



Grupo Especializado *Microbiología de Plantas*

## III Reunión

*Granada, 18-20 Febrero, 2009*

# PROGRAMA Y LIBRO DE RESÚMENES

Con el patrocinio de:



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS





III Reunión del Grupo Especializado  
SEM "Microbiología de Plantas".  
Granada 18-20 Febrero 2009

**Comité científico:**

Jesús Murillo Martínez  
Antonio de Vicente Moreno  
Alejandro Pérez García  
Manuel Espinosa Urgel  
M<sup>a</sup> Isabel Ramos González

*Universidad Pública de Navarra  
Universidad de Málaga  
Universidad de Málaga  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC*

**Comité organizador local:**

M<sup>a</sup> Isabel Ramos González  
Manuel Espinosa Urgel

*Estación Experimental del Zaidín. CSIC  
Estación Experimental del Zaidín. CSIC*

## Colaboran:



Palacio de  
Exposiciones  
y Congresos  
de Granada



VIAJES  
*El Corte Inglés*  
DIVISION DE CONGRESOS



Fisher Scientific



## **MIÉRCOLES 18 DE FEBRERO**

**12:00-14:00 Llegada y registro de participantes**

**14:00 Almuerzo**

**15:45 Inauguración**

**16:15-17:30 Sesión I.- Bases moleculares de las interacciones beneficiosas**

**Moderadores: Rafael Rivilla y M<sup>a</sup> José Soto**

Caracterización del gen *Thpg1* de *Trichoderma harzianum*, y estudio de su papel en la interacción *Trichoderma*-planta

M.E. Morán-Díez, R. Hermosa, P. Ambrosino, R.E. Cardoza, S. Gutiérrez, M. Lorito, E. Monte

Producción de óxido nítrico en la simbiosis *Bradyrhizobium japonicum*-*Glycine max*.

C. Sánchez, T. Uchiyumi, L. Girard, E.J. Bedmar, M.J. Delgado

Implicación de la sistemina en la formación de micorrizas arbusculares

I. Fernández, J.M. García, C. Azcón-Aguilar, M.J. Pozo

La delgada línea entre simbiosis y patogénesis en las interacciones planta-microorganismo

M. Robledo, L.P. Rivera, J.I. Jiménez-Zurdo, M.J. Soto, E. Velázquez, F. Dazzo, E. Martínez-Molina, P.F. Mateos

Inducción de PRs (Pathogenesis-Related proteins) en nódulos de *Pisum sativum* desarrollados bajo condiciones de deficiencia de boro o inducidos por mutantes en polisacáridos superficiales bacterianos.

M. Reguera, L. Bolaños, I. Bonilla

**17:30-18:00 Pausa**

**18:00-20:00 Sesión I (continuación).- Bases moleculares de las interacciones beneficiosas**

Papel simbiótico de los glucanos cíclicos de *Sinorhizobium fredii* HH103.

J.C. Crespo-Rivas, A. Hidalgo, I. Margaret, A. Buendía-Clavería, F.J. Ollero, M.A. Rodríguez, A.M. Gil-Serrano, J.E. Ruiz-Sainz, J. Lloret, S. Murdoch, J.M. Vinardell

El gen *rkpM* de la región *rkp-3* de *Sinorhizobium fredii* HH103 punto en común de las rutas de biosíntesis del KPS y del LPS

I. Margaret, L. Bolaños, I. Bonilla, A. Buendía-Clavería, J.C. Crespo-Rivas, A. Hidalgo, J. Lloret, M. Reguera, M.A. Rodríguez Carvajal, J.M. Vinardell, J.E. Ruiz-Sainz

Colonización y nodulación de plantas de alfalfa: ¿etapas necesariamente consecutivas?

J.A. López-Contreras, N. Toro, M. Fernández-López

Análisis global de la interacción planta-*Pseudomonas putida*: colonización y resistencia sistémica inducida

M.A. Matilla-Vázquez, J.L. Ramos, P.A.H.M. Bakker, M.L. Travieso, M.I. Ramos-González

Análisis transcriptómico del swarming dependiente del gen *fadD* en *Sinorhizobium meliloti*

J. Nogales, A. Domínguez-Ferrerías, C.V. Amaya-Gómez, V. Cuéllar, J. Sanjuán, J. Olivares, M.J. Soto

LapF, una adhesina de gran tamaño implicada en la interacción de *Pseudomonas putida* con plantas

M. Martínez-Gil, F. Yousef-Coronado, M. Espinosa-Urgel

Papel central de los lipopolisacáridos en la formación de biopelículas en el agente de biocontrol K84

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

Señalización en la regulación del movimiento y formación de biopelículas en *Pseudomonas fluorescens* F113

A. Navazo, E. Barahona, M. Redondo-Nieto, F. Martínez-Granero, F. Yousef, J.D. Alché, M. Espinosa-Urgel, M. Martín, R. Rivilla

**21:30 Cóctel de Bienvenida (Hotel Los Ángeles)**

## **JUEVES 19 DE FEBRERO**

### **9:00-11:00 Sesión II.- Estrés, mecanismos de resistencia y adaptación**

**Moderadores: M<sup>a</sup> José Pozo y Alejandro Pérez**

Efecto de distintos desinfectantes en la supervivencia de *Erwinia amylovora* en agua  
R.D. Santander, J. Catalá-Senent, I. Ferrer, M. Ordax, E. Marco-Noales, M.M. López, E.G. Biosca

Aumento de la resistencia a estreses abióticos en plantas y hongos mediante la sobreexpresión del gen *hsp70* de *Trichoderma harzianum*  
M. Montero-Barrientos, C. Nicolás, R.E. Cardoza, S. Gutiérrez, E. Monte, R. Hermosa

Resistencia a compuestos antimicrobianos vegetales en bacterias patógenas de plantas  
P. Vargas, A. Felipe y M.T. Gallegos

Sistemas MDR en *Dickeya dadantii*: análisis genómico, identificación y estudio de su papel en patogénesis  
J. Larenas Keymer, I. Del Rio Alvarez, F. Abascal, J.J. Rodríguez-Herva, P. Rodríguez-Palenzuela, E. López-Solanilla

Mecanismos de adaptación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares a niveles tóxicos de Cu  
K. Benabdellah, C. Azcón-Aguilar, N. Ferrol

Bases moleculares de la resistencia a fungicidas DMI en oídio de las cucurbitáceas  
F.J. López-Ruiz, C.J. Ridout, L. Chartrain, J. A. Torés, J.K.M. Brown, A. Pérez-García

Papel de la proteína de Rieske en la resistencia a fungicidas QoI en *Podospaera fusca*  
D. Bellón, J. A. Torés, D. Fernández-Ortuño, A. Pérez García

Efecto de la luz y temperatura en la producción de conidias del hongo *Stemphylium vesicarium*, bajo condiciones controladas.  
A. Vilardell, E. Montesinos, I. Llorente

### **11:00-11:30 Pausa**

### **11:30-13:30 Sesión III.- Ecología**

**Moderadores: Núria Gaju y Morteza Golmohammadi**

Análisis de la rizosfera de plantas xerófitas del altiplano central de México mediante la generación de genotecas ambientales del gen 16S rRNA y metagenoma funcional.  
G. Torres, V. Millán, N. Toro, S.G. Acinas, H.C. Ramírez-Saad, F. Martínez-Abarca

Diversidad de las poblaciones bacterianas de la filosfera de distintas variedades de peral y manzano a lo largo del desarrollo fenológico del árbol.  
J. Escolano, A. Soler, M. Mallorquí, M. Martínez-Alonso, N. Gaju

Estudio de quimiotaxis en distintas especies de *Xanthomonas*  
M. Sena, E. Ferragud, J. Cubero

Análisis de los sistemas de *quorum sensing* en *Rhizobium leguminosarum* UPM791  
C. Sánchez-Cañizares, L. Cantero, T. Ruiz-Argüeso, J. Imperial y J.M. Palacios

Señalización intra- e interespecífica en *Pseudomonas putida* y su papel en colonización de la rizosfera  
R. Fernández-Piñar, M. Cámara, J.L. Ramos, M.I. Soriano, M. Espinosa-Urgel

El fenómeno de *quorum quenching* en *Bacillus*: Actividades enzimáticas y genes implicados  
H. Zerjoug, D. Romero, L. García-Gutiérrez, J. C. Codina, A. de Vicente, A. Pérez-García

El arroz y la judía producen moléculas que interfieren en la percepción del Quórum bacteriano  
F. Pérez-Montaño, R.A. Bellogín, F.J. Ollero, F.J. López-Baena, B. Guasch-Vidal, S. González-Barroso, M.R. Espuny

### **14:00 Almuerzo**

## **16:00-17:45 Sesión IV.- Actividad promotora del crecimiento y Control**

**Moderadores: Francisco Cazorla y Rosa Hermosa**

El factor de transcripción *Thctf1* de *Trichoderma harzianum* está implicado en la producción de metabolitos secundarios y en la actividad antifúngica

M.B. Rubio, R. Hermosa, J.L. Reino, I.G. Collado, E. Monte

Transcripción de PRs en plantas de tomate tratadas con el agente de biocontrol *Penicillium oxalicum*

P. Sabuquillo, J. Cubero, P. Melgarejo

Modificación de *Pseudomonas fluorescens* F113 para mejorar su aplicación en biocontrol

E. Barahona, A. Navazo, T. Zea-Bonilla, R.M. Pérez, M. Redondo-Nieto, F. Martínez-Granero, R. Rivilla, M. Martín.

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

L. García-Gutiérrez, D. Romero, H. Zerrouh, F.M. Cazorla, A. de Vicente, A. Pérez-García

Efecto supresivo sobre las podredumbres radiculares del aguacate mediante la aplicación de enmiendas orgánicas

N. Bonilla, J.A. Torés, J.M. Hermoso, J. González, F.M. Cazorla, A. de Vicente

Obtención de cepas de *Bacillus* con aptitudes en biocontrol mediante técnicas de enriquecimiento selectivo y discriminación molecular

I. Mora, J. Cabrefiga, E. Montesinos

Control de la Necrosis Apical del mango: Búsqueda de tratamientos alternativos al cobre

J.A. Gutiérrez-Barranquero, A. de Vicente, A. Pérez-García, E. Arrebola, D. Sarmiento, F.M. Cazorla

**Tiempo libre para visitar la ciudad**

**21:30 Cena (Restaurante “El Pilar del Toro”)**

## **VIERNES 20 DE FEBRERO**

### **9:00-11:00 Sesión V.- Patogénesis**

**Moderadores: Cayo Ramos y Emilia López Solanilla**

Identificación de genes implicados en la biosíntesis de mangotoxina

V.J. Carrión, J.A. Gutiérrez-Barranquero, E. Arrebola, F.M. Cazorla, J. Murillo, A. de Vicente

Implicación de *yap1* en la virulencia de *U. maydis*

L. Molina

Identificación de genes de *Arabidopsis* regulados por silenciamiento durante la infección por *Pseudomonas syringae* pv. tomato

A. Zumaquero, E. Bejarano, C.R. Beuzón

Papel del jasmonato en la patogénesis de *Dickeya dadantii* (ex-*Erwinia chrysanthemi*)

M. Antúñez-Lamas, E. Ordoñez-Cabrera, E. López-Solanilla, R. Solano, P. Rodríguez-Palenzuela

Construcción de mutantes *matE* en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB3355.

I.M. Aragón, I.M. Matas, C. Ramos

Identificación y caracterización de efectores del sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas syringae*

A.P. Macho, J. Ruiz-Albert, P. Tornero, C.R. Beuzón

El efector HopN1 modula la muerte celular en plantas interfiriendo con la generación de estrés oxidativo.

M. Fernández-Pérez, J.J. Rodríguez-Herva, R. Cuartas Lanza, P. Rodríguez-Palenzuela, E. López-Solanilla

Estudio de la interacción *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi-olivo mediante Signature Tagged Mutagenesis

I.M. Matas, L. Rodríguez-Moreno, C. Ramos

### **11:00-11:30 Pausa**

### **11:30-13:00 Sesión VI.- Análisis microbiano: Marcadores evolutivos y diversidad genética**

**Moderadores: Jaime Cubero y Ramón Peñalver**

Secuenciación del complemento de plásmidos nativos de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB3335

L. Bardaji, I. Pérez-Martínez, G.W. Sundin, C. Ramos, J. Murillo

Papel en virulencia del plásmido pPsv48A (75 Kb) de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335

L. Rodríguez-Moreno, M.P. Castañeda, I. Pérez-Martínez, J. Murillo, C. Ramos

Evaluación de mRNA y rRNA como marcadores de viabilidad para *Xanthomonas citri* subsp. citri

M. Golmohammadi, P. Llop, G. Scuderi, M.M. López, J. Cubero

Tipificación de aislamientos asturianos de *Pseudomonas viridiflava* y detección de islas de patogenicidad

M. San José, A.J. González, M.R. Rodicio

Localización subcelular en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* de la proteína codificada por el intrón bacteriano del grupo II RmInt1

R. Nisa-Martínez, J.I. Jiménez-Zurdo, F. Frugier, M. Crespi, N. Toro

Desarrollo de un protocolo de transformación estable de *Podospaera fusca*, agente causal del oídio de las cucurbitáceas

D. Vela, F. López-Ruiz, A. de Vicente, J.A. Torés, A. Pérez-García

### **13:00 Clausura**

### **14:00 Almuerzo y marcha de participantes**

**Sesión I**

**BASES MOLECULARES DE LAS  
INTERACCIONES BENEFICIOSAS**





## Caracterización del gen *Thpg1* de *Trichoderma harzianum*, y estudio de su papel en la interacción *Trichoderma*-planta

M.E. Morán-Diez <sup>1\*</sup>, R. Hermosa <sup>2</sup>, P. Ambrosino <sup>3</sup>, R.E. Cardoza <sup>4</sup>, S. Gutiérrez <sup>4</sup>,  
M. Lorito <sup>3</sup> y E. Monte <sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Edificio C4 Celestino Mutis, Campus Rabanales, 14071 Córdoba, España.*

<sup>2</sup>*Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca, Campus de Villamayor, C/ Duero 12. 37185 Salamanca, España.*

<sup>3</sup>*Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA), Italia.*

<sup>4</sup>*Área de Microbiología, Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Universidad de León, Campus de Ponferrada, Avda. Astorga s/n. 24400 Ponferrada, España.*

Muchas especies del género *Trichoderma* son utilizadas como agentes de control biológico en agricultura. En este sentido, se han propuesto varios mecanismos de acción como el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por el espacio. Parte de la actividad antagonista de este agente de biocontrol está basada en la secreción de enzimas como quitinasas o glucanasas, que participan en la penetración del patógeno. Sin embargo, en los últimos años se está prestando mayor atención a la relación *Trichoderma*-planta y a aquellas enzimas que podrían afectar a ese “diálogo”. Así se han propuesto distintos mecanismos de acción como la promoción del crecimiento de la planta o la inducción de respuestas de defensa. En este último se incluirían las endopoligalacturonasas fúngicas (endoPGs), enzimas que degradan la pectina, principal componente de la pared celular vegetal. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los hongos patógenos, *Trichoderma* establece una relación simbiótica y avirulenta con la planta. En este sentido, se ha estudiado el papel que tiene un gen que codifica una endoPG en *Trichoderma* en esa interacción. Dentro del proyecto de genómica funcional TrichoEST se identificó la EST 10663, obtenida tras cultivar la cepa *T. harzianum* T34 en presencia de polímeros de planta, mostrando una alta homología con endoPGs fúngicas. El gen *Thpg1* se aisló de la cepa T34 y se ha caracterizado utilizando diferentes aproximaciones como el silenciamiento génico, el uso de microarrays de *A. thaliana* y la proteómica. Mediante transformantes silenciados en el gen *Thpg1* se ha demostrado la importancia de este gen en la colonización de raíz.

## Producción de óxido nítrico en la simbiosis *Bradyrhizobium japonicum*-*Glycine max*.

C. Sánchez<sup>1\*</sup>, T. Uchiumi<sup>2</sup>, L. Girard<sup>3</sup>, E.J. Bedmar<sup>1</sup> y M.J. Delgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P. O. Box 419, 18008-Granada, Spain; <sup>2</sup>Department of Chemistry and Bioscience, Faculty of Science, Kagoshima University, Japan; <sup>3</sup>Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, 62271, México.

*Bradyrhizobium japonicum* es capaz de desnitrificar, es decir, reducir el nitrato a nitrógeno molecular en condiciones limitantes de oxígeno, tanto en vida libre como en simbiosis con plantas de soja. En *B. japonicum* USDA110, los genes responsables de este proceso se han identificado como *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD*, y *nosRZDYFLX*, que codifican las enzimas nitrato-, nitrito-, óxido nítrico-, y óxido nitroso reductasa, respectivamente (1). Recientemente, se ha demostrado que, en respuesta a hipoxia, la reducción de nitrato por los bacteroides de los nódulos de plantas de soja contribuye a la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) (2). Sin embargo, el papel fisiológico de la producción de óxido nítrico (NO) en nódulos es aún desconocido. En este trabajo, se ha abordado el análisis de NO en nódulos mediante el empleo de la técnica de detección de fluorescencia tras incubar los mismos con DAF-FM, compuesto que se une específicamente al NO. Los resultados obtenidos han demostrado que cuando las plantas de soja se sometieron a encharcamiento, que provoca hipoxia, no sólo se produjo una inducción en la producción de NO en los nódulos, sino que además se observó, mediante RT-PCR cuantitativa, una disminución de la expresión del gen *nifH*, que codifica la ferroproteína que forma parte del complejo nitrogenasa. Cuando las plantas se inocularon con una cepa mutante en el gen *napA* y se sometieron a encharcamiento, no se observó inducción de la producción de NO en los nódulos. Al contrario de lo observado cuando las plantas se inocularon con la cepa parental, tampoco se observó disminución de la expresión de *nifH* cuando las plantas inoculadas con la cepa *napA* se sometieron a encharcamiento. Estos resultados sugieren que el NO producido, en respuesta a encharcamiento, durante el proceso de desnitrificación de los bacteroides, provoca un efecto negativo en la expresión de la nitrogenasa.

### Referencias

- 1) Bedmar, E. J., Robles, E. F., and Delgado, M. J. 2005. The complete denitrification pathway of symbiotic N-fixing bacteria *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 11-16.
- 2) Meakin, G. A., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E. J., Richardson, D. J. and Delgado, M. J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology*, 153:411-9.

Este trabajo se ha subvencionado con los Proyectos AGL2006-13848-CO2-02/AGR y CLG2006-06870/BOS concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia, con los proyectos de colaboración CSIC/Royal Society (2007GB0035) con Reino Unido y CSIC/CONACYT (2005MX0032) con México, y la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación BIO-275. Cristina Sánchez agradece al CSIC la concesión de una beca I3P.

