

**VI Reunión del Grupo Especializado SEM
Microbiología de Plantas
Miraflores de la Sierra (Madrid)
11 al 13 de Marzo de 2015**



Con el patrocinio de:



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



<https://es.fishersci.com/es/>

Organizado Por:



Comité Organizador:

Rafael Rivilla Palma

Universidad Autónoma de Madrid

Marta Martín Basanta

Universidad Autónoma de Madrid

Miguel Redondo Nieto

Universidad Autónoma de Madrid

Emilia López Solanilla

Universidad Politécnica de Madrid

Pablo Rodríguez Palenzuela

Universidad Politécnica de Madrid

MIÉRCOLES 11 DE MARZO**14:30 Registro y Acomodación****16:00 Inauguración de la Reunión****16.30-17.30 Sesión 1 (Moderadores José Manuel Palacios y Francisco López Baena)****Ecología e Interacciones**

16.30 Expresión del gen de la acetamidasa *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su efecto en la interacción *Trichoderma*-tomate.

M. B. Rubio*, S. Domínguez, R. E. Cardoza, S. Gutiérrez, C. Nicolás, R. Hermosa y E. Monte

16.45 Rhizobial Type 3 secretion system effectors suppress the early soybean defense responses induced by its natural symbiont *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103.

I. Jiménez-Guerrero*, F. Pérez-Montaño, J.A. Monreal, G.M. Preston, H. Fones, B. Vioque, F.J. Ollero y F.J. López-Baena.

17.00 Factores bacterianos implicados en la eficiencia dependiente de hospedador (host-dependent symbiotic efficiency, Hse) en la simbiosis de *R. leguminosarum* bv *viciae* con leguminosas.

A. Sanz-López*, N. de la Torre, L. Rubio-Sanz, B. Brito, J.M. Palacios.

17.15 Regulación de los mecanismos de virulencia en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 en función de las diferentes condiciones de luz.

S. Santamaría-Hernando*, S. Caro Rodríguez, E. López-Solanilla.

17.30 CAFÉ**18.00-19.30 Sesión 2 (Moderadores Luís Rey y M^a José Soto)**

18.00 NopC is a Rhizobium-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium fredii* HH103.

F. Pérez-Montaño*, I. Jiménez-Guerrero, F.J. Ollero, F.J. López-Baena.

18.15 *atoS*, nuevo gen implicado en la regulación de la movilidad de *Pseudomonas fluorescens* F113.

C. Muriel*, B. Jalvo, T. Wong, M. Redondo-Nieto, R. Rivilla, M. Martín.

18.30 Análisis transcriptómico de respuestas a la colonización de raíces por el agente de biocontrol endofítico *P. fluorescens* PICF7 en tejidos de olivo

C. Gómez-Lama Cabanás*, E. Schiliro, M. Ferrara, A. Valverde-Corredor, F. Nigro y J. Mercado-Blanco.

18.45 Estudio del mecanismo regulatorio de la simbiosis de *Rhizobium tropici* CIAT899 inducido por flavonoides y estrés abiótico.

P. del Cerro*, F. Pérez-Montaño, I. Jiménez-Guerrero, M.A. Rodríguez-Carvajal, A. Gil-Serrano, F.J. López-Baena, M. Megías, M. Hungría, F. J. Ollero.

19.00 Señales y genes bacterianos implicados en movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*: Papel en el establecimiento de simbiosis.

L. Bernabéu-Roda*, N. Calatrava-Morales y M.J. Soto.

19.15 El regulador *mucR1* de *Sinorhizobium fredii* HH103 juega un papel importante en producción de EPS, formación de biopelículas y simbiosis con soja.

S. Acosta-Jurado*, P.S. Murdoch., M.A. Rodríguez-Carvajal, J.E. Ruiz-Sainz, S. Zehner, M. Göttfert y J.M. Vinardell

21.00 CENA

JUEVES 12 DE MARZO

9.30-11.00 Sesión 3 (Moderadores Jesús Murillo y Cayo Ramos)

Patogénesis

9.30 Resistencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 frente a compuestos antimicrobianos de tomate mediada por bombas de extrusión multidroga.

M. Senovilla, A. González-Mula, I. Río-Álvarez, S. Bertrand, P. M. Martínez-García, M. J. Navas Vásquez, P. Rodríguez-Palenzuela, E. López-Solanilla y J. J. Rodríguez-Herva *

9.45 Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, causante de la mancha bacteriana de los frutales de hueso.

G. Morales*, I. Llorente, E. Montesinos y C. Moragrega.

10.00 Transformación de *Podosphaera xanthii* mediante *Agrobacterium tumefaciens* y su aplicación para el estudio de efectores.

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

10.15 Análisis genómico y funcional de los efectores de las familias HopAF y HopAO del sistema de secreción tipo III de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335

M. P. Castañeda-Ojeda*, E. López-Solanilla y C. Ramos.

10.30 Los sistemas toxina-antitoxina de plásmidos de *Pseudomonas syringae* contribuyen al mantenimiento, número de copia e integridad estructural.

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

10.45 Implicación del silenciamiento génico en la regulación de genes R durante la interacción con *Pseudomonas syringae*.

D. López-Márquez*, E.A. Rodríguez-Negrete, A. Zumaquero, E.R. Bejarano, C.R. Beuzón.

11.00 CAFÉ

11.30-16.00 EXCURSIÓN con bocadillos POR LOS ALREDEDORES DE LA CRISTALERA

14.30 COMIDA

16.00-17.30 Sesión 4 (Moderadores Raúl Rivas y Ramón Peñalver)

Diversidad

- 16.00 Supresividad y análisis de la comunidad microbiana de un suelo agrícola enmendado con cáscara de almendra.
C. Vida.*, A. de Vicente, F. Cazorla.
- 16.15 Estudio genómico de la variación de fase en *Pseudomonas fluorescens* F113 durante la colonización de la rizosfera.
P. Vesga*, M. Redondo-Nieto, M. Martín, R. Rivilla.
- 16.30 Caracterización de sistemas de secreción tipo III y tipo VI en *Bradyrhizobium*.
A. Pacheco*, D. Durán, T. Ruiz-Argüeso, J. Imperial, JM. Palacios y L. Rey.
- 16.45 Caracterización del elemento genético móvil GInt.
M. Echeverría*, L. Bardaji, P. Martínez² P. Rodríguez-Palenzuela y J. Murillo.
- 17.00 La filogenia del complejo *Pseudomonas fluorescens* revela nueve grupos ecofisiológicos con caracteres específicos relacionados con su capacidad PGPR y de biorremediación.
D. Garrido-Sanz*, M. Martín, R. Rivilla y M. Redondo-Nieto.
- 17.15 Evolución de la biosíntesis de faseolotoxina en *P. syringae*.
L. Bardaji*, M. Echeverría y J. Murillo.

