Aguirre de Cárcer, D.</i>	32	<i>Domínguez-Sánchez, M.S.</i>	40
<i>Aletà, N.</i>	10	<i>Escolano, J.</i>	30
<i>Álvarez, B.</i>	58	<i>Espinosa-Urgel, M.</i>	17, 19
<i>Álvarez-Morales, A.</i>	27, 47	<i>Espuny, R.</i>	40
<i>Antequera, A.</i>	21	<i>Fernández-Piñar, R.</i>	17
<i>Antúñez-Lamas, M.</i>	46, 49	<i>Fernández-Ortuño, D.</i>	60
<i>Arcos, J.I.</i>	21	<i>Führer, M.E.</i>	27, 47
<i>Arrebola, E.</i>	29	<i>Gaju, N.</i>	30
<i>Badosa, E.</i>	38	<i>García-Gutiérrez, L.</i>	41
<i>Bañeras, L.</i>	38	<i>Garcidueñas-Piña, R.</i>	27
<i>Barahona, E.</i>	18, 21	<i>Golmohammadi, M.</i>	9
<i>Bejarano, E.R.</i>	48	<i>González, A.J.</i>	11, 25
<i>Bellogín, R.</i>	40	<i>González-Sánchez, M.A.</i>	35
<i>Beuzón, C.R.</i>	50, 51, 52	<i>González-Valera, G.</i>	25
<i>Bloemberg, G.</i>	36	<i>Guevara, C.M.</i>	48
<i>Biosca, E.G.</i>	58, 59	<i>Gutiérrez, S.</i>	15
<i>Bonaterra, A.</i>	42	<i>Gutiérrez-Barranquero, J.A.</i>	29
<i>Bonilla, N.</i>	31	<i>Hermosa, M.R.</i>	15, 16
<i>Brown, J.K.M.</i>	61	<i>Hermoso, J.M.</i>	31
<i>Cabrefiga, J.</i>	42	<i>Hernández-Flores, J.L.</i>	27
<i>Cabrera-Ordóñez, E.</i>	46	<i>Iturbe, A.</i>	45
<i>Campelo, M.P.</i>	11	<i>Jiménez-Díaz, R.M.</i>	16
<i>Camps, J.</i>	42	<i>Kanematsu, S.</i>	36
<i>Cardoza, R.E.</i>	15	<i>Karlson, U.</i>	32
<i>Cazorla, F.M.</i>	29, 31, 35, 36, 37	<i>Lambertsen, L.</i>	54
<i>Chartrain, L.</i>	61	<i>Lamers, G.E.M.</i>	36
<i>Codina, J.C.</i>	37	<i>Llama-Palacios, A.</i>	49, 57
<i>Cuartas-Lanza, R.</i>	49, 57	<i>Llop, P.</i>	9
<i>Cubero, J.</i>	9	<i>López, M.M.</i>	9, 20, 28, 58, 59
<i>Cubo, T.</i>	40	<i>López, K.</i>	47
<i>Dardanelli, M.S.</i>	40	<i>López-Solanilla, E.</i>	46, 49, 57
<i>De Vicente, A.</i>	29, 31, 35, 37, 39, 41, 60, 61	<i>López-Ruiz, F.</i>	61
<i>De Weert, S.</i>	36	<i>Macho, A.P.</i>	51
		<i>Mallorquí, M.</i>	30

<i>Mansfield, J.M.</i>	52	<i>Redondo-Nieto, M.</i>	18, 21
<i>Marco-Noales, E.</i>	20, 59	<i>Reinoso, B.</i>	11
<i>Martín, M.</i>	18, 21, 32	<i>Rey, M.</i>	16
<i>Martín-Pérez, R.</i>	37	<i>Ridout, C.J.</i>	61
<i>Martínez-Alonso, M.</i>	30	<i>Rivas, L.</i>	27
<i>Martínez-Granero, F.</i>	18, 21	<i>Rivilla, R.</i>	18, 21, 32
<i>Matas, I.M.</i>	54	<i>Rodríguez-Moreno, A.</i>	46
<i>Matías, J.</i>	10	<i>Rodríguez-Moreno, L.</i>	53
<i>Megías, M.</i>	40	<i>Rodríguez-Palenzuela, P.</i>	46, 49, 57
<i>Monte, E.</i>	15, 16	<i>Rojas, C.</i>	49, 54
<i>Montes, F.</i>	40	<i>Romero, D.</i>	39, 41
<i>Montesinos, E.</i>	10, 38, 42	<i>Rovira, M.</i>	10
<i>Moragrega, C.</i>	10	<i>Rubio, M.B.</i>	15
<i>Murillo, J.</i>	26, 27, 29, 45, 47	<i>Ruiz-Albert, J.</i>	48
<i>Navarro de la Fuente, L.</i>	27, 47	<i>Santamaría, G.</i>	10
<i>Navazo, A.</i>	18, 21	<i>Sena-Vélez, M.</i>	49
<i>Ojeda, J.</i>	40	<i>Suárez, R.</i>	16
<i>Ollero, J.</i>	40	<i>Sundin, G.W.</i>	26
<i>Ordax, M.</i>	59	<i>Thwaites, R.</i>	52
<i>Ortiz-Martín, I.</i>	51, 52	<i>Travieso, M.L.</i>	17, 19
<i>Palomo, J.L.</i>	11	<i>Trelles-Salazar, O.</i>	46
<i>Peñalver, J.</i>	9	<i>Trias, R.</i>	38
<i>Peñalver, R.</i>	20, 28	<i>Tsiamis, G.</i>	45
<i>Pérez-García, A.</i>	39, 41, 60, 61	<i>Torés, J.A.</i>	31, 60, 61
<i>Pérez-Jiménez, R.M.</i>	35	<i>Yousef, F.</i>	19
<i>Pérez-Martínez, I.</i>	26, 28, 53	<i>Zerouh, H.</i>	39
<i>Pliego, C.</i>	36	<i>Zhao, Y.</i>	26
<i>Quesada, J.M.</i>	9, 28	<i>Zumaquero, A.</i>	50, 51
<i>Ramos, C.</i>	26, 28, 36, 53, 54		