## **Implicación de la sistemina en la formación de micorrizas arbusculares**

**I. Fernández\*, S.C. Jung, J.M. García, C. Azcón-Aguilar y M.J. Pozo**

*Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos del Suelo. Estación Experimental del Zaidín*

La sistemina es una fitohormona peptídica con un papel clave en la regulación de los mecanismos de defensa a nivel sistémico en respuesta a heridas y diversos estreses bióticos en plantas de tomate. Su función está estrechamente relacionada con el metabolismo del ácido jasmónico (JA) y las respuestas que éste regula. Se ha descrito la importancia del JA en el proceso de formación de la simbiosis mutualista micorriza arbuscular (MA) establecida entre determinados hongos del suelo y las raíces de la mayoría de las plantas. Debido al carácter regulador de la sistemina en los niveles de JA, cabe suponer un efecto de la sistemina en el establecimiento de la simbiosis. Durante el presente trabajo se realizaron diversos experimentos para determinar la influencia de la sistemina en la micorrización, y los resultados confirman que la síntesis de sistemina en la raíz es fundamental para el establecimiento, desarrollo y funcionalidad de esta simbiosis.

## La delgada línea entre simbiosis y patogénesis en las interacciones planta-microorganismo

M. Robledo<sup>1\*</sup>, L.P. Rivera<sup>1</sup>, J.I. Jiménez-Zurdo<sup>2</sup>, M.J. Soto<sup>2</sup>, E. Velázquez<sup>1</sup>, F. Dazzo<sup>3</sup>, E. Martínez-Molina<sup>1</sup> y P.F. Mateos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca

<sup>2</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, USA

Las plantas han desarrollado complejos mecanismos para defenderse durante el ataque de los microorganismos patógenos. Estas mismas rutas de defensa, como la síntesis de ácido salicílico, también pueden ser activadas por las leguminosas cuando detectan la presencia de los rizobios (Ferguson, 2003). Por ello, durante el establecimiento de una simbiosis compatible eficiente *Rhizobium*-leguminosa la bacteria debe penetrar en su hospedador evitando que se active la respuesta defensiva, ya que la producción por parte de la planta de estas sustancias puede repercutir negativamente tanto en la nodulación como en la infección (Stacey *et al.*, 2006).

Por ello, tanto la planta como las bacterias simbióticas deben modular la respuesta defensiva durante el proceso de infección, aunque los mecanismos moleculares que intervienen en dicho control aún no están bien caracterizados. En *Rhizobium* los Factores de Nodulación juegan un papel importante en el reconocimiento específico de ambos simbiosis, participando también en el control de la respuesta defensiva de la planta (Shaw y Long, 2003). Sin embargo, la detección simultánea de enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal por parte de la planta, provoca alteraciones en el proceso de infección ya que inhibe la respuesta de la raíz frente a los Factores de Nodulación (Carden y Felle, 2003).

Los rizobios, así como los microorganismos patógenos, también poseen estas enzimas hidrolíticas. La cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 produce dos isoenzimas con actividad celulásica: CelC1 y CelC2, y una con actividad pectinásica P, unidos a la célula (Mateos *et al.*, 1992). Sin embargo, su especificidad y la relativa pequeña cantidad en la que se sintetizan minimizan la hidrólisis indiscriminada y sobreextendida de la pared celular vegetal. En estudios previos hemos demostrado que la celulasa CelC2 es la responsable de hidrolizar la pared celular de la punta de los pelos radicales de trébol permitiendo al microsimbionte su entrada en la planta (Robledo *et al.*, 2008).

El objetivo de este trabajo es analizar los efectos de la sobreexpresión de la celulasa CelC2 tanto por parte de su microorganismo productor, como de la cepa E11 (caracterizada por presentar una mayor infectividad y capacidad PGPR en arroz) en su planta hospedadora *Trifolium repens*. Por otro lado, también hemos obtenido transformantes con el gen *celC2* de *Sinorhizobium meliloti* 1021, que carece de dicho gen, y analizado el fenotipo simbiótico en su hospedador habitual alfalfa así como el efecto que produce en trébol. Nuestros resultados refuerzan la importancia en la modulación de la expresión de esta enzima para que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa no se transforme en una relación de patogenicidad.

## **Inducción de PRs (Pathogenesis-Related proteins) en nódulos de *Pisum sativum* desarrollados bajo condiciones de deficiencia de boro o inducidos por mutantes en polisacáridos superficiales bacterianos.**

**M. Reguera\*, L. Bolaños e I. Bonilla**

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2, 28049-Madrid, Spain*

Durante el desarrollo de nódulos simbióticos de leguminosas, el diálogo planta-rizobio debe evitar la inducción de mecanismos de defensa. La deficiencia de boro (B) conduce a la reducción de la infección y la invasión en nódulos de leguminosas, en los que, además, se dan procesos tempranos de necrosis, lo que sugiere la activación de mecanismos de defensa por parte de la planta. Por ello, se estudió la inducción de proteínas relacionadas con patogénesis también denominadas PRs (Pathogenesis-Related proteins) en nódulos control (+B) y deficientes en boro (-B) de guisante (*Pisum sativum*). De acuerdo con los resultados del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de muestras proteicas resueltas en la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, dos proteínas citosólicas relacionadas con patogénesis, PR10.1 y ABR17, proteínas que también son inducidas por diversos estreses abióticos (salinidad sequía...), se inducían en nódulos deficientes en B. El estudio temporal a nivel proteico mediante western blot (anti-ABR17) y el análisis temporal de la expresión génica, vino a confirmar que esta proteína se inducía altamente en nódulos jóvenes deficientes de B (a partir de 1 semana), y se incrementaba durante el desarrollo del nódulo. Paralelamente, ABR17 fue inmunolocalizada en todos los tejidos de los nódulos deficientes, acumulándose especialmente en la periferia de células no infectadas y alrededor de las bacterias en las pocas células infectadas existentes. Se ha de tener en cuenta que ABR17 se expresa constitutivamente en células de raíz, pero no en partes aéreas y, pese a encontrar inducción en tejidos senescentes aéreos y bajo condiciones de estrés salino en nódulos, la señal siempre fue mucho más débil que la existente en nódulos deficientes en B. Por otro lado, ABR17 mostró una inducción similar a la existente en nódulos deficientes en B en nódulos inducidos por mutantes de rizobio con alteraciones en polisacáridos de superficie, que también presentan una inhibición de la infección. Así pues, la deficiencia en B y polisacáridos de superficie alterados, podrían perturbar el proceso comunicativo planta-bacteria, lo que resultaría en una respuesta de defensa por parte de la planta que tornaría el proceso simbiótico en una interacción de tipo patogénico.

Subvencionado por MICINN BIO2008-05736-CO2-01 y MICROAMBIENTE Comunidad de Madrid.

## Papel simbiótico de los glucanos cíclicos de *Sinorhizobium fredii* HH103.

J.C. Crespo-Rivas<sup>1\*</sup>, A. Hidalgo<sup>1</sup>, I. Margaret<sup>1</sup>, A. Buendía-Clavería<sup>1</sup>, F.J. Ollero<sup>1</sup>,  
M.A. Rodríguez<sup>2</sup>, A.M. Gil-Serrano<sup>2</sup>, J.E. Ruiz-Sainz<sup>1</sup>, J. Lloret<sup>3</sup>, S. Murdoch<sup>4</sup> y  
J.M.Vinardell<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla. <sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, Sevilla. <sup>3</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Universidad de Sevilla, Sevilla. (juacreriv@alum.us.es\*)

Una de las especies de rizobios más estudiadas por su amplio rango de nodulación es *Sinorhizobium fredii*. Esta bacteria, del mismo modo que otros rizobios, produce diversos tipos de polisacáridos superficiales que juegan un papel importante en el establecimiento de la relación simbiótica con sus leguminosas hospedadoras. Entre estos polisacáridos se encuentran los glucanos cíclicos (GC), moléculas circulares de 17 a 40 residuos de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -glucosídicos y que pueden presentar una o varias sustituciones no sacarídicas. En *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, su biosíntesis depende de NdvB, proteína que interviene en los procesos de iniciación, elongación y cierre de estas moléculas cíclicas. En este trabajo se ha aislado el gen *ndvB* de *Sinorhizobium fredii* HH103, cuya mutación produce la ausencia de GC en esta estirpe. Los resultados obtenidos indican que los GC de esta bacteria son esenciales en sus interacciones con leguminosas tanto formadoras de nódulos determinados (*Glicine max* y *Vigna unguiculata*) como formadoras de nódulos indeterminados (*Glycyrrhiza uralensis*). En todos los casos los mutantes sólo indujeron la formación de pseudonódulos, con excepción de *Vigna* donde no se observó ninguna respuesta macroscópica a la inoculación. Esta ausencia de respuestas tempranas sugería que los mutantes *ndvB* podrían estar afectados en los primeros pasos del diálogo molecular con esta leguminosa. Sin embargo, los experimentos realizados muestran que los mutantes *ndvB* de HH103 son capaces de inducir sus genes de nodulación en respuesta a flavonoides y que producen y secretan factores de nodulación. Por otro lado, se observó que la mutación del gen *ndvB* tiene diversos efectos pleiotrópicos, ya que, a pesar de que no afectó a la viabilidad de las bacterias en agua destilada, éstas mostraban una menor movilidad y una mayor producción de exopolisacáridos (EPS) que se correlaciona con una mayor expresión del gen *exoA*. Este resultado sugiere una interconexión entre las vías de síntesis del EPS y de los GC.

Se consiguió, por conjugación del cósmido pMUS909 (el cual contenía una copia silvestre del gen *ndvB*), complementar al mutante SVQ562 (*ndvB::lacZ-Gm<sup>R</sup>*). En este mutante complementado, que producía GC, se observó la recuperación de la movilidad en medio hiposmótico, la disminución en la producción de los EPS (que se correlacionó con una disminución de la expresión del gen *exoA*) así como la recuperación de la capacidad simbiótica, formando nódulos fijadores de N<sub>2</sub>, tanto en *Glicine max* como en *Vigna unguiculata*. En la actualidad se están realizando ensayos de nodulación en *Glycyrrhiza uralensis*.

## El gen *rkpM* de la región *rkp-3* de *Sinorhizobium fredii* HH103 punto en común de las rutas de biosíntesis del KPS y del LPS

I. Margaret<sup>1\*</sup>, L. Bolaños<sup>2</sup>, I. Bonilla<sup>2</sup>, A. Buendía-Clavería<sup>1</sup>, J.C. Crespo-Rivas<sup>1</sup>, A. Hidalgo<sup>1</sup>, J. Lloret<sup>2</sup>, M. Reguera<sup>2</sup>, M.A. Rodríguez Carvajal<sup>3</sup>, J.M. Vinardell<sup>1</sup> y J.E. Ruiz-Sainz<sup>1</sup>

*Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla.* <sup>2</sup>*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.* <sup>3</sup>*Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, Sevilla.* (isa\_margaret@us.es\*)

El polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS) es uno de los polisacáridos superficiales bacterianos fundamentales para el establecimiento de la simbiosis funcional entre *Sinorhizobium fredii* HH103 y sus leguminosas hospedadoras. En *S. meliloti* 1021 se han descrito tres regiones génicas implicadas en la biosíntesis de dicho polisacárido. La homología existente entre los genomas de *S. meliloti* 1021 y *S. fredii* HH103 ha permitido localizar en esta última bacteria dos de estas tres regiones. En este trabajo se realizan estudios de la región *rkp-3* de *S. fredii* HH103. Se han secuenciado 6 genes de la región *rkp-3* (*rkpLMNOPQ*) implicados en la biosíntesis de un derivado del ácido pseudoamínico, que es la subunidad de repetición del polisacárido capsular KPS de *S. fredii* HH103. Se han obtenido mutantes independientes en el gen *rkpM* de la región *rkp-3* de *S. fredii* HH103. Los estudios electroforéticos y de RMN indican que estos mutantes no sintetizan el KPS silvestre. Además, el perfil electroforético del LPS de los mutantes está alterado y no es reconocido por un anticuerpo monoclonal específico del LPS del *S. fredii* HH103. Se ha comprobado que el mutante *rkpM* es menos móvil en medio rico semisólido que la estirpe parental. Dicho mutante está gravemente afectado en su capacidad para nodular con *Glycine max* (soja) y con *Vigna unguiculata*, dos leguminosas formadoras de nódulos determinados, ya que sólo es capaz de inducir la formación de pseudonódulos y algunos pocos nódulos que no fijan nitrógeno. En *Glycyrrhiza uralensis* (leguminosa de nódulos indeterminados) se forman menos nódulos que con la estirpe parental pero éstos sí fijan nitrógeno. Estudios de expresión del gen *rkpM* mediante el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa han revelado que el gen *rkpM* no se induce por la presencia de flavonoides ni muestra diferencias significativas al cultivarse en medios con distintos pH (6, 7, 8 y 7 sin tamponar). También se han realizado ensayos de  $\beta$ -galactosidasa en medios con distinta relación C/N. Los resultados muestran una expresión máxima del gen cuando la relación C/N es baja y una mínima cuando la relación C/N aumenta, si bien las diferencias encontradas no son significativas estadísticamente. La complementación del mutante *rkpM* con un cósmido que porta la región *rkp-3* completa restituye las características de la estirpe silvestre HH103 en cuanto a movilidad, producción de KPS, recuperación del perfil de LPS, así como el reconocimiento por un anticuerpo monoclonal específico del LPS y a la capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno en la soja.

## Colonización y nodulación de plantas de alfalfa: ¿etapas necesariamente consecutivas?

J.A. López-Contreras\*, N. Toro y M. Fernández-López

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, calle Profesor Albareda 1, E- 18008 Granada, España.*

*\*joseantonio.lopez@eez.csic.es*

En los suelos de zonas de clima mediterráneo la productividad de los cultivos está limitada, entre otros factores, por la sequía, las heladas y la salinidad. El uso de bacterias beneficiosas asociadas a la raíz de plantas de interés agronómico, puede ser una de las estrategias de mejora del rendimiento de cosecha en estas zonas. De esta manera, es necesaria la búsqueda de cepas naturales, competitivas en la rizosfera de la planta de interés, que minimicen los efectos adversos de las condiciones ambientales. La competitividad o mejor adaptación de una cepa, se puede determinar *a priori* estudiando las capacidades de adhesión y colonización de la raíz, y/o la nodulación en el caso concreto de plantas leguminosas.

Por ello, hemos estudiado una colección de cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas en la región del Mar de Aral en suelos degradados con alto contenido en sales, xenobióticos y otros contaminantes. En primer lugar, se realizó un perfil genético de todas las cepas utilizando la secuencia de inserción *ISRm2011-2* y el intrón del grupo II, *RmInt1*. Tras ello, se estudió la competitividad de estas cepas mediante su inoculación en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) mezclando las 40 cepas. Las plantas se crecieron en solución nutritiva con 0, 25, 50, 75 y 100 mM de NaCl, y se procedió a aislar los primeros nódulos que aparecieron en cada condición; determinándose las cepas que originaron cada uno por comparación con su perfil de huella genética. Del conjunto de cepas estudiadas, se seleccionaron los aislados AK17, AK21, AK27 y AK100 para la realización de un estudio más detallado.

Posteriormente se determinó la capacidad de adhesión (5 h.) y colonización (20 h.) de cada cepa sobre raíces de plantas de alfalfa crecidas en presencia de 0, 50 y 100 mM de NaCl, mediante el conteo de unidades formadoras de colonias, UFC. Además los ensayos se realizaron obteniendo los inóculos de las cepas bacterianas en medio TY con 0 y 50 mM de NaCl por condición. Los resultados mostraron que no se produjo un incremento en el número de UFC a 20 h. respecto a los valores obtenidos en 5 h., independientemente de cual fuera la condición ensayada. Además se determinó la cinética de nodulación durante los 35 días posteriores a la inoculación, en condiciones similares a los ensayos de adhesión/colonización. Los resultados mostraron que independientemente de las condiciones de crecimiento de las plantas, en presencia o ausencia de NaCl, uno de los aislados se comportó de igual forma, no afectando la presencia de sal al proceso de nodulación. Finalmente se determinó el peso fresco de tallo y raíz de todas las plantas de alfalfa.



## **Análisis global de la interacción planta-*Pseudomonas putida* en la rizosfera: colonización y resistencia sistémica inducida**

**M.A. Matilla-Vázquez\*, J.L. Ramos, P.A.H.M. Bakker, M.L. Travieso y  
M.I. Ramos-González**

*Departamento de Protección Ambiental. Estación Experimental del Zaidín-CSIC. Granada*

*Pseudomonas putida* KT2440 se aisló de un campo de cultivo y es un buen colonizador de la rizosfera y espermosfera tanto de plantas con relevancia agronómica como de interés básico (*Arabidopsis thaliana*). En nuestro grupo de investigación se ha llevado a acabo el primer análisis genómico de una bacteria en la rizosfera, que nos está permitiendo abordar el estudio de cómo una bacteria ajusta su programación genética a este estilo de vida. Este análisis incluyó tres condiciones control que cubren una variedad de nutrientes, fases de crecimiento y estilos de vida, pudiéndose identificar un total de noventa genes *rup* (rhizosphere up-regulated genes), consistentemente inducidos en la rizosfera. De especial interés en este estudio han resultado una exoproteína de función desconocida con actividad peroxidasa y un regulador de respuesta GGDEF/EAL, con dominios implicados en la síntesis y degradación de diguanilato cíclico (c-di-GMP), respectivamente. Se conoce que el segundo mensajero bacteriano c-di-GMP regula diferentes procesos celulares relacionados con la transición de un estilo de vida planctónica a sésil, tales como movilidad, formación de biofilm o producción de exopolisacáridos. En una posterior caracterización de los genes *rup* hemos encontrado que algunos mutantes en estos genes están afectados en su eficiencia competitiva en la rizosfera. Una buena eficiencia colonizadora es relevante para la estimulación del crecimiento vegetal o el biocontrol. En este último aspecto, es importante destacar la capacidad de KT2440 para desencadenar resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas, proceso por el cual, después de una colonización eficaz de la raíz, se estimularían mecanismos de defensa de la planta frente a determinados fitopatógenos. Tomando como sistema modelo la infección de *Arabidopsis* por el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 se han identificado algunos elicitores de ISR en la bacteria KT2440 que están codificados por genes *rup*. De especial interés resulta que la cepa silvestre imprima una huella específica a los exudados de *Arabidopsis*, que no se observa en el caso de una cepa bacteriana mutante deficiente en el establecimiento de ISR.

## **Análisis transcriptómico del swarming dependiente del gen *fadD* en *Sinorhizobium meliloti***

**J. Nogales\*, A. Domínguez-Ferreras, C.V. Amaya-Gómez, V. Cuéllar, J. Sanjuán, J. Olivares y M.J. Soto**

*Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos del Suelo, Estación Experimental del Zaidín, CSIC Granada.*

El swarming es un tipo de translocación bacteriana caracterizada por el movimiento rápido y coordinado de una población bacteriana sobre una superficie semisólida. Este tipo de motilidad, generalmente dependiente de flagelos, requiere un proceso de diferenciación celular disparado por determinadas condiciones medioambientales y/o fisiológicas. Es conocida la estrecha conexión entre swarming y la virulencia de bacterias patógenas. La diferenciación asociada a este tipo de translocación conlleva la expresión acoplada de factores de virulencia, y mutaciones que afectan al swarming, generalmente tienden a reducir la capacidad invasiva de la bacteria.

La capacidad de mostrar swarming se ha puesto de manifiesto en varios rizobios, pero en general se desconocen las señales y genes que participan en este proceso. En *Sinorhizobium meliloti*, el simbiote habitual de alfalfa, la migración multicelular se ha detectado en un mutante en el gen *fadD* cuyo producto está implicado en metabolismo lipídico (Soto et al. (2002) Mol. Microbiol. 152: 3167-3174).