17.30 CAFÉ

18.00-19.30 Sesión 5 (Moderadores Antonio de Vicente y Eva Arrebola)

Aplicaciones de las Interacciones Planta Microorganismo

- 18.00 Péptidos antimicrobianos sintéticos en el control de enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae, *Xanthomonas fragariae* y *X. arboricola* pv. pruni.
L. Montesinos*, L. Ruz, E. Montesinos, E. Badosa.
- 18.15 Potencial de cepas de *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. como agentes de control biológico de enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae, *Xanthomonas fragariae* y *X. arboricola* pv. pruni.
I. Mora*, J. Francés, A. Bonaterra, E. Montesinos, J. Cabrefiga.
- 18.30 Identificación y caracterización de bacterias de la rizosfera de olivo con potencial como agentes de control biológico de amplio espectro.
D. Ruano-Rosa*, A. Valverde-Corredor, C. Gómez-Lama Cabanás, J. Mercado-Blanco.
- 18.45 Análisis del potencial biofertilizante de bacterias PGPR para la mejora del enraizamiento de cereales.
L. Celador-Lera*, E. Menéndez, J.D. Flores-Félix, S. Sánchez-Herrero, E. Velázquez y R. Rivas.

19.00 Análisis de la diversidad en *Lactobacillus plantarum* con potencial como agentes de biocontrol de bacteriosis de las plantas.

N. Daranas*, G. Roselló, E. Badosa, E. Montesinos y A. Bonaterra.

21.00 CENA SOCIAL

VIERNES 13 DE MARZO

9.30-11.00 Sesión 6 (Moderadores Francisco Cazorla y Alejandro Pérez García)

9.30 El uso de mutantes fluorescentes demuestra que *Trichoderma harzianum* coloniza las raíces de olivo y reduce el desarrollo de la Verticilosis causada por *Verticillium dahliae*.

I. Carrero-Carrón*, M. B. Rubio, E. Monte, R. M. Jiménez-Díaz y R. Hermosa.

9.45 Aislamiento de bacterias endófitas de *Crocus serotinus* y análisis de su potencial PGPB en *Crocus sativus* (Azafrán).

A. Díez-Méndez*, E. Menéndez, L. Celador-Lera, M. Marcos-Gacía, E. Martínez-Molina y R. Rivas.

10.00 Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas* con actividad PGPR.

S. García, M. Torres, M. Martín, R. Rivilla y E. Arrebola.

10.15 *Rhizobium leguminosarum* como potencial biofertilizante de cultivos de espinaca.

A. Jiménez-Gómez*, E. Menéndez, J.D. Flores-Félix, P. García-Fraile, P.F. Mateos y R. Rivas.

10.30 Detección de compuestos producidos por dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* relacionados con su capacidad bioestimulante y actividad antimicrobiana.

M.C. Magno*, J. Hierrezuelo, C. Ramos, A. de Vicente, A. Pérez-García y D. Romero.

10.45 CAFÉ

11.15-12.15 Sesión 7 (Moderadores Juan Antonio Torés y Diego Romero)

11.15 *Azoarcus* sp. CIB, un nuevo endófito del arroz con importantes propiedades útiles en fitorremediación.

M. Carmona Pérez*, H. Fernández-Llamosas, M. Fernández-Pascual, S. Fajardo, C. Morcillo, L. Castro, M. L. Blázquez y E. Díaz.

11.30 Evaluación del potencial del género *Populus* como fuente de obtención de microorganismos productores de celulasas de interés biotecnológico.

P. M. Ávila-Barba, E. Menéndez, X. Cruz-González, P. García-Fraile, P.F. Mateos y R. Rivas*.

11.45 Una región genómica implicada en la formación de fibras tipo amiloide en el biofilm de *Bacillus cereus*.

J. Caro-Astorga*, A. Pérez-García, A. de Vicente, D. Romero.

12.00 Una colección de vectores de integración para estudios de expresión y regulación génica en cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

A. Polonio*, M. Rincón, A. de Vicente, A. Pérez, D. Romero.

12.00 ASAMBLEA MIP

13.30 CLAUSURA DE LA REUNIÓN

14.00 COMIDA DE CLAUSURA

ECOLOGÍA E INTERACCIONES

Expresión del gen de la acetamidasa *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su efecto en la interacción *Trichoderma*-tomate

M. B. Rubio^{1*}, S. Domínguez¹, R. E. Cardoza², S. Gutiérrez², C. Nicolás¹, R. Hermosa¹ y E. Monte¹

¹Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. ²Área de Microbiología, Escuela Universitaria de Ingeniería Agrícola, Universidad de León, Campus de Ponferrada
E-mail: belenru@usal.es

El género *Trichoderma* incluye especies fúngicas útiles como agentes de control biológico y/o biofertilizantes. Durante muchos años se han estudiado los distintos mecanismos de *Trichoderma* como agente de biocontrol de enfermedades de plantas causadas por patógenos fúngicos, bacterias y virus, dentro de los cuales se incluyen el micoparasitismo, la competencia y la antibiosis. Sin embargo, son cada vez más los estudios que se centran en las respuestas beneficiosas que *Trichoderma* ejerce sobre las plantas, estimulando el crecimiento, activando las defensas y/o aumentando su capacidad para solubilizar nutrientes. El gen *amdS*, que codifica una acetamidasa del patógeno humano *Aspergillus nidulans*, se usa como marcador de selección en transformaciones llevadas a cabo en distintos hongos, como es el caso de *Trichoderma*, sin reparar en el efecto que puede causar la introducción de dicho gen en el genoma de los organismos receptores. En este trabajo se ha llevado a cabo la obtención y la caracterización de transformantes de *Trichoderma harzianum* que expresan el gen *amdS* de *A. nidulans*. Los transformantes mostraron un mayor crecimiento, una menor esporulación y una mayor liberación de amonio que la cepa silvestre en medios de cultivo conteniendo distintos tipos de amidas. Ensayos de interacción *Trichoderma*-tomate pusieron de manifiesto que el tratamiento con *Trichoderma* afectaba al crecimiento de estas plantas y que, en comparación con la cepa silvestre, la expresión del gen *amdS* producía un aumento significativo en la longitud de la parte aérea y de la raíz de las mismas. Estos resultados indican una influencia del gen *amdS* en el desarrollo de las plantas, probablemente relacionado con su capacidad para facilitar la disponibilidad de nutrientes asimilables por las mismas. Un análisis transcriptómico de plantas de tomate en interacción con *Trichoderma* reveló una menor expresión de genes relacionados con respuestas de defensa de la planta en interacción con los transformantes *amdS* respecto a la cepa silvestre. Este hecho, junto con el mayor desarrollo observado en las plantas en interacción con los mismos, está de acuerdo con el modelo de compensación defensa-crecimiento propuesto para la interacción *Trichoderma*-planta.