Con objeto de analizar qué genes pueden ver alterada su expresión durante el proceso de diferenciación que conlleva el swarming e identificar genes que potencialmente puedan ser importantes en el proceso de colonización e infección de la leguminosa, hemos determinado y comparado el transcriptoma de *S. meliloti fadD* en condiciones inductoras de swarming (medio semisólido, 0.6% agar) y no inductoras (medio líquido y sólido, 1.3% agar). Para ello se han utilizado los microarrays Sm6kOligo de *S. meliloti* 1021.

Nuestros resultados sugieren que la fisiología de *S. meliloti* cuando crece sobre una superficie es significativamente distinta de la mostrada cuando lo hace en medio líquido, con más de 1000 genes que ven alterada su expresión. Entre los genes inducidos como consecuencia del crecimiento sobre una superficie se encuentran genes de motilidad y quimiotaxis, genes del metabolismo general, genes de síntesis de polisacáridos superficiales, así como genes con función en respuesta a estrés. En condiciones específicas de swarming, sólo 99 genes vieron alterada su expresión. La función de la mayoría de estos genes se desconoce, aunque destaca la inducción de genes relacionados con la captación y metabolismo del hierro. Actualmente, estamos analizando la función de estos genes tanto en la aparición de swarming en *S. meliloti* como en el establecimiento de simbiosis con alfalfa.

## **LapF, una adhesina de gran tamaño implicada en la interacción de *Pseudomonas putida* con plantas**

**M. Martínez-Gil\*, F. Yousef-Coronado y M. Espinosa-Urgel**

*Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada.*

Nuestro laboratorio viene trabajando desde hace varios años en el estudio de los mecanismos moleculares de adhesión bacteriana a superficies vegetales, empleando como modelo la cepa *Pseudomonas putida* KT2440, una excelente colonizadora de la rizosfera de distintas plantas. Uno de los aspectos más destacados hasta la fecha ha sido la caracterización de la proteína LapA, una de las mayores proteínas procarióticas (más de 8600 aminoácidos), con un papel esencial en adhesión a semillas, colonización de raíces y formación de biofilms sobre superficies abióticas, constituyendo por tanto una de las primeras adhesinas multifuncionales descritas hasta la fecha en bacterias Gram-negativas. Hemos identificado también una segunda proteína de gran tamaño (6300 aminoácidos), que hemos denominado LapF. Un mutante en el gen *lapF* se comporta de forma similar a la cepa silvestre en condiciones de laboratorio pero presenta reducida capacidad de adhesión a semillas y está afectado en colonización competitiva de la rizosfera y en el desarrollo de biofilms sobre superficies abióticas (vidrio) en condiciones de flujo. La proteína LapF está relacionada con LapA, perteneciendo ambas a una familia de adhesinas multidominio de gran tamaño de estructura repetitiva. En el caso de LapF, se pueden distinguir 3 dominios, uno de ellos correspondiente a 63 repeticiones imperfectas de 86-93 aminoácidos, y otro con sitios de unión a calcio. De hecho, hemos comprobado que el calcio promueve al adhesión de *P. putida* a superficies sólidas. No existen proteínas homólogas a LapF en otras especies de *Pseudomonas*, lo que sugiere que esta adhesina podría mediar la interacción específica de *P. putida* KT2440 con superficies vegetales y/o interacciones célula-célula especie-específicas. Mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos frente a LapF, hemos comprobado que esta proteína se exporta a la superficie de la bacteria, y que el extremo C-terminal es esencial para su secreción. La estructura de la región cromosómica donde se encuentra *lapF* indica que su translocación podría depender de un transportador de tipo ABC adyacente, de manera similar a lo que ocurre con LapA. Actualmente estamos comprobando la función de este posible transportador y el patrón de expresión de *lapF*.

## **Papel central de los lipopolisacáridos en la formación de biopelículas en el agente de biocontrol K84**

**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)*

*Agrobacterium* spp. es una bacteria rizosférica que causa tumores en gran cantidad de plantas cultivadas, enfermedad conocida en inglés como “crown gall”. Esta enfermedad puede ser eficazmente controlada mediante la aplicación preventiva en las raíces del agente de biocontrol K84, que coloniza eficazmente y forma complejas estructuras multicelulares sobre la superficie de raíces. En estudios previos, hemos demostrado la capacidad de esta bacteria para formar biopelículas tanto sobre materiales inertes (como el polipropileno), como sobre fragmentos de raíz. La cepa K84 se une firmemente y forma biopelícula en placas de polipropileno, además coloniza eficazmente y forma complejas estructuras multicelulares sobre la superficie de raíces. La capacidad de formación de estas biopelículas colonizando las raíces puede ser un factor importante en su éxito como agente de biocontrol de la rizosfera. Con el propósito de conocer los determinantes genéticos implicados en la formación de biopelículas, hemos analizado una librería de mutagénesis de la cepa K84 en cuanto a la formación de biopelícula en placas de polipropileno. Se identificaron dos mutantes afectados en la formación de biopelículas. Uno de ellos es incapaz de unirse y formar biopelícula en las paredes del polipropileno, pero por el contrario se une y forma biopelícula sobre la superficie de ápices radiculares. El gen interrumpido en este mutante es un ortólogo del gen *wcbD*, implicado en el transporte de lipopolisacáridos (LPSs) capsulares de tipo 2. La expresión de una copia funcional de este gen en el mutante restauró la capacidad de unirse y producir biopelícula sobre la superficie abiótica. El otro mutante identificado produce más biopelícula que la cepa K84 tanto sobre el polipropileno, como sobre la superficie de ápices radiculares. El gen interrumpido en este mutante es el gen *rkpK*, implicado en la síntesis de lipopolisacáridos LPSs en la familia de la rhizobiáceas. El análisis de los lipopolisacáridos LPSs de este mutante muestran una clara alteración en su composición respecto a la del lipopolisacárido LPS de la cepa K84. Por tanto, los mutantes obtenidos demuestran un papel central de los lipopolisacáridos LPSs de K84 en las primeras fases de unión y formación de biopelícula en sobre superficies inertes.

## Señalización en la regulación del movimiento y formación de biopelículas en *Pseudomonas fluorescens* F113

A. Navazo\*<sup>1,2</sup>, E. Barahona<sup>1</sup>, M. Redondo-Nieto<sup>1</sup>, F. Martínez-Granero<sup>1</sup>, F. Yousef<sup>2</sup>, J.D. Alche<sup>2</sup>, M. Espinosa-Urgel<sup>2</sup>, M. Martín<sup>1</sup> y R. Rivilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>2</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

Los niveles intracelulares de bis-(2',5')- monofosfato de guanósina cíclico (di-GMPc), un segundo mensajero muy importante en bacterias, determina dos estilos de vida contrapuestos: libre o planctónico y sésil o de formación de biopelículas. En nuestro laboratorio se han identificado varios genes implicados en la regulación de la movilidad en la cepa *Pseudomonas fluorescens* F113, como son: el sistema de dos componentes *gacA/gacS*, *sadB* y *wspR*. La construcción de mutantes simples, dobles y un triple mutante en los genes *gacS sadB wspR* (GSW), y el análisis fenotípico de su movilidad, muestra la independencia de las tres rutas en las que estos genes se encuentran implicados, ya que el triple mutante GSW presenta una movilidad mayor al 300% con respecto a la estirpe silvestre. Las rutas en las que participan GacS y SadB reprimen la movilidad a través del regulador principal de la biosíntesis del flagelo: FleQ; mientras que el operón *wspABCDEFR* (del que forma parte WspR) actuaría aumentando los niveles intracelulares de di-GMPc, y de un modo aún no conocido, reprimiría la movilidad. Además, todos los mutantes ven reducida su capacidad formadora de biopelículas, característica más acusada en el caso del triple mutante, lo que corrobora la relación inversa en la regulación de los dos estilos de vida. Es muy importante por tanto, destacar, que el triple mutante desplaza a la estirpe silvestre en ensayos de colonización competitiva de la rizosfera.



**Sesión II**

**ESTRÉS, MECANISMOS  
DE RESISTENCIA Y ADAPTACIÓN**





## **Efecto de distintos desinfectantes en la supervivencia de *Erwinia amylovora* en agua**

**R.D. Santander<sup>1\*</sup>, J. Catalá-Senent<sup>1</sup>, I. Ferrer<sup>1</sup>, M. Ordax<sup>2</sup>, E. Marco-Noales<sup>2</sup>,  
M.M. López<sup>2</sup> y E.G. Biosca<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, C/ Dr. Moliner, 50. Burjassot 46100, Valencia. elena.biosca@uv.es*

<sup>2</sup>*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Ctra. Moncada-Náquera km 4,5, Moncada 46113, Valencia.*

*Erwinia amylovora* es el agente causal del fuego bacteriano, una grave enfermedad que produce serias pérdidas económicas en todo el mundo y afecta a plantas de la familia de las rosáceas, incluyendo árboles frutales, como el manzano y el peral, y plantas ornamentales. El fuego bacteriano es altamente contagioso y su control es complejo, lo que se ha relacionado con la capacidad de supervivencia y diseminación de *E. amylovora* en distintos medios. Sin embargo, la información disponible sobre la supervivencia de esta bacteria fuera de hospedadores susceptibles es todavía escasa. Recientemente hemos demostrado que *E. amylovora* es capaz de sobrevivir y mantener su poder patógeno en agua natural en presencia de la microbiota autóctona, por lo que el riesgo de diseminación de este patógeno a través del agua existe. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la capacidad de supervivencia de *E. amylovora* en agua tras exposición a distintos desinfectantes, para prevenir, o al menos reducir, su diseminación por este medio. Se prepararon microcosmos de agua estéril que se inocularon con la cepa de referencia de *E. amylovora* CFBP 1430 a una concentración de  $10^8$  u.f.c./ml, y se trataron por separado durante distintos tiempos con diferentes concentraciones de hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno o ácido acético, utilizando agua esterilizada sin tratar como control. El seguimiento de las poblaciones bacterianas se realizó mediante recuentos de células cultivables en el medio sólido King B, y de células viables y totales mediante microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo tras tinción con el kit de viabilidad Live & Dead. Además, se ensayó la posible recuperación de células estresadas en medio líquido King B, así como el poder patógeno de dichas células y/o las recuperadas. Los resultados han mostrado una pérdida de cultivabilidad pronunciada en los microcosmos de agua tratada con los distintos desinfectantes, mayor conforme aumentó la concentración y el tiempo de exposición. También se observó una pérdida de viabilidad, pero menos marcada que la de cultivabilidad, mientras que los recuentos de células totales se mantuvieron constantes a lo largo del experimento. Por lo tanto, los resultados indican que *E. amylovora* es capaz de sobrevivir en agua tratada, tras periodos variables a las concentraciones ensayadas de los desinfectantes utilizados, adoptando el estado Viable No Cultivable (VNC). Además, en condiciones favorables, como cuando hay un aporte de nutrientes, *E. amylovora* recuperó su cultivabilidad y la capacidad de producir síntomas, al menos tras contactos cortos con los desinfectantes. Puesto que los resultados obtenidos demuestran el riesgo de diseminación de *E. amylovora* a través del agua, este hecho debería tenerse en cuenta para optimizar las medidas de prevención y control integrado del fuego bacteriano.

## **Aumento de la resistencia a estreses abióticos en plantas y hongos mediante la sobreexpresión del gen *hsp70* de *Trichoderma harzianum***

**M. Montero-Barrientos<sup>1</sup>, C. Nicolás<sup>2</sup>, R.E. Cardoza<sup>3</sup>, S. Gutiérrez<sup>3</sup>, E. Monte<sup>1</sup> y R. Hermosa<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.*

<sup>2</sup>*Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.*

<sup>3</sup>*Escuela Universitaria de Ingeniería Agrícola, Área de Microbiología, Universidad de León.*

Las proteínas de choque térmico (HSPs) actúan como chaperonas moleculares en condiciones de estrés y, en particular, las HSP70 han sido relacionadas con la adquisición de termotolerancia en todos los eucariotas. Para investigar la posible función de este tipo de proteínas en un agente de control biológico se realizó el aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *hsp70* de *Trichoderma harzianum*. El perfil de expresión de este gen se evaluó cultivando el hongo en condiciones de estrés abiótico, observándose un incremento en los niveles de transcrito a 37 ó 41 °C así como en presencia de agentes oxidantes y osmóticos. La sobreexpresión del gen *hsp70* en *T. harzianum* dio lugar a transformantes que acumulaban mayores cantidades de biomasa que la cepa silvestre tras un choque térmico. Además, estos transformantes mostraron mayor resistencia que la cepa silvestre al estrés osmótico, oxidativo y salino después de un tratamiento previo de 45°C durante 2 horas.

El gen *hsp70* de *T. harzianum* se expresó en plantas de *Arabidopsis thaliana* y las líneas transgénicas obtenidas mostraron mayor resistencia a temperaturas extremas que la línea silvestre. Resultados similares se obtuvieron en otras condiciones de estrés, como oxidativo, osmótico o salino, cuando las semillas previamente se mantenían a 45°C durante 2 horas.

Los resultados, tomados en conjunto, indican que el gen *hsp70* tiene un papel importante en la adquisición de tolerancia a temperaturas extremas y otros tipos de estrés abiótico.

# Resistencia a compuestos antimicrobianos vegetales en bacterias patógenas de plantas

P. Vargas\*, A. Felipe y M.T. Gallegos

*Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Granada.*

Los microorganismos asociados a plantas superiores están expuestos a metabolitos secundarios sintetizados por las mismas e implicados en la respuesta de defensa frente a patógenos. Sin embargo, existen bacterias resistentes a la acción de estos compuestos porque han desarrollado mecanismos protectores: el método más efectivo y extendido de resistencia microbiana es la extrusión de compuestos tóxicos mediante transportadores de amplio espectro en un proceso dependiente de energía. Estos transportadores pueden ser específicos para un sustrato o pueden transportar una gama de compuestos estructuralmente diferentes (*multidrug transporters*).

Hasta el momento, se han caracterizado un número limitado de transportadores que confieren multiresistencia en bacterias fitopatógenas y se ha establecido la presencia y el papel protector de bombas de tipo RND en muchos patógenos bacterianos. Sin embargo, el conocimiento es escaso en *P. syringae*.

El objetivo de este estudio es la caracterización fisiológica y molecular del transportador de tipo RND MexAB-OprM de *P. syringae* pv. tomato DC3000 y el análisis de su posible función en la resistencia a compuestos antimicrobianos y en el proceso de infección de plantas. El sistema RND objeto de estudio comprende los ORFs PSPTO\_4303, PSPTO\_4304 y PSPTO\_4305, denominados *mexA*, *mexB* y *oprM*, respectivamente. En 5' con respecto a los genes estructurales *mexAB-oprM*, se encuentra el ORF PSPTO\_4302 que codifica para un regulador (*pmeR*) con un alto grado de identidad con miembros de la familia de reguladores transcripcionales TetR que se transcribe en sentido opuesto a los genes estructurales. Este transportador se encuentra presente en todas cepas de *P. syringae* secuenciadas: pv. *phaseolicola* 1448A, pv. *syringae* B728a y pv. *tomato* DC3000.

Con respecto al papel de MexAB-OprM en el proceso de infección de plantas, el análisis de la evolución de síntomas inducidos por los mutantes carentes de MexAB-OprM en plantas hospedadoras (en comparación con las cepas parentales) y el seguimiento de las poblaciones bacterianas en las mismas, ha permitido establecer que el mutante está afectado en su capacidad para multiplicarse en la planta y causar síntomas.

Para caracterizar funcionalmente el transportador MexAB-OprM, estamos determinando el perfil de sustratos que expulsa y analizando la expresión y regulación del operón que lo codifica, tanto *in vivo* como *in vitro*. La determinación de MICs revela que, en ausencia de la bomba MexAB-OprM, aumenta la sensibilidad de la cepa mutante DC3000 $\Delta$ *mexAB-oprM* a un gran número de compuestos antimicrobianos en comparación con la cepa silvestre. Por otra parte, en la cepa  $\Delta$ *pmeR* (mutante deficiente en el regulador PmeR) se observó que los valores de MIC para la mayoría de los compuestos ensayados eran superiores a los de la cepa silvestre. Estos resultados, junto con ensayos de expresión de los promotores P<sub>A</sub> y P<sub>R</sub> llevados a cabo en las cepas silvestre y  $\Delta$ *pmeR*, sugieren que este regulador es un represor que controla la expresión del operón *mexAB-oprM*.

## **Sistemas MDR en *Dickeya dadantii*: análisis genómico, identificación y estudio de su papel en patogénesis.**

**J. Larenas Keymer, I. Del Rio Alvarez, F. Abascal, J.J. Rodríguez-Herva\*,  
P. Rodríguez-Palenzuela y E. López-Solanilla**

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid*

*Dickeya dadantii* es uno de los principales agentes causales de la podredumbre blanda de los vegetales, una enfermedad que se produce típicamente en post-cosecha y que causa graves pérdidas económicas en todo el mundo. A lo largo de las últimas décadas se han caracterizado, a nivel molecular, diversos factores responsables de la virulencia de esta bacteria, entre los que cabe destacar la producción de enzimas hidrolíticas (principalmente pectato-liasas) que atacan a la pared celular vegetal, la captación de hierro mediante sideróforos, un sistema de secreción tipo III. Por otro lado, del mismo modo que las plantas sintetizan distintos metabolitos secundarios, como fitoalexinas y alcaloides, para protegerse de los agentes patógenos, éstos también han desarrollado diferentes sistemas de resistencia frente a dichas sustancias tóxicas producidas por la planta. Así, por ejemplo, entre los mecanismos de este tipo que contribuyen a la virulencia de *D. dadantii* destacan el sistema Sap, responsable de la resistencia a péptidos antimicrobianos, y los sistemas de resistencia a múltiples drogas (“multidrug resistance systems”, MDR) mediados por bombas de extrusión. Dichos sistemas están bien conservados desde el punto de vista evolutivo y poseen una gran importancia en diferentes contextos microbiológicos.

Trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto la importancia de varios de estos sistemas MDR en los mecanismos de patogénesis de dicha bacteria (Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:607). Con objeto de profundizar en el estudio de dichos sistemas MDR, nuestro grupo de investigación ha realizado un análisis sistemático para identificar y analizar la contribución de los mismos a la virulencia de *D. dadantii*. Para ello, se ha abordado la búsqueda de todos los sistemas MDR en el genoma de *D. dadantii* basándose en los datos existentes sobre éstos en otras bacterias y diseñando los algoritmos necesarios para sistematizar su identificación. De esta forma, se han predicho nueve genes para la familia RND, sesenta y tres genes para la familia MFS, un gen para la familia SMR, cinco genes para la familia MatE, dieciséis genes para la familia HlyD y ocho genes para la familia OEP.

Por otro lado, con objeto de analizar la función concreta de estos sistemas en el contexto de la virulencia de *D. dadantii*, se ha construido una mutateca de aproximadamente seis mil mutantes por inserción al azar en el genoma de dicha bacteria, de un transposón que porta un gen de resistencia a espectinomicina junto con un gen indicador desprovisto de promotor, que codifica la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa (GUS). Dicha mutateca está siendo de gran utilidad para facilitar el aislamiento de mutantes en cada uno de los genes identificados, así como en posibles genes reguladores de los mismos. El fenotipo de varios de los mutantes aislados se está caracterizando en la actualidad.