Rhizobial Type 3 secretion system effectors suppress the early soybean defense responses induced by its natural symbiont *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103

I. Jiménez-Guerrero*, F. Pérez-Montaña, J. A. Monreal, G. M. Preston, H. Fones, B. Vioque, F. J. Ollero and F. J. López-Baena.

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

E-mail: ijimgue@us.es

Plants that interact with pathogenic bacteria in their natural environments have developed barriers to block or contain the infection. Phytopathogenic bacteria have evolved mechanisms to subvert these defenses and promote infection. Thus, the type 3 secretion system (T3SS) delivers bacterial effectors directly into the plant cells to alter host signaling and suppress defenses, providing an appropriate environment for bacterial multiplication. Some rhizobial strains possess a symbiotic T3SS that seems to be involved in the suppression of host defenses to promote nodulation and determine the host range. In this work we show that the inactivation of the *Ensifer (Sinorhizobium) fredii* HH103 T3SS negatively affect soybean nodulation very early in the symbiotic process, which is associated with a reduction of the expression of early nodulation genes. This symbiotic phenotype could be the consequence of the bacterial triggering of soybean defense responses associated to the production of salicylic acid (SA) and the impairment of the T3SS mutant to suppress these responses. Interestingly, the early induction of the transcription of *GmMPK4*, which negatively regulates SA accumulation and defense responses in soybean, in plants inoculated with HH103 could be associated to the differential defense responses induced by the parental and the T3SS mutant strain.

Factores bacterianos implicados en la eficiencia dependiente de hospedador (*host-dependent symbiotic efficiency*, Hse) en la simbiosis de *R. leguminosarum* bv *viciae* con leguminosas.

A. Sanz-López*, N. de la Torre, L. Rubio-Sanz, B. Brito, J.M. Palacios.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) y Departamento de Biotecnología, ETS de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo. 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid.

E-mail:jose.palacios@upm.es

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* es una bacteria endosimbiótica capaz de establecer asociaciones efectivas con leguminosas de distintos géneros, incluyendo *Pisum*, *Lens*, *Vicia* y *Lathyrus*. Para esta bacteria se han descrito diversos fenotipos simbióticos dependientes del huésped: la expresión de la hidrogenasa, que recicla el hidrógeno producido por la nitrogenasa, se produce en nódulos de guisante, pero no en lenteja (Brito et al., 2008); de forma similar, el transporte del níquel requerido para la síntesis de la hidrogenasa se produce de forma distinta en los bacteroides de *R. leguminosarum* UPM791 según estén inducidos en nódulos de lenteja o guisante (Brito et al., 2010), y la interacción entre los mecanismos de entrada y salida de este metal son distintos en ambos hospedadores (Rubio-Sanz et al., 2013). Estas diferencias sugieren que las distintas leguminosas dentro del mismo grupo de inoculación cruzada pueden modular de forma distinta la expresión de genes en el microsimbionte. El estudio de estas diferencias puede ayudar a comprender mejor la participación de la planta en la compleja interacción entre ambos componentes durante la simbiosis.

La mutagénesis aleatoria de la cepa *R. leguminosarum* UPM1137 ha conducido a la identificación de un mutante (UPM4239) que presenta un fenotipo simbiótico dependiente de hospedador. El mutante es deficiente en plantas de guisante, en las que induce nódulos blancos conteniendo pocas células bacterianas, principalmente indiferenciadas, mientras que mantiene la inducción de nódulos normales, efectivos, en simbiosis con plantas de lenteja. La cepa silvestre fija nitrógeno de forma eficiente tanto en lenteja como en guisante. Se ha introducido en el mutante una genoteca genómica de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. El análisis de los clones que complementan el fenotipo deficiente en guisante ha permitido identificar una región de ADN cuyo análisis se está realizando y se presentará en la comunicación.

Referencias:

- Brito, B., A. Toffanin, R. I. Prieto, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, and J. M. Palacios. 2008. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:597-604.
- Brito, B., R. I. Prieto, E. Cabrera, M. A. Mandrand-Berthelot, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, and J. M. Palacios. 2010. *J. Bacteriol.* 192:925-35.
- Rubio-Sanz, L., R. I. Prieto, J. Imperial, J. M. Palacios, and B. Brito. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6414-22.

Regulación de los mecanismos de virulencia en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en función de las diferentes condiciones de luz.

S. Santamaría-Hernando*^{1,2}, S. Caro Rodríguez^{1,2}, E. López-Solanilla^{1,2}

¹*Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid (UPM).*

²*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). UPM-INIA. Madrid.
E-mail: saray.santamaria@upm.es*

La luz se considera un regulador clave de los mecanismos defensivos de la planta. Desde un contexto co-evolutivo las bacterias fitopatógenas serían capaces de percibir las diferentes condiciones de luz, lo que se correlacionaría con diferentes niveles de resistencia de la planta. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (PsPto) es el agente causal de la mancha bacteriana en tomate, una enfermedad que conlleva importantes pérdidas económicas en ese cultivo a nivel mundial. PsPto es un patógeno hemibiotrofo que habita en la filosfera de plantas de tomate. En este hábitat debe hacer frente a diversas situaciones ambientales adversas entre las que destaca una alta exposición a la luz solar. Ésta, además de constituir un factor de estrés, puede suponer una fuente de información para esta bacteria. PsPto presenta en su genoma un dominio receptor de luz azul de tipo LOV (“light-oxygen-voltage”) y dos bacteriofitocromos, receptores de luz roja, que le permiten percibir distintas condiciones de luz. En un estudio previo de nuestro laboratorio se puso de manifiesto que la luz blanca inducía una reprogramación de la expresión génica en PsPto generando un incremento en la biosíntesis de exopolisacáridos y reprimiendo la motilidad flagelar. El análisis de estos resultados empleando un mutante en el dominio LOV mostró que el componente azul de la luz parece ser el responsable de los fenotipos observados. Para profundizar en el efecto regulador de la luz sobre PsPto, hemos llevado a cabo un análisis de los cambios a nivel transcripcional en respuesta a diferentes luces monocromáticas (azul y roja), comparando la cepa silvestre y el mutante en el fotorreceptor LOV. Los resultados preliminares indican que la regulación de la percepción de la luz puede estar controlada por el equilibrio entre la luz azul y la roja. Para evaluar si las diferentes proteínas fotosensoras de PsPto forman una red integrada que regula diversos comportamientos en respuesta a la luz se han generado mutantes en los dos bacteriofitocromos.

Por otro lado hemos comprobado que los cambios en adhesión y motilidad de PsPto regulados por la luz suponen una limitación para la entrada de esta bacteria en el apoplasto y, por tanto, conllevan una reducción de su capacidad de virulencia. Esto parece indicar que el cambio a un estilo de vida patogénico, que precisa de la entrada en el apoplasto, podría ser dependiente de las condiciones de luz. Para determinar el efecto de las diferentes condiciones de luz en el desencadenamiento de la infección por PsPto, estamos realizando un análisis transcriptómico global de esta bacteria en los estadios previos a la infección tanto fuera como dentro de la filosfera. Esto nos proporcionará información sobre el modo en que PsPto regula sus mecanismos de virulencia a través de la percepción de la luz.

NopC is a *Rhizobium*-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium fredii* HH103.

F. Pérez-Montaña*, I. Jiménez-Guerrero, F.J. Ollero, F.J. López-Baena.

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

E-mail: fperezm@us.es

Sinorhizobium fredii HH103 is a nitrogen-fixing bacterium able to nodulate many legumes, including soybean, which is considered its natural host plant. In several rhizobia, root nodulation is influenced by proteins, called Nodulation outer proteins (Nops), secreted through the type III secretion system (T3SS). This specialized secretion apparatus is a common virulence mechanism of many plant and animal pathogenic bacteria that delivers proteins directly into the eukaryotic host cells. These proteins are called “effectors” due to their action within the eukaryotic cell, where they interfere with signal transduction pathways and promote infection suppressing host defenses. In rhizobia, these proteins are involved in host-range determination and symbiotic efficiency. HH103 secretes at least eight Nops through the T3SS. Some of them cannot be considered real effectors, since they are components of the extracellular appendages of the T3SS machinery. Interestingly, among the effectors secreted, there are *Rhizobium*-specific proteins, such as NopC, that do not have homologues in pathogenic bacteria. To date, no reports about the role in symbiosis of this putative effector protein have been published. In this work, we characterize for the first time the *S. fredii* HH103 *nopC* gene and confirm that its expression is regulated in a flavonoid-, NodD1- and TtsI-dependent manner. Besides, results indicate that the HH103 NopC have a positive effect on symbiosis with soybean and that this protein is delivered directly into *Glycine max* cv Williams root cells by means of the T3SS machinery. All these results indicate that NopC can be considered a real effector secreted by *Sinorhizobium fredii* HH103.

This work was supported by project P11-CVI-7050 of the Junta de Andalucía.

***atoS*, nuevo gen implicado en la regulación de la movilidad de *Pseudomonas fluorescens* F113.**

C. Muriel*, B. Jalvo, T. Wong, M. Redondo-Nieto, R. Rivilla, M. Martín.

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

La rizosfera es un nicho ecológico propicio para el desarrollo de gran cantidad de microorganismos debido a los diversos exudados que las raíces de las plantas pueden proporcionarles. Las bacterias que viven asociadas a la raíz de las plantas se denominan rizobacterias y muchas de ellas son capaces de mejorar el estado de la planta promoviendo su crecimiento o protegiéndolas frente a determinados fitopatógenos. El estudio de estas rizobacterias es muy importante para poder utilizarlas de forma aplicada como agentes de biocontrol, fitoestimulantes y de biorremediación en sistemas integrados planta-microorganismo. Las *Pseudomonas* son uno de los colonizadores más competentes de la rizosfera de muy diversos tipos de plantas y están siendo utilizadas como bacterias modelo para estudios básicos del proceso de colonización competitiva. Para que estos microorganismos puedan realizar su acción beneficiosa, y por tanto sean aplicables biotecnológicamente, es fundamental que sean capaces de colonizar eficazmente la rizosfera, siendo la movilidad y la quimiotaxis dos de los factores más importantes para que se lleve a cabo este proceso. *Pseudomonas fluorescens* F113 fue aislada de la rizosfera de remolacha (*Beta vulgaris*) en Irlanda y coloniza diferentes tipos de plantas de interés agrícola, como el guisante (*Pisum sativum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), alfalfa (*Medicago sativa*) y fresa (*Fragaria vesca*). Además esta cepa produce un potente antifúngico de amplio espectro, DAPG (2,4-diacetilfloroglucinol), por lo que ha sido utilizada como agente de biocontrol. También, ha sido modificada genéticamente para ser utilizada en la biorremediación de bifenilos policlorados. En este trabajo se presenta la posible intervención del gen *atoS* en la regulación de la movilidad de esta rizobacteria. A partir de una mutagénesis al azar realizada mediante la inserción del transposón mTn5SSgusA40 se llevó a cabo una búsqueda de mutantes más móviles que la estirpe silvestre. Tras seleccionar los fenotipos más móviles se realizó la secuenciación del DNA adyacente al punto de inserción del transposón, para conocer el gen afectado en cada caso. En concreto, el mutante objeto de este trabajo resultó estar afectado en un gen que codifica una histidín quinasa huérfana, con homología limitada con AtoS de *E. coli* y conservado en todas las cepas de *Pseudomonas* de las que se ha secuenciado el genoma. Aunque en F113 no existe un regulador de respuesta asociado, en otras especies como *P. aeruginosa*, hay un gen que codifica un regulador de respuesta en el mismo operón. Este regulador de respuesta contiene un dominio REC y un dominio GGDEF, siendo WspR la proteína más similar en F113. Resultados previos de nuestro grupo han mostrado que en F113, WspR está implicado en la regulación de la movilidad, posiblemente a través de la modulación de la rotación del flagelo. Por estos motivos creemos que *atoS* puede codificar un nuevo regulador de la movilidad en F113. Para estudiar este gen, estamos llevando a cabo experimentos de complementación y la construcción de dobles mutantes afectados además en los genes involucrados en las tres principales rutas de regulación de la movilidad de F113.

Este trabajo ha sido financiado a través de un Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad: BIO2012-31634.