Análogamente, también se han realizado análisis genómicos similares en otras dos especies bacterianas fitopatógenas: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

## Mecanismos de adaptación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares a niveles tóxicos de Cu

K. Benabdellah\*, C. Azcón-Aguilar y N. Ferrol

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada*

El Cu es un micronutriente esencial para el desarrollo de todos los organismos; sin embargo, resulta tóxico a altas concentraciones. La toxicidad se debe a que el exceso de Cu se une a los grupos sulfhidrilo de las proteínas, a que desplaza a otros elementos esenciales y a que, mediante autooxidación o participación en reacciones tipo Fenton, da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno. Debido a que el Cu no es biodegradable, su acumulación tiene un impacto negativo sobre los microorganismos del suelo y, en consecuencia, sobre el funcionamiento de los agrosistemas y ecosistemas naturales. Sin embargo, algunos microorganismos han desarrollado mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir y desarrollarse en suelos con altas concentraciones de Cu. Entre estos microorganismos son protagonistas destacados los hongos formadores de micorrizas arbusculares (hongos MA), ya que están presentes en la mayoría de los suelos y desarrollan un amplio espectro de actividades. Los hongos MA son biotrofos obligados que pertenecen al phylum Glomeromycota y establecen asociaciones simbióticas mutualistas con la mayoría de las plantas. El principal beneficio que la planta recibe del desarrollo de la simbiosis consiste en una mejora de su nutrición mineral; sin embargo, en suelos contaminados por metales pesados, los hongos MA también alivian los efectos tóxicos que éstos ejercen sobre la planta. Aunque los mecanismos subyacentes de estos efectos se desconocen, parece ser que se deben fundamentalmente a la capacidad del hongo de retener e inmovilizar parte del metal. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que uno de los mecanismos responsables del mantenimiento de la homeostasis de Cu en los hongos MA consiste en una acumulación del exceso del metal en las vacuolas y en algunas esporas de la colonia fúngica. El objetivo del presente trabajo consistió en analizar los mecanismos moleculares de adaptación de los hongos MA a altas concentraciones de Cu. Para ello, hemos explorado las bases de datos públicas de ESTs (*expressed sequence tags*) del hongo MA *Glomus intraradices* y construido genotecas substractivas de ADNc de *G. intraradices* desarrollado en presencia de concentraciones óptimas y tóxicas de Cu. Concretamente, hemos identificado y caracterizado un gen (*GintHMA1*) que codifica una ATPasa de tipo P. *GintHMA1* muestra gran similitud con los transportadores de cobre de otros organismos y presenta tres dominios de unión a metales (MTCXXC) en su extremo amino-terminal, claves para la unión y posterior transporte del Cu fuera del citosol. El análisis de la regulación transcripcional de *GintHMA1* por Cu junto con la localización de su producto génico indica que esta proteína estaría implicada en la detoxificación del exceso de Cu citosólico mediante su transporte hacia las vacuolas. Por otra parte, hemos identificado varios genes que codifican proteínas antioxidantes. Concretamente, hemos caracterizado una glutaredoxina (*GintGRX1*) y una proteína implicada en la síntesis de la vitamina B6 (*GintPDX1*), que estarían implicadas en combatir el estrés oxidativo producido por el Cu en el hongo y/o en la reparación del daño oxidativo inducido por el metal.

## Bases moleculares de la resistencia a fungicidas DMI en oídio de las cucurbitáceas

F.J. López-Ruiz<sup>1,2\*</sup>, C.J. Ridout<sup>2</sup>, L. Chartrain<sup>2</sup>, J.A. Torés<sup>1</sup>, J.K.M. Brown<sup>2</sup>  
y A. Pérez-García<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), Algarrobo-Costa, 29750 Málaga <sup>2</sup>Disease and Stress Biology Department, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK

<sup>3</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada al CSIC, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga

Uno de los principales factores limitantes para la producción de cucurbitáceas a nivel mundial es el oídio causado por *Podosphaera fusca*. El control de la enfermedad se basa fundamentalmente en el empleo de fungicidas, entre los que destaca el grupo de los inhibidores de la enzima C14 $\alpha$ -dometilasa o fungicidas DMI. En los últimos años en España la aparición de cepas con una baja sensibilidad a DMI ha provocado el aumento del número de aplicaciones con el consiguiente incremento en el gasto y riesgo para el consumidor, y en algunos casos, el fracaso total de estos tratamientos en el control de la enfermedad. Por ello, el principal objetivo de este estudio es determinar las bases moleculares de la resistencia a DMI en *P. fusca*, puesto que el conocimiento detallado del origen de una resistencia es información imprescindible para el diseño de medidas de anti-resistencia realmente eficaces. Teniendo en cuenta las bases de la resistencia a DMI en otros hongos, la hipótesis de partida de este trabajo fue determinar si cambios estructurales en la diana del fungicida, la enzima C14 $\alpha$ -dometilasa (CYP51), o en sus niveles de expresión, eran los responsables de la variación en la sensibilidad de los aislados de *P. fusca* a los fungicidas DMI. Para ello se analizaron secuencias del promotor y de la región codificante del gen *PfCYP51* de 50 aislados procedentes de diferentes localizaciones y con distintas sensibilidades a fungicidas DMI. Dicho análisis reveló la existencia de un elemento transponible en la región 5' del promotor, así como 4 sustituciones de aminoácidos no sinónimas en dominios de la enzima relacionados con la unión al sustrato y la catálisis. Los aislados fueron clasificados en base a tres haplotipos básicos y se puso de manifiesto la existencia de niveles de sensibilidad distintos en cada uno de estos tres grupos. Utilizando la estructura cristalina de la proteína MtCYP51 de *Mycobacterium tuberculosis* como referencia, se modeló la enzima de *P. fusca* y se introdujeron las sustituciones detectadas en el modelo, mostrándose que todas ellas se distribuían en el canal que da acceso al centro catalítico de la enzima. Entre éstas destaca la sustitución A373S detectada en los aislados con la resistencia más elevada que podría estar relacionada con el anclaje del ligando al grupo hemo de la enzima, grupo prostético responsable de la catálisis. Estos resultados sugieren una posible relación entre cambios estructurales en la proteína y los distintos niveles de resistencia a DMI observados en *P. fusca*. Para determinar la contribución de estas mutaciones a la resistencia y ante la ausencia de un sistema de transformación para *P. fusca*, los tres haplotipos identificados de *PfCYP51* serán introducidos en levadura. Finalmente, el análisis de la expresión de *PfCYP51* mediante PCR cuantitativa llevado a cabo con un grupo seleccionado de aislados parece indicar que en *P. fusca* no existe relación entre la expresión de *PfCYP51* y la resistencia a DMI.

## **Papel de la proteína de Rieske en la resistencia a fungicidas QoI en *Podosphaera fusca***

**D. Bellón<sup>1\*</sup>, J. A. Torés<sup>1</sup>, D. Fernández-Ortuño<sup>1</sup> y A. Pérez García<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), Algarrobo-Costa, 29750 Málaga

<sup>2</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada al CSIC, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga

En España el cultivo de las cucurbitáceas es de especial interés por su gran extensión e importancia económica. Uno de los factores más importantes que limitan la producción de estos cultivos en todo el mundo es el hongo biotrofo *Podosphaera fusca*, el principal agente causal del oídio de cucurbitáceas. Actualmente el control de oídio de cucurbitáceas es altamente dependiente de productos fitosanitarios. Desgraciadamente, el empleo excesivo de fungicidas conlleva el importante problema de desarrollo de resistencias por parte de los patógenos, problema especialmente grave en productos con dianas muy específicas. Los fungicidas QoI (inhibidores de la quinona externa) como las estrobilurinas, son fungicidas de acción específica, que actúan sobre el complejo enzimático citocromo *bc<sub>1</sub>* de la cadena de transporte de electrónico mitocondrial, uniéndose al centro Qo de dicho complejo, lo que se traduce en el bloqueo de la transferencia de electrones y la inhibición de la síntesis de ATP. En trabajos previos de nuestro grupo se han detectado frecuencias de resistencia a estrobilurinas muy elevadas entre aislados de *P. fusca* obtenidos de cultivos de cucurbitáceas de la mitad sur de España, que en todos los casos mostraban altos niveles de resistencia a las estrobilurinas ensayadas (resistencia cruzada). Estos datos apuntaban hacia un mecanismo de resistencia común y presumiblemente basado en una modificación de la diana del fungicida. El análisis molecular del dominio Qo de citocromo *b* de un elevado número de aislados ha permitido descartar el papel del cambio G143A como el principal responsable de los altos niveles de resistencia a estrobilurinas observados en estos aislados a diferencia de lo previamente descrito en la bibliografía. Descartado el papel de citocromo *b* en la resistencia y teniendo en cuenta que el centro Qo esta constituido además de citocromo *b* por otra proteína, la proteína sulfoférrica de Rieske (ISP), el objetivo de este trabajo es el aislamiento y caracterización del gen *ISP* de *P. fusca* a partir de una colección de aislados sensibles y resistentes a estrobilurinas para la identificación de posibles cambios de aminoácidos que correlacionen con la resistencia. En primer lugar se procedió al aislamiento de DNA genómico a partir de cepas de *P. fusca* crecidas sobre cotiledones de calabacín. A partir de dominios conservados de la proteína ISP se diseñaron cebadores degenerados que permitieron la amplificación de un fragmento de 762 pb del gen *ISP* de *P. fusca*. Esta secuencia está siendo usada como punto de partida para el aislamiento de secuencias flanqueantes. Una vez obtenida la secuencia codificante, se diseñarán cebadores que permitan la fácil comparación del gen *ISP* de cepas sensibles y resistentes a estrobilurinas. Todo ello con el objeto de poder diseñar técnicas de diagnóstico rápido de la resistencia que permitan desarrollar programas de control de enfermedad más eficaces.

## **Efecto de la luz y temperatura en la producción de conidias del hongo *Stemphylium vesicarium*, bajo condiciones controladas.**

**A. Vilardell\*, E. Montesinos e I. Llorente**

*Institut de Tecnologia Agroalimentària- CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Av. Lluís Santaló s/n 17071 (Girona). E-mail: Isidre.llorente@udg.edu*

La estemfiliosis del peral es la enfermedad causada por el hongo deuteromiceto *Stemphylium vesicarium* y es una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del peral en determinadas zonas frutícolas Europeas. La utilización de modelos de predicción para guiar los tratamientos fungicidas, aunque permiten un ahorro medio del 30% de las aplicaciones, podría optimizarse con el conocimiento de los momentos en los que se producen las emisiones de esporas de *S. vesicarium*.

El presente estudio se centró en los parámetros ambientales claves para la producción de esporas, con el objetivo principal de elaborar un modelo de esporulación. Primeramente, se puso a punto una metodología de extracción y cuantificación de las conidias de *S. vesicarium*. Posteriormente se determinó el efecto de la luz en la esporulación realizándose varios experimentos con cultivos del hongo en placa Petri bajo condiciones controladas. Se evaluó el efecto del fotoperíodo (oscuridad continua, luz continua, 6 horas de luz seguidas de 18 de oscuridad y 12 horas de luz seguidas de 12 de oscuridad) en la esporulación, observándose que el efecto del fotoperíodo no es significativo en el crecimiento de las colonias del hongo pero sí en la producción de conidias. Además se determinó el efecto de la temperatura en la esporulación utilizando discos de hoja de peral con infecciones del hongo y incubados en placa petri bajo diferentes temperaturas (5, 10, 15, 22.5 y 27 °C) y con un fotoperíodo de 12 h y humectación. La producción de conidias fue significativamente mayor a 22.5 °C que en el resto de temperaturas ensayadas. No obstante se determinó que el efecto de la luz en la esporulación dependía no solo de su intensidad sino también de su espectro, por lo que se procedió a determinar la relación existente entre la esporulación y diferentes intensidades y espectros de luz visible.

Financiado por el proyecto MEC AGL2006-049877AGR



**Sesión III**  
**ECOLOGÍA**



# **Análisis de la rizosfera de plantas xerófitas del altiplano central de México mediante la generación de genotecas ambientales del gen 16S rRNA y metagenoma funcional.**

**G. Torres<sup>1\*</sup>, V. Millán<sup>1</sup>, N. Toro<sup>1</sup>, S.G. Acinas<sup>2</sup>, H.C. Ramirez-Saad<sup>3</sup>  
y F. Martínez-Abarca<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín-CSIC Granada.*

<sup>2</sup> *Departamento de Biología Marina y Oceanografía. Instituto de Ciencias del Mar-CSIC Barcelona.*

<sup>3</sup> *Laboratorio de Ecología Molecular, Universidad Autónoma Metropolitana -Xochimilco. Mexico D.F.*

La rizosfera, la porción de suelo directamente bajo la influencia de la planta, constituye un ecosistema microbiano extremadamente complejo. En este sentido, las comunidades microbianas del suelo han mostrado una gran diversidad (en gran parte dirigida por la composición y concentración de los exudados de cada planta) de la que sólo hemos accedido a una pequeña fracción por métodos tradicionales de cultivo (1). La clonación de los genes representativos de una comunidad microbiana en ambientes naturales (*metagenoma*) nos permite acceder a distintos niveles de información: (i) a la diversidad genética global de dicha comunidad; (ii) a la dinámica de dicha comunidad microbiana asociada a fluctuaciones medioambientales (presencia de plantas, características del suelo, sequía...) y (iii) a su posible explotación biotecnológica. Este tipo de enfoques, pueden tener un mayor interés sobre ecosistemas microbiológicos poco explorados (sobre la rizosfera de especies de plantas endémicas p. ej.) contribuyendo de esta forma a su conservación y al uso racional de esta diversidad biológica. Bajo este tipo de enfoque se presenta este estudio sobre muestras de suelo rizosférico obtenidas de la cactácea globosa *Mamillaria carnea* en la reserva de la Biosfera de Tehuacan-Cuicatlán en el Altiplano Central de México. Esta reserva es única en diversidad de especies vegetales, principalmente cactáceas, con un grado de endemismo que llega hasta el 60% a nivel de especie y la microbiota asociada es actualmente desconocida.

Como primera aproximación nuestro estudio se basa en el análisis de diversidad procariótica basadas en genotecas derivadas de la amplificación del gen 16S rRNA del DNA metagenómico extraído de suelo rizosférico en dos estaciones claramente diferenciadas basados en época seca (Abril 2006) y época lluviosa (Sept 2005). Nuestros resultados indican que el phylum de las Acidobacterias es uno de los taxones más abundantes con un 10% del total de los clones analizados. Posteriormente utilizando “primers” específicos de este taxón se diseñaron nuevas genotecas ambientales de ambas estaciones para analizar en detalle la estructura y patrones de microdiversidad inherentes en dicha población bacteriana.

El trabajo se completa mediante la comparación basada en metagenómica funcional de genes de resistencia a antibióticos (3 clones) y esterases (8 clones) encontrados en genotecas de expresión en fagos (Lambda Zap–Stratagene) de DNA Total de muestras rizosféricas de ambas estaciones seca y húmeda (3.2 Gbp de DNA). La presencia y diferencias de genes en estas genotecas frente a otra construidas en un suelo agrícola de Granada (España) de un tamaño 6 veces inferior (12 clones esterasa y 8 de resistencia a Antibióticos) revela diferencias significativas entre suelos no perturbados frente a un suelo agrícola. Las características bioquímicas y el potencial biotecnológico de alguno de los genes encontrados serán presentados.

Agradecimientos: proyectos BBVA BIOCON-084 de la Fundación BBVA; BIO2003-02473 del MEC

## **Diversidad de las poblaciones bacterianas de la filosfera de distintas variedades de peral y manzano a lo largo del desarrollo fenológico del árbol**

**J. Escolano\*, A. Soler, M. Mallorquí, M. Martínez-Alonso y N. Gaju**

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

Las poblaciones bacterianas ejercen un papel fundamental en la filosfera, teniendo implicaciones significativas sobre la producción vegetal. Dentro de la gran variedad de funciones que desempeñan, destaca su utilidad como mecanismo de protección frente a microorganismos fitopatógenos. Así pues es interesante poder obtener información sobre las variaciones temporales que las poblaciones bacterianas de la filosfera puedan experimentar. De hecho, estas poblaciones pueden sufrir variaciones como consecuencia de fluctuaciones en los parámetros ambientales que determinan el desarrollo fenológico de la planta. Por esta razón, el objetivo de esta investigación es el estudio de los cambios en la diversidad de las poblaciones bacterianas de la filosfera de diferentes Rosáceas (peral y manzano) a lo largo de un ciclo anual, para obtener sus perfiles genéticos característicos y disponer de marcadores biológicos específicos para las diferentes variedades estudiadas. Dichos resultados serán imprescindibles para poder analizar las variaciones que diferentes acciones antropogénicas puedan tener sobre las poblaciones bacterianas y permitirá desarrollar estrategias de control de plagas y enfermedades de forma más eficiente. Para desarrollar esta investigación se han analizado 6 estados fenológicos (brotación, pre-floración, floración, post-floración, fructificación y maduración). Las muestras fueron caracterizadas utilizando métodos cultivo-independientes basados en el análisis del RNA ribosomal. Para la extracción del DNA total se utilizó el método de extracción fenol-cloroformo basado en el protocolo descrito por Zhou y colaboradores (1996). Posteriormente, se amplificaron los fragmentos del gen rRNA 16S, utilizando los cebadores específicos del dominio *Bacteria* 63F-GC/518R. Los productos se analizaron mediante la técnica de la electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE). A partir de los patrones de bandas obtenidos se llevo a cabo un estudio comparativo para determinar la presencia de cambios en los grupos bacterianos dominantes. Concretamente, los patrones se analizaron en términos de similitud o disimilitud, utilizando el coeficiente de Dice y el método de agrupación jerárquica “Unweighted pair-group method” (UPGMA), y fueron representados en forma de dendrogramas. Finalmente, las bandas más relevantes fueron recuperadas del gel para su posterior secuenciación. Los resultados obtenidos hasta el momento han puesto de manifiesto la existencia de importantes diferencias entre las distintas fases del desarrollo de la planta, de manera que el estado fenológico tiene un marcado efecto a nivel de composición de las poblaciones bacterianas de la filosfera. En la actualidad se está procediendo a la secuenciación de las bandas más importantes, para poder determinar la afiliación filogenética de las poblaciones bacterianas dominantes a lo largo del desarrollo fenológico.

## Estudio de quimiotaxis en distintas especies de xanthomonas

M. Sena\*, E. Ferragud, J. Cubero

*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Madrid*  
E-mail: [sena.marta@inia.es](mailto:sena.marta@inia.es)

La cancrrosis de los cítricos está causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) y se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en hojas, ramas y frutos que pueden derivar en la caída prematura de éstos y en una acusada defoliación del árbol. Dichos síntomas disminuyen la producción y calidad de la fruta, lo que deriva en importantes pérdidas económicas. En la Unión Europea (UE), *Xcc* es considerado un patógeno de cuarentena, siendo de especial interés en España y en países mediterráneos, donde los cítricos constituyen un cultivo principal. En la UE no se ha aislado ninguna xanthomona causante de enfermedad en cítricos en el campo, pero debido al incremento del comercio mundial, a la apertura de fronteras y a la libre circulación de mercancías dentro de la Unión Europea el riesgo de introducción de la enfermedad ha aumentado considerablemente en los últimos años.