Análisis transcriptómico de respuestas a la colonización de raíces por el agente de biocontrol endofítico *P. fluorescens* PICF7 en tejidos de olivo

C. Gómez-Lama Cabanás*¹, E. Schiliro¹, M. Ferrara², A. Valverde-Corredor¹, F. Nigro² y J. Mercado-Blanco¹

¹ *Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba, España,* ² *Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-forestale ed Ambientale, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari, Italia. Email: jesus.mercado@ias.csic.es, gomezlama@gmail.com.*

Pseudomonas fluorescens PICF7 controla eficazmente la Verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb.) del olivo, una de las enfermedades más importantes que afecta a este cultivo. Además, es capaz de colonizar endofíticamente las raíces de esta leñosa. Con objeto de conocer las respuestas genéticas que tienen lugar tras la colonización de las raíces de olivo por PICF7 tanto a nivel local (raíces) como sistémico (tejidos aéreos), se recogieron a lo largo de un amplio intervalo temporal (21 días) muestras de raíces (R) y de parte aérea (A) de plántones 'Arbequina' cuyas raíces habían sido inoculadas con PICF7. Se construyeron cuatro librerías de cDNA enriquecidas en genes de olivo, inducidos (U) o reprimidos (D), dos a partir de tejidos R y otras dos de tejidos A mediante la metodología 'Suppression Subtractive Hybridization'. Esto permitió identificar 445RU y 376AU 'Expressed Sequence Tags' (ESTs) y 119RD y 266AD ESTs, muchas de ellas relacionadas con respuestas defensivas en plantas a diversos estreses. A efectos de validación, experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) realizados con cDNA a partir de tejidos R confirmaron la inducción de genes implicados en biosíntesis de fenilpropanoides, terpenoides y hormonas. Por tanto, estos genes están involucrados en la inducción de repuestas defensivas como consecuencia de la presencia de PICF7 en raíces. El análisis bioinformático también reveló la inducción de genes que codifican para lipoxigenasa, catalasas, proteínas PR, así como factores de transcripción relacionados con defensa (bHLH, WRKY, GRAS1). Por otro lado, se seleccionaron cinco ESTs identificadas en la genoteca AU para llevar a cabo experimentos qRT-PCR igualmente dirigidos a validar su inducción de forma sistémica y, en este caso, a determinar su patrón de expresión a lo largo del tiempo (1, 3, 7 y 15 días tras la inoculación con PICF7). Así se confirmó la inducción de los genes que codifican para lipoxigenasa 2, catalasa, 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y fenilalanina amonio-liasa para alguno de los tiempos ensayados. Se observó también la inducción de diferentes factores de transcripción (JERF1, WRKY, bHLH) implicados en respuestas de defensa. En las genotecas RD y AD se identificaron genes que codifican para proteínas relacionados con respuesta de defensa, tales como represoras de auxinas, taumatinas, PRs, universales de repuesta a estrés, de unión a salicílico y defensinas, entre otros. Los resultados confirman que la colonización de raíces de olivo por PICF7 provoca cambios transcriptómicos masivos, locales y sistémicos, y sugieren que la planta responde a esta colonización de una forma defensiva, al menos transitoriamente. Sin embargo, estas respuestas son insuficientes para impedir el establecimiento interno de PICF7 o son reguladas/sorteadas por esta cepa mediante mecanismos específicos aún por determinar. Además de que dichas respuestas pueden explicar la capacidad de biocontrol de este endófito, la interacción olivo-PICF7 puede servir para estudiar cómo se modulan o superan las respuestas defensivas de la planta en respuesta a la colonización por una bacteria con capacidad endofítica.

Financiado por los proyectos P07-CVI-02624 y P12-AGR667 de la Junta de Andalucía y AGL2009-07275 del MICINN/MINECO, todos con cofinanciación FEDER de la UE.

Estudio del mecanismo regulatorio de la simbiosis de *Rhizobium tropici* CIAT899 inducido por flavonoides y estrés abiótico.

P. del Cerro^{1*}, F. Pérez-Montaña¹, I. Jiménez-Guerrero¹, M.A. Rodríguez-Carvajal³, A. Gil-Serrano³, F.J. López-Baena¹, M. Megías¹, M. Hungría², F. J. Ollero¹.

1- Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla, España. 2- Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brasil. 3- Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla. Sevilla, España. Email: pdelcerro@us.es

El proceso simbiótico de la nodulación y la consecuente fijación del nitrógeno está regulado por un grupo de genes que forman parte de los dos organismos que intervienen en la simbiosis: la planta leguminosa hospedadora y un grupo de bacterias colectivamente denominado rizobios. En dicho proceso, se desencadena un diálogo molecular entre ambos organismos donde los genes reguladores *nodD* desempeñan un papel crucial dirigiendo la transcripción de los genes de nodulación (genes *nod*). *Rhizobium tropici* CIAT899 es un simbionte efectivo en un gran amplio rango de leguminosas, siendo el rizobio más efectivo en judía (*Phaseolus vulgaris* L.). Entre las leguminosas de consumo humano, la judía es de las más cultivadas, contribuyendo a la nutrición de más de 500 millones de personas. Se ha demostrado que CIAT899 es también un buen colonizador rizosférico y endofítico del maíz (*Zea mays* L.), teniendo además la capacidad de promover el crecimiento de esta planta. La estirpe CIAT899 además es un rizobio altamente tolerante a diversos estreses abióticos entre los que destacan: presencia de metales pesados en el medio, suelos de pH ácido, suelos de altas temperaturas y estrés osmótico. La reciente secuenciación del genoma de esta bacteria, reveló la presencia de hasta 5 genes *nodD* y 3 genes *nodA*, entre otros muchos genes en principio de gran relevancia en la regulación de la simbiosis. Sorprendentemente, se ha comprobado que CIAT899 es capaz de producir factores de nodulación no solo en presencia de flavonoides (apigenina) sino que también lo hace en presencia de estreses abióticos (NaCl o pH ácido), y en menor grado, sin inductores reconocibles. Por ello, no es extraño que CIAT899 presente en su genoma un elevado número de reguladores transcripcionales. Por ello, se decidió mutagenizar diferentes genes interesantes por su posible papel en la simbiosis, entre los que se encuentran los 5 genes *nodD*. Sin embargo, en ninguno de estos mutantes se ha abolido completamente la capacidad para nodular en judía, aunque sí se consiguió con el mutante en el gen *nodD1* para las plantas de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) y siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.). Del mismo modo, se ha estudiado el perfil de factores de nodulación de los diferentes mutantes. Por otra parte, se ha comprobado que los mutantes en los genes *nodD1* y *nodD2* regulan otros fenotipos que pueden estar relacionados con la simbiosis como la movilidad swarming y la producción de ácido indolacético en diferentes condiciones. Por último, se ha realizado un estudio de transcriptómica comparada de CIAT899 en condiciones de inducción de la síntesis de factores de nodulación que ayudará a entender mejor la regulación de la simbiosis de esta bacteria.

Señales y genes bacterianos implicados en movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*: Papel en el establecimiento de simbiosis.

L. Bernabéu-Roda*, N. Calatrava-Morales y M.J. Soto.

Estación Experimental del Zaidín CSIC 18008 Granada, España.