Al igual que otros patógenos vegetales, *Xcc* penetra en el interior de la planta por estomas y heridas. Para acceder a las zonas de entrada, la bacteria debe desplazarse por la superficie vegetal. Es conocido que las bacterias perciben compuestos producidos por la planta a través de receptores MCP (Methyl-accepting chemotaxis protein) que activan una cadena de transducción de señales que desemboca en el movimiento del flagelo y finalmente dan lugar a desplazamientos. Entre las proteínas que participan en este fenómeno se encuentran las proteínas citoplasmáticas Che y las proteínas MotAB que forman el motor flagelar.

El gen *lrp* (leucine-responsive regulatory protein) se ha descrito como un regulador global del metabolismo bacteriano en respuesta a variaciones del ambiente. Este gen presenta polimorfismos entre las *Xcc* de amplio y estrecho rango de huésped. En estudios anteriores se ha comprobado que variaciones que tenían lugar en genes *lrp* de distintas cepas de *Xcc* iban acompañadas de diferencias en los genes *mot*, que se encuentran corriente abajo del *lrp*. Surge la hipótesis de una posible relación entre el gen *lrp* con la motilidad, y una implicación en el rango de huésped de las distintas cepas de *Xcc*.

En nuestro laboratorio se han realizado ensayos de quimiotaxis en placa con agar al 0,3%, con distintos compuestos, entre ellos leucina, serina, alanina, fructosa, glucosa etc. En paralelo a los ensayos de quimiotaxis, con estos mismos compuestos, se ha evaluado su validez como fuente de carbono de la bacteria. Todos los ensayos se han hecho de forma comparativa entre *Xcc*, *Xanthomonas campestris*, y *Xanthomonas fragariae*. Hasta el momento hemos comprobado que compuestos como la leucina, serina, y la mayoría de los azúcares, afectan al movimiento tipo swimming. Como fuente de carbono parece que la leucina, serina y arginina no son metabolizadas por la bacteria al contrario de lo que sucede con los azúcares.

Por otro lado se están realizando ensayos de cuantificación relativa por PCR en tiempo real de los niveles de transcripción del gen *lrp* y de genes de motilidad *motA* o *cheZ* en presencia de distintos compuestos para las distintas especies de bacterias estudiadas y así poder determinar su implicación y posible mecanismo de los fenómenos de quimiotaxis.

## Análisis de los sistemas de *quorum sensing* en *Rhizobium leguminosarum* UPM791

C. Sánchez-Cañizares\*, L. Cantero, T. Ruiz-Argüeso, J. Imperial y J.M. Palacios

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas , Universidad Politécnica de Madrid.*

Las bacterias son capaces de percibir cambios en la densidad de población y responder a ellos activando rutas de respuesta en diversos procesos biológicos gracias a un sistema de comunicación intercelular conocido como *quorum sensing*. En el caso de la bacteria *Rhizobium leguminosarum* UPM791 (*Rl* UPM791), se han descrito dos sistemas funcionales de regulación por *quorum sensing* homólogos al sistema modelo de dos componentes *luxRI* y mediados por moléculas señal de tipo Acil Homoserina Lactonas (AHLs): el sistema *cinRI*, localizado en el cromosoma de la bacteria, y el sistema *rhiRI*, codificado en el plásmido simbiótico. En este trabajo se ha estudiado el papel de los sistemas de regulación por densidad poblacional en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Para ello, se han realizado ensayos de competitividad por la nodulación de la raíz en guisante por la bacteria endosimbiótica *Rl* UPM791 en función de la presencia de una lactonasa que degrada las señales. Los resultados sugieren que la inactivación del sistema de *quorum sensing* afecta significativamente la competitividad de *Rl* UPM791 frente a otras cepas. Por otro lado, se ha puesto a punto un sistema de detección de AHLs basado en el análisis directo mediante HPLC y espectrometría de masas. En el caso de la cepa *Rl* UPM791, las señales identificadas corresponden a: C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>7</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, producidas por el sistema *rhiRI*, y 3OH-C<sub>14:1</sub>-HSL, sintetizada por el sistema cromosómico *cinRI*. Asimismo, se ha podido detectar por primera vez en esta cepa la presencia de C<sub>4</sub>-HSL en pequeñas cantidades. Esta diversidad de señales sugiere una regulación compleja de los procesos regulados por densidad poblacional en esta cepa bacteriana.

Además del plásmido simbiótico, otro de los cuatro plásmidos nativos que presenta *Rl* UPM791 (pUPM791d) interviene también en la regulación de los sistemas de *quorum sensing*. Cuando se elimina, desaparece la señal 3OH-C<sub>14:1</sub>-HSL, lo que indica la existencia de un tipo de regulación dependiente de dicho plásmido sobre el sistema cromosómico *cinRI*. Esta molécula señal está descrita como bacteriocina, ya que inhibe el crecimiento de cepas sensibles a esta molécula. Actualmente, se están desarrollando distintas estrategias para la identificación del mecanismo responsable del control que ejerce pUPM791d sobre la producción de AHLs en esta bacteria. Este determinante génico constituiría un nuevo tipo de regulador carente de sintasa, ya que es la proteína CinI la que se encarga de producir la señal 3OH-C<sub>14:1</sub>-HSL.

## Señalización intra- e interespecífica en *Pseudomonas putida* y su papel en colonización de la rizosfera

R. Fernández-Piñar<sup>1\*</sup>, M. Cámara<sup>2</sup>, J.L. Ramos<sup>1</sup>, M.I. Soriano<sup>1</sup> y M. Espinosa-Urgel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Protección Ambiental. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda, 1. Granada 18008.

<sup>2</sup>School of Molecular Medical Sciences, University of Nottingham. UK.

Los sistemas de comunicación intercelular mediante el denominado “Quorum Sensing” (QS) son empleados por las bacterias para regular una variedad de procesos multicelulares y se ha descrito también su repercusión en actividades relacionadas con interacciones planta-bacteria, tales como la síntesis de metabolitos con actividad de biocontrol. Existen también interferencias entre señales procedentes de plantas que mimetizan las moléculas señalizadoras (acil-homoserina lactonas, AHL), y se ha descrito la producción de señales de QS en poblaciones asociadas a la rizosfera. *Pseudomonas putida* KT2440 es una eficaz colonizadora de la raíz de plantas que sobrevive en la rizosfera a altas densidades celulares. Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, hemos caracterizado el perfil de moléculas de QS en *P. putida* KT2440. Se comprobó que KT2440 produce cantidades mínimas de C4-AHL y de O-C12-AHL, y pequeñas cantidades de quinolonas. Estas cantidades no parecen suficientes para funcionar como señales intercelulares. Sin embargo, hemos encontrado evidencias que sugieren la existencia de otro sistema de señalización en esta cepa. Se ha identificado un gen, *ddcA*, importante para la colonización de raíz y adhesión a semillas cuya expresión responde a densidad celular, así como a señales producidas por otras especies de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*).

En una búsqueda de reguladores de *ddcA*, hemos identificado un sistema de dos componentes compuesto por un sensor histidín kinasa y un regulador de respuesta, al que denominamos RoxS/RoxR. Los genes que codifican RoxS y RoxR forman un operón y un mutante en *roxSR* tiene afectada la capacidad de colonización competitiva de la rizosfera. Para esclarecer el regulón RoxS/R, fue llevado a cabo un análisis global transcripcional usando microarrays. Los resultados muestran que ciertas enzimas del metabolismo de aminoácidos, estructuras de superficie, citocromo c, citocromo oxidasa y sistema de transporte de electrones, entre otros, están bajo la influencia de RoxS/R.

## El fenómeno de *quorum quenching* en *Bacillus*: Actividades enzimáticas y genes implicados

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

*Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga*

Las enfermedades vegetales de etiología bacteriana son siempre difíciles de controlar y por tanto no es sorprendente que apenas se hayan desarrollado agentes de control biológico que sean específicos para estas enfermedades. Por esta razón tras el descubrimiento del fenómeno denominado *quorum sensing* y su papel fundamental en la regulación de genes de virulencia en numerosas especies de bacterias fitopatógenas de los géneros *Agrobacterium*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas*, se están desarrollando diferentes estrategias de control que utilizan esta relación como diana para nuevas terapias antibacterianas, siendo la degradación N-acil homoserina lactona (AHL), la molécula señal del *quorum sensing*, una de las estrategias más investigadas. Entre los mecanismos que afectan al *quorum sensing*, también conocido como *quorum quenching*, destacan dos tipos de enzimas que degradan AHL. Estas enzimas son acil homoserina lactonasa y acil homoserina acilasa. Lactonasa degrada AHL mediante hidrólisis del anillo lactona y ha sido identificada en varias especies de *Bacillus*. Acilasa degrada la molécula señal rompiendo el enlace amido y ha sido asociada a aislados de *Ralstonia* y *Streptomyces* entre otras especies. Teniendo en cuenta que diversas especies del género *Bacillus* están siendo ampliamente utilizadas como agentes de biocontrol, la capacidad de *quorum quenching* de *Bacillus* puede resultar de interés como estrategia para el control biológico de bacterias fitopatógenas Gram-negativas. Las bases genéticas de la actividad lactonasa están muy bien caracterizadas en *Bacillus*, donde el gen responsable *aiiA* ha sido descrito en varias especies como *B. cereus* y *B. thuringiensis* entre otras. Con respecto a acilasa, la actividad enzimática ha sido relacionada con el gen *aiiD* de *Ralstonia* y genes ortólogos presentes en *Streptomyces* y otras especies, pero no se ha descrito en ninguna especie de *Bacillus*. No obstante, el análisis informático de los genomas disponibles en las bases de datos ha revelado la presencia en el genoma de *B. cereus* de un gen con alta identidad al gen *aiiD* (acilasa) de *Ralstonia*. Para valorar las posibilidades de biocontrol mediante *quorum quenching* de las distintas especies de *Bacillus* nos hemos planteado hacer un estudio molecular para detectar los genes responsables de las actividades acilasa y lactonasa en *Bacillus* utilizando una colección de cepas que incluye las especies más representativas de los diez grupos en los que se divide la familia *Bacillaceae*. Para ello analizamos 10 cepas de *B. subtilis*, dos de ellas bien caracterizadas por su capacidad antibacteriana frente a *Pectobacterium carotovorum* y *Xanthomonas cucurbitae*, y 16 cepas de colección correspondientes a otras tantas especies de *Bacillus*. Estas cepas fueron caracterizadas mediante ensayos de degradación de AHL y ensayos de PCR y *Southern blot* para los genes *aiiA* y *aiiD*. Los resultados revelaron que la presencia de estos genes y la actividad de degradación de AHL está principalmente asociada a las especies del grupo X (grupo de *B. cereus*) donde destaca como agente de biocontrol *B. thuringiensis*. Además, este análisis demostró la ausencia *quorum quenching* en *B. subtilis*.



## **El arroz y la judía producen moléculas que interfieren en la Percepción del Quórum bacteriano**

**F. Pérez-Montaño\*<sup>1</sup>, R.A. Bellogín<sup>1</sup>, F.J. Ollero<sup>1</sup>, F.J. López-Baena<sup>1</sup>, B. Guasch-Vidal<sup>1</sup>, S. González-Barroso<sup>2</sup> y M.R. Espuny<sup>1</sup>.**

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

*2 Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química, Universidad de Sevilla.*

Se denomina percepción de quórum (PQ) al mecanismo por el cual las bacterias pueden regular la expresión de genes en función de su densidad celular. La PQ está presente en la mayoría de las bacterias Gram negativas y en algunas Gram positivas. Uno de los procesos controlados mediante PQ es la activación de genes bacterianos necesarios para la interacción del microorganismo con la planta, tanto en patógenos como en simbioses. Las plantas, a su vez, pueden producir moléculas que interfieren en la PQ bacteriano.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos para detectar, en *Oryza sativa* bv Puntal (arroz) y *Phaseolus vulgaris* bv BBL (judía), la producción de moléculas que interfieren en la PQ. Así pues, usando las estirpes biosensoras de PQ, *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pZLR4), *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Escherichia coli* pSB536, se observó mediante ensayos con exudados de semilla y raíz, ensayos con extractos de semilla y ensayos con las propias plantas, que ambas contienen moléculas que interfieren en la PQ bacteriano. Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de cromatografía en capa fina de los exudados de ambas plantas extraídos con diclorometano, usando a las estirpes biosensoras para su revelado. Estos ensayos mostraron que, en arroz, existe al menos una molécula que interfiere en la PQ y que presenta una movilidad similar a la de ciertas *N*-acil-homoserina lactonas. Por último, se fraccionaron por cromatografía líquida de alta resolución los diferentes exudados y se analizó la capacidad de cada fracción para inducir al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZLR4) con el fin de determinar en qué fracción se encuentra la molécula que interfiere en la PQ bacteriano. Para ambas plantas, se detectó la presencia de este tipo de moléculas en las últimas fracciones obtenidas de la cromatografía líquida de alta resolución.

En resumen, mediante diferentes técnicas y estirpes biosensoras, se detectó la producción de moléculas que interfieren en la percepción del quórum en *Oryza sativa* bv Puntal y *Phaseolus vulgaris* bv BBL. Actualmente, se está trabajando en la determinación de la naturaleza química de estas moléculas.



## **Sesión IV**

# **ACTIVIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO Y CONTROL**



## El factor de transcripción *Thctf1* de *Trichoderma harzianum* está implicado en la producción de metabolitos secundarios y en la actividad antifúngica

M.B. Rubio<sup>a\*</sup>, R. Hermosa<sup>a</sup>, J.L. Reino<sup>b</sup>, I.G. Collado<sup>b</sup> y E. Monte<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz.

Algunas especies del género *Trichoderma* se utilizan como agentes de control biológico de diversos hongos fitopatógenos. Dentro de los mecanismos de biocontrol ejercidos por *Trichoderma* se incluyen el micoparasitismo, la competencia y la antibiosis, así como la promoción del crecimiento de las plantas y la activación de mecanismos de defensa en las mismas. La capacidad de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de otros hongos se debe a la acción combinada entre enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs) y metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, producidos por *Trichoderma*. El primer metabolito secundario volátil con propiedades antifúngicas que se describió en *Trichoderma* fue la 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PP). Este compuesto es el responsable de la pigmentación amarilla y el aroma a coco que presentan algunas cepas de *Trichoderma*, y puede inhibir el crecimiento de patógenos como *Rhizoctonia solani*.

Nosotros hemos trabajado en el aislamiento y la caracterización del gen *Thctf1* de *T. harzianum*, que muestra una alta homología de secuencia con un factor de transcripción descrito en *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, y hemos analizado su función siguiendo una estrategia de disrupción génica. En experimentos en placa, los transformantes no presentaron la pigmentación amarilla observada en la cepa silvestre, por lo que estudiamos si esa pérdida de pigmentación estaba relacionada con la síntesis de 6PP. Estudios cromatográficos y espectroscópicos demostraron que los disruptantes no producían dos metabolitos secundarios, derivados de 6PP y que no se habían descrito previamente en *Trichoderma*, que sí estaban presentes en la cepa silvestre. Dado que la 6PP es un compuesto de reconocida capacidad antifúngica, se analizó dicha capacidad tanto en los disruptantes como en la cepa silvestre, y se observó que los disruptantes tenían una reducida capacidad antimicrobiana. Nuestros resultados apuntan a un papel significativo de THCTF1 en la producción de metabolitos secundarios y en la actividad antifúngica de *T. harzianum*.

## **Transcripción de *prs* en plantas de tomate tratadas con el agente de biocontrol *Penicillium oxalicum***

**P. Sabuquillo\*, J. Cubero y P. Melgarejo**

*Departamento de Protección Vegetal, INIA, Ctra. de la Coruña km. 7, 28040 Madrid, E-mail:*

El control de la fusariosis vascular de tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es posible mediante la aplicación de una suspensión conidial del hongo filamentoso *Penicillium oxalicum* (PO). Se conoce que la inducción de resistencia por parte de PO en la planta de tomate es de tipo sistémico, sin embargo no está claro el mecanismo de acción del agente de biocontrol. En este trabajo, en primer lugar, se ha evaluado la transcripción diferencial de proteínas de respuesta a patogénesis (PRs) en plantas tratadas con distintos formulados de PO. Para ello, se realizaron reacciones de RT-PCR en tiempo real a partir de ARN total extraído de plantas de tomate tratadas o no con PO, utilizando cebadores diseñados para los genes correspondientes a PR1, PR2 y PR5 y para la subunidad 18S del ARN ribosomal, este último usado como gen endógeno de referencia en los estudios de cuantificación relativa. El análisis se hizo a partir de ARN procedente de plantas individuales y en paralelo utilizando mezclas o “pools” de ARN de plantas sometidas al mismo tratamiento. Los resultados de estos ensayos mostraron que aunque existen diferencias significativas entre plantas tratadas y no tratadas con los diferentes formulados de *P. oxalicum* respecto a la expresión de estos genes, el comportamiento de las distintas PRs estudiadas es diferente.

En segundo lugar se ha estudiado la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas tratadas con PO, observándose este fenómeno de forma diferencial para los distintos formulados del agente de biocontrol empleados.

Los resultados obtenidos muestran que en el modo de acción de PO parece jugar un papel importante la resistencia sistémica adquirida (SAR) aunque no es descartable que existan otros fenómenos involucrados como la producción de especies reactivas de oxígeno observada en este estudio o la inducción de crecimiento demostrada en ensayos previos.

## Modificación de *Pseudomonas fluorescens* F113 para mejorar su aplicación en biocontrol

E. Barahona\*<sup>1,2</sup>, A. Navazo<sup>1</sup>, T. Zea-Bonilla<sup>2</sup>, R.M<sup>a</sup>. Pérez<sup>2</sup>, M. Redondo-Nieto<sup>1</sup>,  
F. Martínez-Granero<sup>1</sup>, R. Rivilla<sup>1</sup> y M. Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>2</sup>IFAPA, Centro de Churriana, Málaga.

En la actualidad, se están buscando alternativas a los pesticidas, herbicidas y fungicidas de uso común en agricultura. La utilización de microorganismos para solventar este tipo de problemas podría ser una vía importante para la retirada de estos compuestos químicos. La cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* F113 es colonizadora competente de la rizosfera de muy diversos tipos de plantas, ha sido modificada genéticamente para su uso en rizorremediación y es capaz de producir antifúngicos como el DAPG mostrándose eficaz para el biocontrol de *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*. Una colonización eficiente de la rizosfera es fundamental para que las aplicaciones biotecnológicas en sistemas integrados planta-microorganismo tengan su efecto. La capacidad de movimiento es crucial para que *P. fluorescens* F113 lleve a cabo una colonización competitiva de la rizosfera. Mediante mutagénesis por transposición y posterior rastreo de mutantes con mayor capacidad de movimiento, se han detectado varios genes implicados en la represión de la movilidad de la cepa silvestre. Entre éstos, se encuentra *kinB*, *sadB* y *wspR*. KinB está implicado en la síntesis de alginato y codifica una proteína de membrana que forma parte de un sistema de dos componentes junto con AlgB. El análisis del fenotipo de mutantes sencillos y dobles mutantes en KinB y GacS, que regula el metabolismo secundario de la bacteria, ha revelado que ambos se encuentran en la misma ruta de regulación de la movilidad, siendo GacS epistático sobre KinB. WspR está implicado en la síntesis de celulosa y SadB es una proteína intracitoplasmática que se sabe está implicada en la formación de biopelículas. En *P. fluorescens* F113 WspR y SadB no forman parte de la misma cascada de señalización y reprimen el movimiento de manera independiente de KinB y GacS. Hemos obtenido un triple mutante *kinB-sadB-wspR*, que se caracteriza por tener una movilidad tres veces superior a la de *P. fluorescens* F113, por mantener intacto el metabolismo secundario, por presentar mermada su capacidad de formar biopelículas y por ser más competitivo que la estirpe silvestre. Hemos estudiado el biocontrol ejercido por parte de F113, el triple mutante y un variante de fase natural y se ha observado que la cepa hipermóvil y no formadora de biopelículas controla a hongos patógenos de forma más eficaz que la cepa silvestre y un variante fenotípico aislado de la rizosfera, más competitivo que la estirpe silvestre, pero con el metabolismo secundario bloqueado por una mutación en *gacS*.

## **Evaluación y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia sistémica en melón**

**L. García-Gutiérrez\*, D. Romero, H. Zerriouh, F.M. Cazorla, A. de Vicente y A. Pérez-García**

*Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga*

El oídio (*Podosphaera fusca*) es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas tanto en España como en el resto del mundo. En la actualidad el control de la enfermedad se basa en el empleo continuado de fungicidas lo que ha originado el importante problema de la aparición de resistencias frente a las principales materias activas utilizadas para su control como son las estrobilurinas o los inhibidores de la síntesis de ergosterol. Las constantes y a veces dramáticas variaciones ambientales de la filofera representan una seria limitación para muchos de los agentes de control biológico actualmente diseñados frente al oídio. Para superar este inconveniente, en este trabajo nos hemos planteado como objetivo la selección de bacterias que aplicadas a las raíces de plantas de melón fueran capaces de promover su crecimiento (PGPR) y proporcionar un control adecuado del oídio de las cucurbitáceas mediante los mecanismos de defensa de la planta asociados a la resistencia sistémica inducida (ISR).

Para realizar este estudio hemos utilizado una colección de cepas de *Bacillus* spp. Y *Pseudomonas* spp. y evaluado su potencial como bacterias PGPR. Para ello se analizaron características como la producción de sustancias antifúngicas, producción de sideróforos, producción de auxinas, formación de biopelículas y promoción del crecimiento de la raíz en semillas de melón y pepino. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos mediante el test de Kendall nos permitió seleccionar tres cepas de *Bacillus subtilis* UMAF6639, UMAF6614 y UMAF8564, y dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* UMAF6031 y UMAF8402. Estas cepas fueron posteriormente evaluadas como potenciales bacterias promotoras del crecimiento en melón e inductoras de la resistencia sistémica frente a oídio de cucurbitáceas. Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas ensayadas promovían un incremento del peso fresco de un 30% con respecto a las plantas control sin bacterizar y proporcionaban reducciones de severidad de la enfermedad del 50-80%, similares a las observadas en plantas tratadas con las cepas *Pseudomonas putida* WCS358r y *P. fluorescens* WCS374r, cepas bien conocidas por su capacidad de inducción de ISR en otras especies vegetales como tomate o pepino. La aplicación conjunta de algunas de las cepas seleccionadas proporcionó reducciones de la enfermedad mayores a las obtenidas previamente para cada cepa de forma independiente. Estas cepas también fueron evaluadas como bacterias promotoras de crecimiento en plantas de pepino mostrando un incremento del peso fresco del 30-50% respecto a las plantas control. Actualmente estamos realizando ensayos *in vitro* de promoción de crecimiento en *Arabidopsis thaliana*. Resultados preliminares muestran que las cepas seleccionadas inducen un incremento del peso fresco en plántulas de *A. thaliana* y además incrementan la longitud de las radículas respecto a las plantas control. Estos resultados apoyan el potencial de estas cepas como bacterias PGPR e inductoras de resistencia sistémica, por lo que incrementa la necesidad de profundizar en las bases moleculares que subyacen a su acción protectora frente al oídio.



## **Efecto supresivo sobre las podredumbres radiculares del aguacate mediante la aplicación de enmiendas orgánicas**

**N. Bonilla\*<sup>1</sup>, J.A. Torés<sup>2</sup>, J.M. Hermoso<sup>2</sup>, J. González<sup>2</sup>, F.M. Cazorla<sup>1</sup> y A. de Vicente<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Grupo de Microbiología y Patología Vegetal – Unidad Asociada CSIC. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.*

<sup>2</sup>*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 oomicete *Phytophthora cinnamomi*. Se están desarrollando diversas estrategias para el manejo del cultivo, aunque sólo algunas son compatibles con el cultivo ecológico. Entre ellas se encuentra el uso de enmiendas orgánicas, que han sido aplicadas previamente en éste y otros cultivos para el control de hongos fitopatógenos con diferentes resultados. En este estudio se han diseñado ensayos de invernadero para comprobar la capacidad supresiva de diferentes enmiendas orgánicas frente a los dos patógenos radiculares del aguacate mencionados. Los ensayos se realizaron en macetas, creciendo las plantas de aguacate durante varios meses en sustrato adicionado con las distintas enmiendas orgánicas, solas y combinadas. Tras la inoculación del patógeno se realizó un seguimiento de la aparición de síntomas aéreos, valorando la incidencia y severidad de la enfermedad para cada tratamiento durante seis meses desde la inoculación. El diseño de los dos ensayos presenta algunos matices diferenciales para los dos patógenos inoculados, *R. necatrix* (plantas de 2 años, macetones de 50 L) y *P. cinnamomi* (plántulas de semilla de 3-4 meses, macetas de 5 L). Además del efecto sobre el desarrollo de la enfermedad, se analizó el posible efecto de las enmiendas sobre el crecimiento de las plantas y sobre la composición de la microbiota del suelo y la rizosfera. El análisis de la microbiota se está realizando mediante aislamiento y recuento en placa y también utilizando técnicas moleculares independientes de cultivo como la PCR-DGGE.

# Obtención de cepas de *Bacillus* con aptitudes en biocontrol mediante técnicas de enriquecimiento selectivo y discriminación molecular

I. Mora\*, J. Cabrefiga, E. Montesinos

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-XaRTA-CIDSAV, Universidad de Girona.*

*E-mail: isabel.mora@udg.edu*

Uno de los puntos críticos del desarrollo de un sistema de control biológico es la obtención de microorganismos eficientes. El procedimiento estándar consiste en aislar aleatoriamente cepas de especies de interés, para la confección de una colección de miles de aislados, de las cuales se seleccionan las que presentan capacidad de inhibición del patógeno diana *in vitro* o *ex vivo*, y potencialmente en planta. Generalmente, el rendimiento de este proceso es bajo, donde un 20-40% muestran actividad *in vitro*, y de éstos sólo un 1-10% presentan resultados significativos en cuanto a la reducción de una enfermedad en particular en planta.

En este trabajo se propone el guiado molecular para la selección de candidatos, basado en la detección molecular de genes relacionados con el control biológico en lugar de la selección aleatoria. Su aplicación permite superar las limitaciones existentes con las estrategias convencionales, así como la disminución de los costes económicos y tiempo en su desarrollo. Además, se ha desarrollado sobre el género *Bacillus*, el cual presenta características especiales para ser considerados buenos candidatos, al ser ubicuos en el suelo y tener capacidad para producir metabolitos con actividad antimicrobiana. Una característica relevante es la formación de esporas, que permite una fácil formulación y aumento de la viabilidad en campo. Asimismo, consta de dos genomas completamente estudiados, hecho que permite el diseño de marcadores moleculares para genes que pueden ser de importancia en el biocontrol.

Concretamente se ha focalizado el estudio en la detección de dianas específicas que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de diferentes péptidos antimicrobianos, los cuales se han relacionado con la capacidad de control biológico en *Bacillus*.

En primer lugar se ha puesto a punto la metodología de selección asistida por marcadores moleculares con el diseño y la verificación de la especificidad y sensibilidad de los cebadores dirigidos a genes generalistas y a genes biosintéticos específicos de interés en el género *Bacillus*. Paralelamente, se ha puesto a punto el proceso de enriquecimiento selectivo de *Bacillus* presentes en las muestras naturales, basado en la aplicación de un tratamiento térmico sobre el extracto vegetal, que ha reducido la carga bacteriana acompañante en la muestra natural manteniendo un nivel óptimo de microorganismos esporulados, seguido de un proceso de enriquecimiento, que permite obtener concentraciones de *Bacillus* por encima del umbral de detección de la metodología de detección molecular puesta a punto.

La combinación de estos dos sistemas (enriquecimiento selectivo y guiado molecular) ha permitido la obtención con un elevado rendimiento de aislados de *Bacillus sp.*, con capacidad biosintética de péptidos antimicrobianos relacionados con el control biológico.

## **Control de la necrosis apical del mango: Búsqueda de tratamientos alternativos al cobre**

**J.A. Gutiérrez-Barranquero\*<sup>1</sup>, A. de Vicente<sup>1</sup>, A. Pérez-García<sup>1</sup>, E. Arrebola<sup>1</sup>,  
D. Sarmiento<sup>2</sup> y F.M. Cazorla<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Grupo de Microbiología y Patología Vegetal. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga;* <sup>2</sup> *SAT 2803 "TROPS", 29700-Vélez-Málaga, Málaga.*

La Necrosis Apical del Mango (NAM) producida por la bacteria fitopagógena *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) es una de las enfermedades más importantes del cultivo del mango (*Mangifera indica* L.) en la cuenca mediterránea. Produce lesiones necróticas en hojas y yemas terminales de mango lo que provoca elevadas pérdidas debido a la disminución de la floración y producción de fruta. El control de esta enfermedad está basado en la aplicación repetida durante todo el año de compuestos derivados del cobre, principalmente Caldo Bordelés. Estudios previos han mostrado la elevada distribución de la resistencia a cobre en los aislados de Pss procedentes de mango. Este hecho, junto a la problemática que existe en cuanto al uso del cobre en agricultura, hace necesario la búsqueda de tratamientos alternativos frente a la necrosis apical del mango. El presente estudio se ha llevado a cabo durante tres campañas agronómicas, sobre árboles de mango de los cv. Tommy Atkins, Keitt y Lippens, sensibles a esta enfermedad. Los productos evaluados fueron seleccionados en estudios previos de tratamientos de entre una gama de productos compatibles con la agricultura ecológica y que mostraron cierto grado de protección contra la necrosis apical del mango (Cazorla *et al.*, 2006). Los productos ensayados fueron un gel de sílice y una arcilla en polvo (Ulmasud®), aplicados individualmente o con Nu-film como mojante. Un grupo de árboles tratados con caldo Bordelés y otro sin tratar constituyeron los controles del ensayo. Tras el análisis de los datos obtenidos durante las tres campañas de estudio hemos podido observar que de 4 a 6 aplicaciones anuales con el gel de sílice proporcionaron un nivel de reducción de enfermedad similar al del tratamiento convencional con caldo Bordelés. Los tratamientos restantes fueron excluidos como alternativa debido a que presentan una elevada variabilidad en los niveles de reducción de la enfermedad. En cuanto a los niveles de población de Pss, cabe destacar que tanto los tratamientos evaluados, así como el tratamiento convencional (Caldo Bordelés) no presentaron diferencias significativas entre sí, indicando un medio de acción distinto al de la actividad antibacteriana. Los análisis de concentración inhibitoria y bactericida de los diferentes compuestos frente a cepas de Pss aisladas de mango confirman que estos tratamientos no actúan como bactericida. Finalmente, el Gel de sílice se propone como una alternativa fiable contra la NAM frente al uso del Caldo Bordelés.



**Sesión V**

**PATOGÉNESIS**



## Identificación de genes implicados en la biosíntesis de mangotoxina

V.J. Carrión\*<sup>1</sup>, J.A. Gutiérrez-Barranquero<sup>1</sup>, E. Arrebola<sup>1</sup>, F.M. Cazorla<sup>1</sup>, J. Murillo<sup>2</sup> y A. de Vicente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071. <sup>2</sup>Laboratorio de Patología Vegetal, ETS de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. 31006-Pamplona.

La cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) UMAF0158 es una bacteria fitopatógena aislada inicialmente de mango, donde produce la enfermedad denominada “Necrosis Apical del Mango”. Se ha demostrado que Pss UMAF0158 produce varios factores de virulencia, entre los que destaca la producción de la toxina antimetabolito mangotoxina. Esta toxina actúa en la ruta de biosíntesis de poliaminas inhibiendo la enzima ornitina acetil-transferasa (OAT). Hasta la fecha, sólo se había descrito la participación en la biosíntesis de mangotoxina del gen *mgoA*, que codifica para una peptidosintetasa no ribosomal. En el presente trabajo se está estudiando un nuevo cluster de genes que restauran la producción de mangotoxina en sus respectivos mutantes mini*Tn5*Km2. Este cluster de genes (pCG1-5) se obtuvo de una genoteca de Pss UMAF0158, se ha secuenciado, y sobre él se han podido identificar seis ORFs posiblemente implicados en la biosíntesis de mangotoxina o en su regulación; entre estos posibles genes destacan los ORFs D y E, que presentan homología con genes de carboxilasas y amidinotransferasas respectivamente. Curiosamente, este cluster de genes no muestra homología con el genoma secuenciado de Pss B728a, cepa que no produce esta toxina antimetabolito. Para comprobar el papel de los diferentes ORFs se lleva a cabo una estrategia de mutagénesis dirigida utilizando el vector pCR2.1. Se han construido en la actualidad mutantes en todos los ORFs de este cluster y hasta el momento se ha comprobado la alteración en la producción de mangotoxina en cinco de los seis ORFs mediante el bioensayo de inhibición de *E. coli*. Actualmente se están generando los respectivos complementantes para confirmar estos resultados.

# Implicación de *yap1* en la virulencia de *U. maydis*

L. Molina

*Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Granada*

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias de supervivencia frente al ataque de patógenos. Una de las respuestas más rápidas es el llamado “burst” oxidativo, que consiste en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS), como son el ión superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en el lugar donde se produce la invasión por el patógeno. Hasta el momento de este estudio no se habían descrito los mecanismos de defensa de hongos filamentosos frente a este tipo de respuestas.

*Ustilago maydis*, agente causante del carbón del maíz y objeto de este estudio, es un patógeno con ciertas particularidades. Las células de la planta infectada permanecen vivas y no se produce una respuesta obvia de defensa de la planta. En este trabajo se identificó y caracterizó Yap1p de *U. maydis*. Esta proteína se comporta *in vitro* al igual que lo hace la proteína homóloga descrita en *Saccharomyces cerevisiae*. Este factor de transcripción posee un dominio bZIP y dos dominios ricos en cisteínas (CRDs): uno en la región carboxilo terminal (c-CRD) y otro en la región amino terminal (n-CRD). Ambos dominios son cruciales para la resistencia al estrés oxidativo mediado por Yap1p y para la localización subcelular apropiada de esta proteína. En *U. maydis* juega un papel importante en la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo, pero a diferencia de lo que ocurre en otros patógenos, también es importante en la virulencia. Concretamente, mutantes en este gen se ven afectados durante los primeros estadios del crecimiento biotrófico (penetración y colonización primaria) y este efecto se ha demostrado que se debe a la incapacidad de este mutante en *yap1* de detoxificar las EROS que aparentemente la planta sintetiza como consecuencia del ataque del patógeno o a la inactivación de los enzimas responsables de la producción de estas moléculas.

Análisis transcriptómicos demostraron que el gen *yap1* regula genes que en otros organismos están involucrados en la detoxificación de EROS por ejemplo peroxidasas. Mutantes de estos genes produjeron la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la zona de infección y una disminución de la virulencia de *U. maydis*, al igual de lo que sucede en el mutante *yap1*. Estos análisis transcriptómicos también revelaron que tanto *yap1* como la presencia de EROS regulan otros procesos celulares (transporte de moléculas desde/al medio externo, procesos de transmisión de señales, etc). Muchos de los genes que se desregularon en mayor medida en ausencia de *yap1* fueron genes de función desconocida.



# **Identificación de genes de *Arabidopsis* regulados por silenciamiento durante la infección por *Pseudomonas syringae* pv. tomato**

**A. Zumaquero\*, E. Bejarano y C.R. Beuzón**

*Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.*

La regulación génica mediada por microRNAs (miRNAs) es un mecanismo de control post transcripcional descubierto recientemente. Los miRNAs regulan procesos esenciales en todos los organismos eucarióticos, interfiriendo con la estabilidad o la traducción de los RNAm de los genes diana. En plantas, los miRNA juegan un papel importante en la regulación del desarrollo, metabolismo y respuesta a hormonas y cambios en el entorno (estrés bióticos y abióticos).

En este trabajo hemos abordado la identificación de genes regulados por miRNA y cuya expresión varíe en respuesta a la presencia de un tipo de factor de patogenicidad bacteriana: los efectores secretados por el sistema de secreción de tipo III. Esta identificación se ha realizado comparando los transcriptomas de *Arabidopsis* (disponibles en la página de NASCArrays) obtenidos mediante la infección con *P. syringae* pv tomato DC3000 y con el mutante de secreción tipo III de *P. syringae* pv. tomato  $\Delta hrcC$ , con los obtenidos al expresar supresores virales de silenciamiento (HcPro, P19, P15 o V2) que interfieren con la regulación mediada por miRNA. Los genes cuya expresión se ve alterada en las infecciones, e incrementada en las plantas sobreexpresando los diferentes supresores, fueron seleccionados como posibles genes diana regulables por miRNA. Los genes seleccionados han sido procesados en distintas bases de datos con objeto de extraer anotaciones funcionales y de procesos biológicos (GO, TAIR).

## **Papel del jasmonato en la patogénesis de *Dickeya dadantii* (ex-*Erwinia chrysanthemi*)**

**M. Antúnez-Lamas<sup>1</sup>, E. Ordoñez-Cabrera<sup>1</sup>, E. López-Solanilla<sup>1</sup>, R. Solano<sup>2</sup> y P. Rodríguez-Palenzuela\*<sup>1</sup>**

\**Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. E.T.S.Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Av. Complutense s/n 28040 Madrid.*

‡*Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Campus Universidad Autónoma, 28049 Madrid.*

*Dickeya dadantii* causa la podredumbre blanda de los vegetales, una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Se han identificado distintos factores implicados en la de esta bacteria, tales como enzimas hidrolíticas, sideróforos y sistemas de detoxificación. Adicionalmente, hemos visto que los fenómenos de quimiotaxis/motilidad son juegan un papel fundamental en la patogénesis, ya que mutantes alterados en estos procesos son menos virulentos y, particularmente, son mucho menos capaces de penetrar en la planta a través de heridas. El objetivo fundamental de este trabajo ha sido evaluar la importancia de la quimiotaxis hacia el ácido jasmónico en el proceso de patogénesis de esta bacteria.