E-mail: mariajose.soto@eez.csic.es

Sinorhizobium meliloti es conocido por su capacidad de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas de alfalfa. Aunque se acepta que la movilidad de los rizobios no es esencial en los procesos de nodulación y de fijación de nitrógeno, el control de la movilidad bacteriana puede desempeñar un papel importante en las primeras etapas de la interacción simbiótica como son la adsorción y colonización, etapas que tienen lugar en la mayoría de las interacciones planta-bacteria. Nuestras investigaciones están enfocadas en caracterizar la translocación en superficie de la bacteria modelo *S. meliloti*: identificar tipos distintos de movilidad y componentes bacterianos implicados, genes y señales reguladoras que controlan su aparición, así como el papel que desempeñan en la colonización de la planta y establecimiento de simbiosis.

La caracterización de un mutante *fadD* de *S. meliloti* que muestra hipermovilidad en superficie ha permitido identificar el compuesto 2-tridecanona (2-TDC) capaz de alterar el comportamiento en superficie de distintas bacterias y de interferir negativamente con el establecimiento de la simbiosis. El mecanismo de acción de 2-TDC es centro de nuestras investigaciones.

Por otro lado, hemos podido comprobar que cepas de referencia de *S. meliloti* como GR4 y Rm1021 se desplazan en superficie utilizando mecanismos completamente distintos. Rm1021 utiliza mayoritariamente un movimiento independiente de acción flagelar en el que la producción de un sideróforo con actividad surfactante es crucial. Por el contrario, GR4 se desplaza en superficie utilizando exclusivamente movilidad *swarming*, un tipo de movimiento absolutamente dependiente de acción flagelar muy ligado a la capacidad virulenta de gran cantidad de bacterias patógenas. La caracterización de distintos mutantes aflagelados (*flaAB*, *flgK*) nos ha permitido poner de manifiesto un tipo de translocación en superficie cuya aparición parece estar regulada de manera co-ordinada con el estado de ensamblaje del flagelo. La disponibilidad de estos mutantes nos facilita el estudio de la importancia de los distintos tipos de movilidad de *S. meliloti* en el establecimiento de la simbiosis.

Por otro lado, la caracterización de mutantes alterados en translocación en superficie nos ha permitido identificar un gen que codifica una proteína transmembrana de gran tamaño y función hasta ahora desconocida. Hemos comprobado que este gen además de influir en la capacidad competitiva de la bacteria, influye en los niveles de expresión de genes de nodulación, mediante un mecanismo aún desconocido.

Financiado por MINECO (BIO2010-18005 y BIO2013-42801-P) y Junta de Andalucía (Proyecto de excelencia P08-CVI-03541 y tercera fase de financiación para la formación de personal investigador Bernabéu-Roda, L.)

El regulador *mucR1* de *Sinorhizobium fredii* HH103 juega un papel importante en producción de EPS, formación de biopelículas y simbiosis con soja

S. Acosta-Jurado*¹, P.S. Murdoch², M.A. Rodríguez-Carvajal³, J.E. Ruiz-Sainz¹, S. Zehner⁴, M. Göttfert⁴, J.M. Vinardell¹

¹ Departamento de Microbiología y ² Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. ³ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla. ⁴ Institut für Genetik, Technische Universität Dresden. E-mail: sacosta@us.es

El regulador transcripcional *mucR1* es clave en la biosíntesis del exopolisacárido (EPS) en los rizobios. Este regulador codifica una proteína de unas 15.7 kDa que se caracteriza por poseer un dominio de dedos de Zinc, lo que le confiere capacidad de unión al ADN. Este regulador está presente en diversas especies como *Sinorhizobium meliloti* (*mucR*), *Rizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* (*rosR*), *Agrobacterium tumefaciens* (*rosR*) y *A. radiobacter* (*rosRA*). En el caso de *S. meliloti*, MucR regula positivamente la producción de EPSI (succinoglucano) y negativamente la de EPSII (galactoglucano). En *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, la mutación de *rosR* provoca efectos pleiotrópicos dando lugar a una disminución de la producción de EPS, y por tanto de la formación de *biofilm*, además de afectar negativamente a la simbiosis con trébol, tanto en el número de nódulos formado como en capacidad competitiva. La capacidad de resistencia a detergentes, antibióticos y estrés osmótico también se ve afectada, y se producen cambios en el perfil de proteínas membranales y extracelulares. *Sinorhizobium fredii* HH103 posee dos copias del gen *mucR*: *mucR1* y *mucR2*, localizados en el cromosoma y en el plásmido simbiótico respectivamente. Nuestro grupo ha obtenido mutantes independientes en cada uno de los genes, así como un doble mutante. El mutante en el gen *mucR1* (denominado SVQ706), muestra deficiencias en la producción de EPS cuando se analiza el aspecto sobre placas de YMA, así como mediante análisis de RMN del sobrenadante de cultivos de dicho mutante. La capacidad de formación de *biofilm* de este mutante no sólo se ve afectada, sino que tiene lugar un aumento de la floculación de modo que se produce un *biofilm* que acumula altos niveles de cristal violeta. En SVQ706 la expresión de *nodA* en presencia del flavonoide inductor genisteína se reduce, en comparación con la cepa silvestre (SVQ269). En *S. fredii* HH103 MucR1 regula negativamente su propia expresión, de modo que los valores de expresión, analizados mediante la fusión del promotor del mismo gen con la proteína GFP, muestran valores superiores de fluorescencia en el fondo del mutante SVQ706 que en SVQ269. Mediante ensayos de retardo en gel hemos comprobado que dicha autorregulación negativa se lleva a cabo mediante la unión directa de la proteína a la región promotora del gen *mucR1*. A diferencia de SVQ706, el mutante en *mucR2* (SVQ719) no muestra diferencias con la estirpe silvestre en la producción de EPS y en la formación de biopelículas. El doble mutante *mucR1mucR2* se comporta de modo similar a SVQ706. En cuanto a simbiosis, tanto el mutante *mucR1*, como el doble mutante *mucR1mucR2*, presentan grandes deficiencias en la simbiosis con soja cv. Williams, mientras que el mutante *mucR2* presenta una ligera deficiencia en cuanto a peso seco de la parte aérea y número de nódulos.