Se ha analizado la quimiotaxis hacia diversas moléculas, entre las que se encuentran azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos de origen vegetal. *Dickeya dadantii* mostró quimiotaxis positiva a todos ellos excepto a la cisteína. Entre estos últimos se ha estudiado la quimiotaxis hacia moléculas implicadas en la defensa vegetal como son el ácido jasmónico y el ácido salicílico. Los resultados muestran que *D. dadantii* responde positivamente hacia el ácido jasmónico, mientras que muestra repulsión hacia el ácido salicílico. Dada la atracción por el ácido jasmónico se realizaron ensayos de virulencia en diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana* alterados en la ruta y biosíntesis de esta hormona, corroborándose que esta hormona está implicada en el defensa frente a *D. dadantii*. Además se ha analizado la cantidad de bacteria que entra al interior de una hoja de *A. thaliana* tras 1 hora de incubación obteniéndose una menor entrada en aquellos genotipos que no producen ácido jasmónico.

Debido a que el ácido jasmónico se produce como consecuencia de una herida en un tejido vegetal se ha analizado el movimiento a lo largo de hojas de endibia que habían sido dañadas previamente. Los resultados obtenidos muestran que la población bacteriana avanza más rápida y direccionalmente en presencia de una herida que cuando la hoja está intacta.

Posteriormente se han realizado ensayos de virulencia en diferentes huéspedes con células de *D. dadantii* que habían sido tratadas previamente con ácido jasmónico. Los resultados muestran una mayor virulencia en hojas de endibia y en hojas de violeta africana cuando las células habían sido pre-tratadas con este compuesto. Para analizar con más detalle el efecto de este pretratamiento se han llevado a cabo análisis de la expresión tras el tratamiento empleando hibridación de “micro-arrays” de ADN que contienen el genoma completo de la bacteria. El análisis bioinformático de los genes inducidos los ha agrupado en distintas categorías como genes reguladores implicados en patogénesis, de respuesta a estrés y virulencia, genes de metabolismo y genes con función desconocida.

Todo esto sugiere que la quimiotaxis hacia el jasmonato juega un papel importante en la entrada de *D. dadantii* a través de heridas del tejido vegetal.

## Construcción de mutantes *matE* en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3355.

I.M. Aragón\*, I.M. Matas y C. Ramos

Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: [crr@uma.es](mailto:crr@uma.es)

La extrusión de compuestos tóxicos mediante transportadores MDR (*multidrug resistance*) es uno de los mecanismos de resistencia más efectivos y extendidos en bacterias fitopatógenas. Se ha descrito que estos transportadores tienen un papel importante en virulencia, colonización de tejidos vegetales y supervivencia *in planta*. Dentro de este grupo, se encuentra la familia de transportadores MATE (*multi antimicrobial extrusion proteins*), la cual incluye proteínas de aproximadamente 450 aminoácidos que contienen 12 segmentos transmembrana. Este tipo de transportadores, implicados en multiresistencia, funcionan mediante un mecanismo de antiporte droga/Na<sup>+</sup>. Recientemente, se ha identificado en el genoma de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000, un marco abierto de lectura de localización cromosómica que codifica una proteína MatE de 458 aminoácidos, precedido por una secuencia reguladora *hrp-box*. El gen codificador de este transportador MDR putativo (*matE*), precede al gen *iaaL* (indolacético lisina sintetasa), cuya actividad es necesaria para la formación del conjugado del ácido indol-3-acético con el aminoácido lisina (IAA-Lys). En este trabajo, hemos comprobado que ambos genes están también presentes en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) y *P. savastanoi* pv. *nerii*, sin embargo, Psv contiene dos copias de cada uno de estos genes, siendo una de ellas de localización plasmídica en algunos aislados. Psv NCPPB 3335, cepa de referencia de nuestro grupo, presenta dos copias de ambos genes de localización cromosómica. La secuencia de aminoácidos de las proteínas MatE deducidas de los genes de Pto DC3000 y Psv NCPPB 3335 son 87,1% idénticas. Utilizando RT-PCR, hemos comprobado que los dos alelos *matE* de Psv y el alelo de Pto se transcriben conjuntamente con *iaaL*. Para analizar si el gen *matE* tiene un papel en la patogenicidad y virulencia de estas cepas, se han construido mutantes de pérdida de función en este gen mediante reemplazamiento génico. Para ello, se construyeron plásmidos que portaban las regiones flanqueantes de dicho gen, separadas por un gen de resistencia a kanamicina. Hasta la fecha, se ha construido un mutante *matE* en Pto DC 30000 y un mutante de uno de los alelos de este gen en Psv NCPPB 3335. En la actualidad, estamos procediendo a la construcción del doble mutante *matE* en Psv NCPPB 3335. La competitividad del mutante *matE* de Pto DC3000 en plantas de tomate variedad *Money Maker* se encuentra significativamente reducida con respecto a la cepa silvestre.

Financiación: Proyectos del Plan Nacional de I+D+I AGL2005-02090 y AGL2008-05311-C02-02, cofinanciados por FEDER. Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía CVI-03475.

## **Identificación y caracterización de efectores del sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas syringae***

**A.P. Macho\*, J. Ruiz-Albert, P. Tornero<sup>1</sup> y C.R. Beuzón.**

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

<sup>1</sup>*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). Universidad Politécnica de Valencia – CSIC. Camino de Vera s/n. 46022, Valencia.*

*Pseudomonas syringae* es una bacteria fitopatógena cuyas estirpes se dividen en más de 50 variedades (conocidas como patovares) en función de su capacidad para infectar distintas especies vegetales, y depende de un sistema de secreción tipo III (TTSS) tanto para causar enfermedad en hospedadores compatibles como para desencadenar respuestas de hipersensibilidad (HR) en hospedadores incompatibles. El TTSS se encarga de translocar proteínas (llamadas efectores) directamente al citosol de las células del hospedador, donde van a modular diversos procesos para permitir el desarrollo de la infección. Pese a ello, ciertas variedades vegetales han evolucionado para reconocer algunos de estos efectores y desencadenar respuestas de muerte celular programada que dan lugar al aislamiento del patógeno, impidiendo su proliferación.

La búsqueda de nuevos efectores en bacterias fitopatógenas, así como su caracterización, ha sido objeto de un gran número de publicaciones en los últimos años. El criterio fundamental para determinar que un candidato es, ciertamente, un efector, es su capacidad para ser translocado a través del TTSS. El ensayo de translocación más utilizado se basa en el uso del efector truncado  $\Delta\text{AvrRpt2}$  como reporter: cuando se fusiona a un efector translocado,  $\Delta\text{AvrRpt2}$  dispara HR en plantas de *Arabidopsis* que expresan la proteína de resistencia RPS2. El análisis macroscópico de esta HR ha sido muy utilizado en los últimos años y ha permitido la identificación de un gran número de efectores. Pese a eso, el carácter semicuantitativo del método propicia que ciertos efectores con baja eficiencia de translocación no sean capaces de translocar suficiente  $\Delta\text{AvrRpt2}$  para desencadenar una HR visible. Para incrementar la sensibilidad del método, hemos desarrollado una modificación del ensayo basado en  $\Delta\text{AvrRpt2}$ , utilizando índices de competitividad en infecciones mixtas para determinar la limitación de crecimiento asociada a la inducción de HR, lo que ha permitido la identificación de cinco nuevos efectores cuya translocación no pudo ser determinada mediante los ensayos clásicos de observación de HR.

Dada su alta sensibilidad, el análisis de la virulencia utilizando índices de competitividad permite la detección de pequeñas variaciones en el crecimiento bacteriano, posibilitando el análisis genético de la interacción de determinados efectores con los sistemas de defensa del hospedador. En este trabajo se analiza la respuesta de *Arabidopsis thaliana* frente al efector HopZ1 y su relación con la respuesta, ampliamente estudiada, frente a AvrRpt2.

## **El efector HopN1 modula la muerte celular en plantas interfiriendo con la generación de estrés oxidativo.**

**M. Fernández-Pérez\*, J.J. Rodríguez-Herva, R. Cuartas Lanza,  
P. Rodríguez-Palenzuela y E. López-Solanilla**

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid*

El sistema de secreción de efectores tipo III (TTSS) y el conjunto de proteínas que viajan a través de él al interior celular, juegan un papel fundamental en la virulencia de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Esta bacteria es el agente causal de la mancha bacteriana en tomate y *Arabidopsis*. Uno de estos efectores es HopN1 (denominado anteriormente HopPtoN) que ha sido descrito cómo una cisteín proteasa capaz de suprimir la muerte celular asociada, tanto a la respuesta hipersensible (HR) en plantas resistentes, como a la enfermedad causada por esta bacteria en tomate. Este hecho apoya la hipótesis de que ambos tipos de respuesta deben compartir mecanismos comunes en su desencadenamiento en la planta. La actividad supresora de la muerte celular programada asociada a la HR ha sido descrita para otros efectores poniéndose de manifiesto que se trata de una estrategia que beneficia el desarrollo del patógeno en la planta huésped.

Con la finalidad de entender cual es la contribución en virulencia de este efector y al mismo tiempo ahondar en el conocimiento del desencadenamiento de la muerte celular en plantas, estamos desarrollando las siguientes aproximaciones:

- Identificación de la diana de HopN1 en la planta: a través de ensayos tipo “pull-down” hemos aislado cinco posibles dianas de HopN1 en hoja de tomate.
- Análisis de la evolución de la población in planta, bajo distintas condiciones, de la cepa afectada en la producción de HopN1, con el fin de estudiar su contribución específica en la patogenicidad de esta bacteria. Estamos llevando a cabo la estimación del índice de competencia entre la cepa mutante y la cepa silvestre y los primeros datos indican que existe un fenómeno de interferencia entre ambas poblaciones bacterianas.
- Estudio del efecto de la sobreexpresión de HopN1 sobre los mecanismos de defensa en plantas de tomate. Estamos analizando respuestas relacionadas con el mecanismo de inmunidad desencadenado por la presencia de patógenos como es el estrés oxidativo, la deposición de callosa o la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta de defensa en tomate. Los datos obtenidos indican que el efecto de HopN1 en la planta parece estar dirigido a la supresión de la producción del estrés oxidativo generado en respuesta a la percepción del patógeno en los primeros momentos de la infección.

## Estudio de la interacción *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*-olivo mediante *Signature Tagged Mutagenesis*

I.M. Matas\*, L. Rodríguez-Moreno y C. Ramos.

Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: [crr@uma.es](mailto:crr@uma.es)

Los procesos moleculares responsables de la interacción entre el agente causante de la tuberculosis del olivo, *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 en ramas y brotes, la multiplicación del patógeno desencadena una hipertrofia e hiperplasia de los mismos y, en consecuencia, la formación de tumores (ver comunicación presentada por Rodríguez-Moreno *et al.*). En este trabajo se ha utilizado una estrategia de genómica funcional, *Signature Tagged Mutagenesis* (STM), para la identificación de genes de Psv necesarios para su multiplicación e invasión del hospedador. Se construyó una colección de 4724 mutantes STM de la cepa de referencia Psv NCPPB 3335, cada uno de los cuales contienen un transposón *mini-Tn5*-STM portador de una etiqueta diferente (región variable de 40 pb). El análisis en masa de los mutantes, llevado a cabo en grupos de aproximadamente 45 mutantes, se realizó en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. Treinta días después de la infección, las etiquetas correspondientes a los mutantes cuya multiplicación *in planta* se encuentra reducida no se detectan mediante hibridación *Southern*. Tras dos rondas de inoculación en olivo, se seleccionaron 192 mutantes cuyas etiquetas no fueron detectadas. Hasta la fecha, se han analizado 138 mutantes (72%) en ensayos de competencia con la cepa silvestre, tanto en medio rico de cultivo como *in planta*, y se han seleccionado 39 mutantes cuya competitividad se encuentra significativamente reducida únicamente *in planta*. La identificación del punto de inserción del transposón y el análisis de las secuencias flanqueantes al mismo han revelado la identidad del gen interrumpido en todos estos mutantes. Los genes identificados pertenecen a las siguientes categorías funcionales: 1) metabolismo central o de los ácidos nucleicos, 2) sistemas de secreción Tipo II, III, IV, 3) biosíntesis de envueltas celulares, 4) respuesta a estrés y adaptación ambiental, 5) quimiotaxis y movilidad, y 6) proteínas de función desconocida. Para analizar el proceso de infección de cada uno de estos mutantes, en comparación a la cepa parental, se están llevando a cabo inoculaciones individuales de los mismos tanto en olivo *in vitro*, como en plantas de un año. Adicionalmente, estamos analizando la estructura tumoral y la localización de células bacterianas, marcadas con GFP, en tumores de olivo inducidos por al menos un mutante perteneciente a cada una de las categorías anteriores.

Financiación: Fundación Ramón Areces, Proyectos Plan Nacional I+D+I AGL2005-02090 y AGL2008-05311-C02-02, cofinanciados por FEDER.

## **Sesión VI**

# **ANÁLISIS MICROBIANO: MARCADORES EVOLUTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA**





## Secuenciación del complemento de plásmidos nativos de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335

L. Bardaji<sup>1\*</sup>, I. Pérez-Martínez<sup>2</sup>, G.W. Sundin<sup>3</sup>, C. Ramos<sup>2</sup> y J. Murillo<sup>1</sup>

*Dept. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, Pamplona; Dept. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga<sup>2</sup>; Dept. Plant Pathology, Michigan State University, East Lansing, MI, EE.UU*

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335 es una bacteria modelo para el estudio de las bases moleculares de la producción de tumores en plantas leñosas. Como parte de un proyecto más amplio de genómica, hemos acometido la secuenciación completa de los tres plásmidos nativos presentes en la cepa NCPPB3335: pPsv48A (73 Kb), pPsv48B (45 Kb) y pPsv48C (44 Kb). Inicialmente, el plásmido pPsv48A se purificó a partir de una separación electroforética y se secuenció siguiendo una estrategia de tipo *shotgun*, que puso de manifiesto la presencia de numerosas secuencias repetidas, que impidieron el ensamblaje de los *contigs* resultantes. En consecuencia, abordamos la secuenciación mediante una estrategia mixta que implica la purificación separada de cada plásmido, mediante la obtención de derivados marcados con un transposón y su propagación en cepas libres de plásmidos; la clonación de fragmentos de restricción específicos y su secuenciación mediante *primer walking* (Sanger), y el ensamblaje de las secuencias mediante PCR, utilizando cebadores diseñados con las secuencias terminales de los fragmentos de restricción. Para el ensamblaje de los *contigs* y su cierre en moléculas circulares se está utilizando, además, la secuencia obtenida mediante pirosecuenciación de los tres plásmidos. Hasta la fecha, se han confirmado 19, 39 y 35 kb correspondientes al ensamblaje de fragmentos de restricción de los plasmidos A, B y C, respectivamente. La anotación preliminar de estas secuencias ha mostrado que los tres plásmidos contienen un origen de replicación de la familia pPT23A *like*, mientras que pPsv48C contiene además otro origen de replicación homólogo a uno de *Pectobacterium carotovorum*, cuya funcionalidad estamos ensayando actualmente. Además de otros genes implicados en mantenimiento plasmídico, se han encontrado diversos genes relacionados con sistemas de secreción de Tipo IV A y B, genes de efectores del sistema de secreción de Tipo III, genes de inmunidad a bacteriocinas, reguladores transcripcionales, diversas proteínas hipotéticas y diversos elementos transponibles. Igualmente, en el plásmido A se localizan, además del gen *ptz* implicado en la biosíntesis de citoquininas, tres copias de un gen con homología a genes de shiquimato quinasa, que podrían regularse conjuntamente con efectores Tipo III, y que tienen un número variable de repeticiones internas. El ensamblaje de estas secuencias, que se complica por el gran tamaño de estos genes, de alrededor de 8 kb, y su asociación a otras secuencias repetidas, se está abordando mediante la amplificación específica de diversos fragmentos utilizando cebadores dirigidos a regiones no conservadas adyacentes a estos genes.

## **Papel en virulencia del plásmido pPsv48A (75 Kb) de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335**

**L. Rodríguez-Moreno<sup>1\*</sup>, M.P. Castañeda<sup>1</sup>, I. Pérez-Martínez<sup>1</sup>, J. Murillo<sup>2</sup> y C. Ramos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. (e-mail: crr@uma.es)

<sup>2</sup>Departamento de Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), agente causal de la tuberculosis del olivo, induce la formación de tumores en los troncos y ramas de las plantas infectadas. Las cepas de Psv se caracterizan por presentar de uno a varios plásmidos de alto peso molecular donde se codifican elementos relacionados con la virulencia de las mismas. El aislado de Psv NCPPB 3335, cepa de referencia en nuestro laboratorio, contiene 3 plásmidos nativos de aproximadamente 73 Kb (pPsv48A), 45 Kb (pPsv48B) y 44 Kb (pPsv48C), todos ellos pertenecientes a la familia de plásmidos pPT23A. Como parte de un proyecto más amplio de genómica, se está abordando actualmente la secuenciación del complemento de plásmidos de esta cepa (ver comunicación presentada por Bardaji *et al.*). Además de genes implicados en mantenimiento plasmídico, en pPsv48A se han encontrado diversos genes relacionados con el sistema de secreción de tipo IV B, un gen homólogo al codificador del efector HopAF1 del sistema de secreción de tipo III, el gen *ptz*, implicado en la síntesis de citoquininas y diversos elementos transponibles. Con la intención de analizar el papel en virulencia del plásmido pPsv48A, se construyó una cepa derivada de NCPPB 3335 curada de este plásmido (NCPPB 3335ΔpPsv48A), utilizando para ello un transposón (Tn5-GDYN1) portador del gen *sacB*, que confiere sensibilidad a sacarosa. Por otro lado, se construyó un derivado de la cepa curada de pPsv48A transformado con un plásmido desde el que se expresa el gen *ptz* a partir de su promotor original (NCPPB 3335ΔpPsv48A/*ptz*). Inoculaciones individuales en olivo *in vitro* de la cepa parental y la curada de pPsv48A mostraron que ambas cepas alcanzan densidades celulares similares 30 días después de la inoculación; sin embargo, la competitividad de la cepa curada de pPsv48A se vio significativamente reducida con respecto a la cepa silvestre, aunque esta reducción en competencia se superó en la cepa complementada con el gen *ptz*. Por otro lado, los tumores inducidos por la cepa NCPPB 3335ΔpPsv48A fueron en apariencia de menor tamaño que los inducidos por la cepa silvestre y presentaron zonas necróticas superficiales. La cepa parental y NCPPB 3335ΔpPsv48A se marcaron con la proteína verde fluorescente (GFP), utilizando para ello un derivado del plásmido pBBR1-MCS5 (pBBR1-MCS5-*gfp*-Gm), y se inocularon en plantas de olivo *in vitro*. El patrón de colonización de los tejidos vegetales por ambas cepas se siguió mediante microscopía de epifluorescencia y láser confocal. Aunque ambas cepas colonizaron la región tumoral de forma similar, tinciones histológicas de secciones transversales de tumores mostraron una menor cantidad de núcleos de xilema y floema de nueva formación en el interior de los tumores inducidos por la cepa curada de pPsv48A. En la actualidad, se está analizando el efecto en la estructura tumoral de la complementación con el gen *ptz* en la cepa NCPPB 3335ΔpPsv48A.