PATOGÉNESIS

Resistencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 frente a compuestos antimicrobianos de tomate mediada por bombas de extrusión multidroga

M. Senovilla^{‡ 1,2}, A. González-Mula^{‡ 1,2}, I. Río-Álvarez^{1,2}, S. Bertrand^{1,2}, P. M. Martínez-García^{1,2,3}, M. J. Navas Vásquez^{1,2}, P. Rodríguez-Palenzuela^{1,2}, E. López-Solanilla^{1,2}, and J. J. Rodríguez-Herva^{1,2 *}

¹ Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid (UPM)-INIA. Parque Científico y Tec. de la UPM. Pozuelo de Alarcón, 28223-Madrid. ² Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. UPM. Avda. Complutense s/n, 28040-Madrid. ³ Instituto de Hortifruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC). Área de Genética, Facultad de Ciencias, Málaga.

e-mail: jj.rodriguez@upm.es

Pseudomonas syringae pv. tomato (Pto) DC3000 es una bacteria fitopatógena agente causal de la mancha bacteriana del tomate. Tras la entrada de la bacteria en la planta, durante las primeras fases del proceso infeccioso, ésta se establece en el apoplasto vegetal, donde se multiplica hasta alcanzar una densidad de población lo suficientemente elevada para poder invadir con éxito los tejidos vegetales adyacentes. El apoplasto, sin embargo, se presenta como un ambiente hostil para la bacteria, ya que es un compartimento repleto de compuestos tóxicos para la misma, tanto preformados como inducibles. Entre los distintos mecanismos de resistencia que las bacterias han desarrollado para contrarrestar la acción de estas moléculas de defensa de la planta destacan las bombas de extrusión de múltiples tóxicos (o transportadores MDR, *MultiDrug Resistance*), que confieren a las bacterias protección frente a un amplio espectro de sustancias antimicrobianas. Con objeto de estudiar la posible contribución de estos sistemas a los mecanismos de virulencia de esta bacteria, se realizaron análisis genómicos comparativos entre proteínas pertenecientes a diferentes familias de bombas MDR de Pto DC3000 y de diversas bacterias. Posteriormente, se aislaron y caracterizaron mutantes en tres genes pertenecientes cada uno a una familia distinta de transportadores: *PSPTO_0820*, *PSPTO_2428* y *PSPTO_4947*. Los mutantes en dichos genes fueron más susceptibles a la acción antimicrobiana de los ácidos *trans*-cinámico y clorogénico. Además, los mutantes en *PSPTO_0820* y *PSPTO_4947* mostraron mayor sensibilidad que la cepa silvestre al flavonoide (+)-catequina. También se analizó la expresión de dichos genes en presencia de los compuestos anteriores, y su contribución a la virulencia en ensayos de infección de plantas de tomate. Aunque la expresión génica no varió en respuesta a los compuestos analizados, los mutantes en *PSPTO_0820* y *PSPTO_4947* se establecieron en planta a densidades celulares más bajas que las de la cepa silvestre, mostrando además el mutante en *PSPTO_4947* una menor virulencia en dichos ensayos. Estos resultados apoyan el papel de estas bombas en la extrusión de los compuestos mencionados y confirman la importancia del ácido clorogénico en la respuesta de defensa de la planta de tomate frente a infecciones de Pto DC3000.

Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, causante de la mancha bacteriana de los frutales de hueso

G. Morales*, I. Llorente, E. Montesinos y C. Moragrega

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA, Universitat de Girona, C/Maria Aurèlia Capmany 61, 17071, Girona. E-mail: gerard.morales@udg.edu

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*) es el agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro, y es considerado como organismo de cuarentena por la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). La enfermedad es de especial importancia en España, dado que es uno de los principales países productores a nivel mundial de frutales de hueso y almendro, y por su rápida distribución. Por el momento no se conoce un método de control de la enfermedad eficaz, y éstos se reducen a tratamientos preventivos con derivados cúpricos, a medidas de cuarentena y a un rápido sistema de detección y erradicación de los focos de la enfermedad.

El objetivo de este estudio ha sido contribuir al conocimiento de la biología de *Xap* modelizando su crecimiento *in vitro* en función de la temperatura. Se utilizaron siete cepas de *Xap* procedentes de distintos huéspedes y zonas geográficas. El crecimiento bacteriano fue monitorizado con un lector de densidad óptica (OD) automatizado, Bioscreen C, en el rango de temperaturas de 5 a 35°C. Las curvas de crecimiento se ajustaron al modelo de Gompertz modificado mediante regresión no-lineal para estimar los parámetros de crecimiento ($\text{Log}_{10} N_0$, tasa de crecimiento (μ_{max}), duración de la fase de latencia (lag) y $\text{Log}_{10} N_{\text{max}}$) para cada una de las temperaturas evaluadas de cada cepa. Posteriormente, se elaboraron los modelos secundarios, que relacionan los valores de μ_{max} y lag en función de la temperatura. Para ello, se utilizaron una variación del modelo de Ratkosky para la tasa de crecimiento y el modelo polinomial para la fase de latencia.

Se observó crecimiento de *Xap* en todas las temperaturas ensayadas, de 5 a 35°C, con una tasa de crecimiento máximo a los 31°C. Los tiempos de duplicación que se obtuvieron para las distintas cepas fueron similares y comparables a los descritos por otros autores. Los modelos secundarios obtenidos permiten predecir los valores de la μ_{max} y la fase de latencia de *Xap* en cualquier temperatura dentro del rango 5-35°C. Estos resultados son esenciales para el desarrollo futuro de un modelo de predicción de la infección de *Xap* en los distintos huéspedes, que combine la temperatura y otros parámetros ambientales como la humedad relativa y la humectación foliar. Este modelo de predicción permitirá el asesoramiento del riesgo de infección y de la aparición de síntomas en programas de control y vigilancia de la mancha bacteriana de los frutales de hueso.

Financiado por los proyectos SING 12/13 y BR 2013/31 de la Universitat de Girona, AGL2013-41405-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), y FPU13/04123 del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD).

Transformación de *Podosphaera xanthii* mediante *Agrobacterium tumefaciens* y su aplicación para el estudio de efectores.

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

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

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren células vivas para completar su ciclo de vida. Esto se debe a que estos hongos patógenos desarrollan una estructura especializada en el interior de las células de la planta, denominada haustorio, estableciendo una íntima relación con su hospedador. El haustorio es el responsable de la toma de nutrientes y el intercambio de factores con la planta. Estos factores son los denominados efectores, pequeñas proteínas secretadas por el patógeno responsables de la inhibición o modificación de la defensa innata de la planta. El análisis de estos efectores ha recibido un gran interés en los últimos años, haciéndose necesaria la puesta a punto de técnicas para la manipulación genética de estos patógenos.