Financiación: Proyectos Plan Nacional I+D+I AGL2005-02090 y AGL2008-05311-C02-02, cofinanciados por FEDER.

## Evaluación de mRNA y rRNA como marcadores de viabilidad para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

M. Golmohammadi\*<sup>1</sup>, P. Llop<sup>1</sup>, G. Scuderi<sup>2</sup>, M. M. López<sup>1</sup> y J. Cubero<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Protección vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera, Km. 4.5, Moncada, 46113. Valencia.

<sup>2</sup>Department of Phytosanitary Sciences and Technologies (DISTEF) - Section Plant Pathology, University of Catania, 95123 Catania, Italy

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. de La Coruña, km 7.5, 28040 Madrid.

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) es el agente causal de la cancrrosis de los cítricos, considerada como una de las enfermedades más importantes de este cultivo ya que afecta a la mayoría de sus especies. La cancrrosis ha sido descrita en más de 30 países de Asia, África, América del Norte y del Sur y Oceanía, pero no se ha detectado en ningún país de la Unión Europea donde se considera un organismo de cuarentena. En los últimos años *Xcc* se ha detectado en España en frutos importados procedentes de países sudamericanos en las que está presente la enfermedad. Para la detección de esta bacteria se utilizan diferentes metodologías. Los métodos convencionales de aislamiento detectan células bacterianas con capacidad de crecimiento en medio de cultivo, pero el resultado puede ser negativo en el caso de células sometidas a algún tipo de estrés, por ejemplo procedentes de material tratado con agentes bactericidas. La PCR, tanto convencional como a tiempo real, ha resultado ser más efectiva que el aislamiento para realizar un diagnóstico más sensible y específico, y además es capaz de detectar la bacteria independientemente de su situación metabólica. Sin embargo, los métodos basados en la amplificación de ADN no distinguen entre células viables o no, Aspecto fundamental para determinar el peligro real de introducción de la enfermedad por frutos importados y desinfectados en origen, o para evaluar la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes.

Dentro de este contexto se ha evaluado el uso de fragmentos de ARNm y ARNr, como marcadores de viabilidad en *Xcc*. Para ello se han seleccionado fragmentos de ARN de genes relacionados en su mayoría con la supervivencia de la bacteria (*ARN 16S*, *gumD*, *avrXacE3*, *gyrB*, *rpfB*, *rpf*, *aroE*, *groEL* and *rpoH*). La concentración de estos fragmentos de ARNm y ARNr se ha analizado mediante retrotranscripción PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y NASBA, antes y después de tratamientos con ortofenilfenato sódico y alta temperatura (80°C en 10min.). Solamente el fragmento de ARNm correspondiente al gen *gumD* se ha detectado exclusivamente en células viables, mientras que los otros fragmentos de rRNA y mRNA seleccionados se han detectado también en células muertas.

## Tipificación de aislamientos asturianos de *Pseudomonas viridiflava* y detección de islas de patogenicidad

M. San José García\*<sup>1</sup>, A.J. González Fernández<sup>2</sup> y M.R. Rodicio Rodicio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Funcional-Microbiología, Universidad de Oviedo

<sup>2</sup> Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Villaviciosa, Asturias

*Pseudomonas viridiflava* es una bacteria fitopatógena con perfil LOPAT (- - + - +), que tradicionalmente ha sido considerada como patógeno de debilidad. En esta bacteria se han detectado dos tipos de islas de patogenicidad (PAIs) cromosómicas que se mantienen como polimorfismos (Araki *et al.*, 2006). La primera, denominada T-PAI, posee una estructura tripartita y coincide con la detectada en el cromosoma de *P. syringae*, mientras que la segunda, S-PAI, tiene estructura diferente y se localiza en otro lugar del cromosoma. Estas islas codifican un sistema de secreción de tipo III que introduce en la célula vegetal proteínas efectoras que son esenciales para causar enfermedad en hospedadores susceptibles y para provocar reacción de hipersensibilidad en hospedadores resistentes.

A partir de 1999 se detectó la emergencia en Asturias de una variante de *P. viridiflava* con perfil LOPAT atípico (+ - V - +). Los aislamientos atípicos, con amplio rango de hospedador, causaron daños en los principales cultivos de la región. En este trabajo se utilizó una colección de 112 aislamientos de *P. viridiflava* atípica, obtenidos en el Laboratorio de Fitopatología del SERIDA a partir de diferentes hospedadores (judía tipo granja asturiana, kiwi; lechuga y hebe). Estos aislamientos fueron tipificados en base a macrorrestricción genómica con el enzima *PmeI* seguida de electroforesis en campo pulsante (PFGE) y al perfil plasmídico.

El análisis de macrorrestricción reveló una gran diversidad de perfiles poniendo de manifiesto la heterogeneidad de los aislamientos, lo cual está en contra de su introducción o emergencia reciente en Asturias.

Para determinar el contenido plasmídico se utilizó una modificación del método de lisis alcalina de Birnboim (Ebert *et al.*, 1987), demostrándose la presencia de DNA extracromosómico en un número limitado de aislamientos. De los 112 analizados solamente 9 presentaron plásmidos de gran tamaño (en torno a 100 kb) y otros 9 plásmidos pequeños (entre 1500 y 4000 pb). Actualmente se está procediendo a la caracterización de estos plásmidos mediante determinación del grupo de incompatibilidad, perfil de restricción y determinación de la existencia o no de hibridación cruzada, como paso previo a su análisis funcional.

Finalmente se determinó la distribución de T-PAI y S-PAI en los aislamientos atípicos, mediante amplificaciones por PCR que permiten poner de manifiesto la presencia/ausencia de cada una de las islas. Se utilizaron oligonucleótidos previamente descritos (Araki *et al.* 2006) junto con otros diseñados por nosotros. Las islas T-PAI y S-PAI fueron respectivamente detectadas en el 12,5% (14/112) y el 61.6% (69/112) de los aislamientos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para *P. viridiflava* típica donde sólo el 10% de los aislamientos analizados poseían T-PAI (Araki *et al.*, 2006). En nuestro trabajo, 29 aislamientos no mostraron un resultado claro con los oligonucleótidos utilizados, por lo que será necesario el diseño de otros nuevos.

Araki H, Tian D, Goss EM, Jakob K, Halldorsdottir SS, Kreitman M and Bergelson J. 2006. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 5887-5892.

Ebert PR, Ha SB, An G. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 5745-5749.

## Localización subcelular en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* de la proteína codificada por el intrón bacteriano del grupo II RmInt1

R. Nisa-Martínez\*<sup>1</sup>, J.I. Jiménez-Zurdo<sup>1</sup>, F. Frugier<sup>2</sup>, M. Crespi<sup>2</sup> y N. Toro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18008 Granada, España.

<sup>2</sup> Institut des Science du Vegetal, Centre National de la Recherche Scientifique, 1, Av. de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette, France.

Los métodos usados para el análisis funcional del genoma de plantas se basan, esencialmente en la mutagénesis al azar por métodos químicos, radiación ionizante o en elementos de inserción. Otros métodos, como el ARN antisentido, el ARN interferente y el silenciamiento génico mediado por virus (VIGS) son inestables y pueden producir interrupción de la función génica de forma transitoria y/o incompleta.

En nuestro laboratorio trabajamos con RmInt1, un intrón bacteriano del grupo II descrito en el simbionte de leguminosas *Sinorhizobium meliloti* (1). Es un ARN autocatalítico asociado a una proteína específica (IEP) codificada en uno de sus dominios y que madura de forma similar a los intrones espliceosómicos (2). Además es un elemento genético móvil capaz de reconocer específicamente una secuencia corta de ADN (3) e insertarse en ella de forma muy eficiente (4) mediante un mecanismo independiente de recombinación homóloga. A su vez, es capaz de transportar información genética útil al sitio del genoma deseado (5). Su movilidad depende mínimamente de funciones celulares propias del organismo hospedador y su especificidad de diana podría ser modificada para redirigir el intrón e interrumpir una secuencia de ADN de interés. En este sentido, la aplicación de los intrones del grupo II como vectores de reconocimiento génico en plantas y el posible desarrollo de sistemas de mutagénesis dirigidos y específicos en estos eucariotas superiores es uno de los principales objetivos de la investigación desarrollada por nuestro grupo.

En esta comunicación se presenta una primera aproximación consistente en determinar la localización subcelular de la IEP en protoplastos de *A. thaliana*. Con este fin se han llevado a cabo ensayos de expresión transitoria mediante transfección con plásmidos que contienen fusiones traduccionales, con la proteína fluorescente verde (GFP), de la secuencia codificante de la IEP, en su versión silvestre, distintos mutantes y deleciones.

### Referencias:

1. Martínez-Abarca *et al.* 1998 *Mol Microbiol* **28**: 1295-1306
2. Toro *et al.* 2007 *FEMS Microbiol Rev* **31**: 342-358
3. Jiménez-Zurdo *et al.* 2003 *J Mol Biol* **326**: 413-423
4. Nisa-Martínez *et al.* 2007 *Nucleic Acids Res* **35**: 214-222
5. Martínez-Abarca *et al.* 2004 *Nucleic Acids Res* **32**: 2880-2888

## Desarrollo de un protocolo de transformación estable de *Podosphaera fusca*, agente causal del oídio de las cucurbitáceas

D. Vela<sup>1\*</sup>, F. López-Ruiz<sup>2</sup>, A. de Vicente<sup>1</sup>, J. A. Torés<sup>2</sup> y A. Pérez-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada al CSIC, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga

<sup>2</sup>Estación Experimental "La Mayora" (CSIC), Algarrobo-Costa, 29750 Málaga

Las cucurbitáceas son un cultivo de enorme importancia en España y especialmente en Andalucía. Con una gran variedad de cultivos de alto valor económico como los de melón, sandía, pepino y calabacín, juegan un papel muy importante tanto en la dieta local como en cuanto a productos de exportación se refiere. Estos cultivos son continuamente atacados por numerosas enfermedades que causan considerables pérdidas y tienen una importante repercusión económica. Entre éstas, una de las enfermedades de origen fúngico más devastadoras es probablemente el oídio de las cucurbitáceas, cuyo principal agente causal es *Podosphaera fusca*. El diseño de programas de control eficaces requiere un buen conocimiento de la biología del agente responsable de la enfermedad. Los oídios son probablemente el grupo de patógenos vegetales más desconocido desde el punto de vista genético y molecular, con la única excepción del oídio de los cereales *Blumeria graminis*. El carácter obligado de estos patógenos y su consecuente incapacidad para crecer en medios de cultivo artificiales han obstaculizado significativamente su investigación. En otros temas, un importante aspecto todavía sin resolver es su transformación genética. Desde los primeros trabajos sobre la transformación de los hongos filamentosos modelo *Neurospora crassa* y *Emericella nidulans*, muchas otras especies de hongos de interés comercial y agronómico han podido ser transformadas, sin embargo, los hongos biotrofos obligados como los oídios se muestran recalcitrantes a este proceso. Métodos de transformación tales como la fusión de protoplastos o la transformación mediada por *Agrobacterium*, o bien no son aplicables a este tipo de organismos como el primero, o presentan importantes limitaciones metodológicas como el segundo. Hasta la fecha, únicamente mediante biobalística ha sido posible la transformación de una especie de oídio, *B. graminis* f.sp. *hordei*, pero esta técnica se ha mostrado como un método carente de reproducibilidad. Por ello, en este trabajo hemos abordado la transformación genética de conidios de *P. fusca* mediante electroporación, uno de los métodos de transformación más comúnmente utilizado. Los ensayos de transformación se están llevando a cabo usando plásmidos pAN7-1 y pIGPAPA. Estos plásmidos contienen como marcador de selección el gen *hph* de *E. coli* que confiere resistencia a higromicina B, bajo el control de los promotores de los genes *gpdA* y *trpC* de *E. nidulans*, respectivamente. En paralelo, se están ensayando construcciones realizadas mediante PCR de fusión, formadas por el gen *hph* y promotores nativos de *P. fusca*, como los de los genes *cyp51* (C14 $\alpha$ -demetilasa) y  $\beta$ -tubulina. Estos promotores se obtuvieron mediante PCR usando DNA genómico de *P. fusca* digerido con enzimas de restricción y ligado a adaptadores, y cebadores específicos para estos genes y para los correspondientes adaptadores.

## **Listado de participantes**





Apellidos	Nombre	e-mail	Centro
Abarca-Grau	Ana M <sup>a</sup>	abarca_ana@gva.es	Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA
Amaya Gómez	Carol V.	carolamaya@gmail.com	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Aragón Cortes	Isabel M <sup>a</sup>	isabel.aragon@hotmail.com	Universidad de Málaga
Azcón González de Aguilar	Concepción	cazcon@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Barahona Martín	Emma	emma.barahona@uam.es	Universidad Autónoma de Madrid
Bardají Goicoetxea	Leire	leire.bardaji@unavarra.es	Universidad Pública de Navarra
Bellón Gómez	Davinia	davibellon@hotmail.com	Estación Experimental "La Mayora". CSIC
Benabdellah	Karim	karim.benabdellah@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Bonaterra Carreras	Anna	anna.bonaterra@udg.edu	Universidad de Girona
Bonilla Ruiz	Nuria	bonilla@uma.es	Universidad de Málaga
Cabrefiga Olamendi	Jordi	jordic@intea.udg.edu	Universidad de Girona
Carrión Bravo	Víctor J.	vcarrion@uma.es	Universidad de Málaga
Castañeda Ojeda	Pilar	pco_84@hotmail.com	Universidad de Málaga
Cazorla López	Francisco M.	cazorla@uma.es	Universidad de Málaga
Crespo Rivas	Juan Carlos	juancreriv@alum.us.es	Universidad de Sevilla
Cubero Dabrio	Jaime	cubero@inia.es	INIA
de Vicente Moreno	Antonio	adevicente@uma.es	Universidad de Málaga
Delgado Igeño	M <sup>a</sup> Jesús	mdelgado@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Delgado Santander	Ricardo	delsanri@uv.es	Universidad de Valencia
Escolano	Jordi	jordi.escolano@uab.es	Universidad Autónoma de Barcelona
Espinosa Urgel	Manuel	manuel.espinosa@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Fernández López	Manuel	manuel.fernandez@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Fernández López	Iván	ivan.fernandez@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Fernández Pérez	Mercedes		Universidad Politécnica de Madrid
Fernández Piñar	Regina	regina.fernandez@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Ferrol González	Nuria	nuria.ferrol@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Gaju	Núria	nuria.gaju@uab.es	Universidad Autónoma de Barcelona
Gallegos Fernández	M <sup>a</sup> Trinidad	mtrini@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
García Gutiérrez	Laura	lauragg@uma.es	Universidad de Málaga
Golmohammadi	Morteza	golmohammadi_mor@gva.es	IVIA
Gutiérrez Barranquero	J. Antonio	jagutierrez@uma.es	Universidad de Málaga
Hermosa Prieto	M <sup>a</sup> Rosa	rhp@usal.es	Universidad de Salamanca
Jung	Sabine	sabine.jung@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
López Contreras	José Antonio	joseantonio.lopez@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
López Ráez	Juan Antonio	juan.lopezraez@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
López Ruiz	Francisco J.	iknarf1979@hotmail.com	Estación Experimental "La Mayora". CSIC
López Solanilla	Emilia	emilia.lopez@upm.es	Universidad Politécnica de Madrid
Macho Escribano	Alberto	macho@uma.es	Universidad de Málaga
Margaret Oliver	Isabel M <sup>a</sup>	isa_margaret@us.es	Universidad de Sevilla
Martínez Alonso	Maira	maira.martinez@uab.es	Universidad Autónoma de Barcelona
Martínez-Abarca Pastor	Francisco	fmabarca@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Martínez-Gil Vázquez	Marta	marta.martinezgil@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Matas Casado	Isabel M <sup>a</sup>	imatas@uma.es	Universidad de Málaga
Matilla Vázquez	Miguel	miguel.matilla@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Molina Delgado	Lázaro	lazaromolina@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC

<b>Apellidos</b>	<b>Nombre</b>	<b>e-mail</b>	<b>Organización</b>
Monte Vázquez	Enrique	emv@usal.es	CIALE. Universidad de Salamanca
Mora Pons	Isabel	isabel.mora@udg.edu	Universitat de Girona
Morán Díez	Mª Eugenia	epg10@usal.es	CIALE. Universidad de Salamanca
Murillo García	Jesús	jesus.murillo@unavarra.es	Universidad Pública de Navarra
Navazo Alonso	Ana	ana.navazo@uam.es	Universidad Autónoma de Madrid
Nisa Martínez	Rafael	rafael.nisa@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Nogales Díaz	Joaquina	quina@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Peñalver Navarro	Ramón	penalver_ram@gva.es	Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA
Pérez García	Alejandro	aperez@uma.es	Universidad de Málaga
Pérez Montaña	Francisco	fcopermon@alum.us.es	Universidad de Sevilla
Pozo Jiménez	María José	mjpozo@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Quesada Pérez	José Miguel	quesada_jos@gva.es	IVIA
Ramos González	Mª Isabel	maribel.ramos@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Ramos Rodríguez	Cayo	crr@uma.es	Universidad de Málaga
Reguera Blázquez	María	maria.reguera@uam.es	Universidad Autónoma de Madrid
Rivilla Palma	Rafael	rafael.rivilla@uam.es	Universidad Autónoma de Madrid
Robledo Garrido	Marta	martag@usal.es	CIALE. Universidad de Salamanca
Rodríguez Herva	José Juan	jj.rodriguez@upm.es	Universidad Politécnica de Madrid
Rodríguez Moreno	Luis Gabriel	lgridro@uma.es	Universidad de Málaga
Rodríguez Palenzuela	Pablo	pablo.rpalenzuela@upm.es	Universidad Politécnica de Madrid
Rubio Pérez	Mª Belén	belennu@usal.es	Universidad de Salamanca
Ruiz Argüeso	Tomás	t.ruizargueso@upm.es	Universidad Politécnica de Madrid
Sabuquillo Castrillo	Mª del Pilar	mpsc@inia.es	INIA
San José García	Mateo	matsjg@gmail.com	Universidad de Oviedo
Sánchez Cañizares	Carmen	carmen.sanchez@upm.es	Universidad Politécnica de Madrid
Sánchez Gómez	Cristina	cristina.sanchez@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Sanjuán Pinilla	Juan	juan.sanjuan@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Santamaría Hernando	Saray	saray.santamaria@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Sena Vélez	Marta	sena.marta@inia.es	INIA
Soriano Botella	Mª Isabel	mariaisabel.soriano@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Soto Misffut	Mª José	mariajose.soto@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Torres Cortes	Gloria	gloria.torres@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Travieso Huertas	María L.	mluisa.travieso@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
van Dillewijn	Pieter	pieter.vadillewijn@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Vargas Gallego	Paola A.	paola.vargas@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Vela Corcia	David	davidmicro@hotmail.com	Universidad de Málaga
Vilardell Bartino	Albert	albert.vilardell@udg.edu	Universitat de Girona
Yousef Coronado	Fátima	fatima.yousef@eez.csic.es	Estación Experimental del Zaidín. CSIC
Zeriuoh	Houda	hzeriuoh@uma.es	Universidad de Málaga
Zumaquero Jiménez	Adela	zumaquero@uma.es	Universidad de Málaga