Hasta la fecha, se han desarrollado varios métodos para la transformación de hongos biotrofos, sin embargo, debido su estilo de vida, estas estrategias de transformación o no son adecuadas o no han dado resultados satisfactorios. Una alternativa ha sido el uso de la planta como vector para la expresión de construcciones que permitan el silenciamiento o la sobreexpresión de los efectores, sin embargo, la localización y el mecanismo de secreción de los mismos sigue siendo desconocido. El objetivo de este trabajo fue poner a punto un método para el estudio funcional de los posibles efectores de *Podosphaera xanthii*, el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas. Para ello desarrollamos un método de transformación basado en el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. Mediante este método, hemos obtenido transformantes estables para una variedad de construcciones: i) plásmidos expresando el gen *egfp* bajo el control de promotores constitutivos o inducibles de *Aspergillus nidulans*, ii) plásmidos expresando el casete de resistencia a higromicina B o un alelo de β -tubulina de *P. xanthii* que confiere resistencia a fungicidas MBC. Tras la transformación, las colonias de los transformantes fueron analizadas mediante microscopía confocal. También se confirmó que las colonias transformadas no presentaban cambios fenotípicos con respecto a las colonias no transformadas del parental, y se confirmó la estabilidad de la modificación genotípica tras sucesivas generaciones. Además, los análisis moleculares mostraron la presencia del T-DNA en las colonias transformadas de *P. xanthii*.

Finalmente, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal con fusiones traduccionales de efectores candidatos de *P. xanthii* fusionados a GFP. Entre los efectores ensayados, incluimos un efector localizado en la papila y en pequeñas vesículas del haustorio, así como un efector que se localiza en la membrana del hongo. Los resultados obtenidos demuestran la fiabilidad de este método para la transformación de *P. xanthii* y abre una nueva vía para el estudio de efectores candidatos directamente en el patógeno sin mediación indirecta de la planta.

Este trabajo ha sido financiado con una ayuda del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-41939-R), cofinanciado con fondos FEDER (UE).

Análisis genómico y funcional de los efectores de las familias HopAF y HopAO del sistema de secreción tipo III de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335

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

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

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo, 28223-Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Psv) es el agente causal de la tuberculosis del olivo. El análisis bioinformático del borrador del genoma de Psv NCPPB 3335 permitió identificar 33 posibles efectores (T3E) del sistema de secreción tipo III (T3SS). Además, la secuenciación de los tres plásmidos de esta cepa reveló que los genes codificantes de los T3E HopAF1 y HopAO1 se localizan en los plásmidos pPsv48A y pPsv48B, respectivamente, codificándose en el cromosoma de esta cepa un homólogo de HopAF1 (HopAF1-2). Análisis posteriores revelaron que Psv NCPPB 3335 también codifica en el cromosoma un T3E (HopAO2) que contiene un dominio enzimático tirosina fosfatasa (PTP), similar al que posee HopAO1. El análisis filogenético de las familias HopAF y HopAO permitió identificar que ambas se encuentran ampliamente distribuidas dentro del complejo *P. syringae*. Análisis de translocación y transcripcionales validaron a los T3E HopAF1, HopAF1-2, HopAO1 y HopAO2 como nuevos T3E del secretoma del T3SS de Psv NCPPB 3335. La expresión heteróloga de estos 4 T3E tiene como consecuencia la interferencia con la respuesta de defensa primaria (PTI) de *Nicotiana tabacum*, lo que implica una reducción de la deposición de calosa y de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, los T3E HopAF1-2, HopAO1 y HopAO2 también inhiben la inmunidad mediada por efectores (ETI) en este mismo hospedador. Por otro lado, y utilizando fusiones traduccionales a la proteína verde fluorescente (GFP), se localizaron los T3E HopAF1, HopAF1-2, HopAO1 y HopAO2 próximos a la membrana plasmática de las células de *Nicotiana benthamiana*. Además, HopAO2 también se localizó en vesículas del aparato de Golgi. La delección del gen *hopAF1* del plásmido pPsv48A en Psv NCPPB 3335 tuvo como consecuencia una ligera reducción en el tamaño de los tumores inducidos por este patógeno en plantas de olivo lignificadas, mientras que la delección del gen *hopAO1* conllevó una clara disminución de la virulencia del mismo.

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

Los sistemas toxina-antitoxina de plásmidos de *Pseudomonas syringae* contribuyen al mantenimiento, número de copia e integridad estructural

M. Añorga^{1*}, L. Bardaji¹, C. Ramos² y J. Murillo¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

²Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). E-mail: crr@uma.es

La bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (Psv48), agente causal de la tuberculosis del olivo, es un organismo modelo para el estudio de las bases moleculares de la producción de enfermedad en plantas leñosas. La secuenciación de su genoma y de sus tres plásmidos nativos (pPsv48A, pPsv48B y pPsv48C) permitió anteriormente identificar factores de virulencia cromosómicos y plasmídicos de Psv48. En este trabajo hemos abordado la identificación y caracterización de los sistemas de mantenimiento de los plásmidos de esta cepa. Mediante una búsqueda bioinformática en las secuencias plasmídicas de Psv48 hemos identificado 15 posibles determinantes de mantenimiento. Mientras once de ellos aumentan significativamente la estabilidad de un plásmido artificial en un ensayo funcional, sólo seis sistemas toxina-antitoxina (tres de pPsv48A y tres de pPsv48C) confieren alta estabilidad, por lo que nos hemos centrado en su análisis y su utilización como herramientas de curación. La complementación en *trans* con las tres antitoxinas de pPsv48A incrementa su pérdida sólo en un factor de 10, indicando que hay otros determinantes funcionales de relevancia. Por su parte, la complementación con las tres antitoxinas de pPsv48C ha revelado distintos papeles de estos determinantes. Los genes PPSV_C0050/0051 actúan limitando la ocurrencia de una delección de 8.3 kb, mediada por MITE P_{sy2} , que da lugar a un aumento del número de copias de pPsv48C. Dado que pPsv48C porta un gen potencialmente implicado en la biosíntesis de citoquininas, especulamos que el mantenimiento de un bajo número de copias permite modular la virulencia del patógeno. Igualmente, la complementación con las tres antitoxinas nos ha permitido identificar múltiples versiones delecionadas de pPsv48C mediante eventos de movilización por transposición uniterminal de IS801, que implican un determinante de replicación aún no identificado. Este fenómeno podría ser universal en plásmidos nativos de *P. syringae*, ya que hemos demostrado que también ocurre con el plásmido pPsv48A. Nuestros resultados demuestran que la ocurrencia de múltiples sistemas toxina-antitoxina en plásmidos permite modular el número de copia, y posiblemente la virulencia del hospedador, así como mantener la integridad estructural. La utilización de estos sistemas nos ha permitido, además, obtener variantes de Psv48 curadas de plásmidos, que permitirán evaluar individualmente el papel de cada uno de sus tres plásmidos.

Implicación del silenciamiento génico en la regulación de genes R durante la interacción con *Pseudomonas syringae*.

D. López-Márquez*, E. A. Rodríguez-Negrete, A. Zumaquero, E. R. Bejarano, C. R. Beuzón

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, 29071, Málaga. E-mail: cbl@uma.es; dlm@uma.es

En la naturaleza, las plantas están sometidas a diferentes tipos de variaciones medioambientales que pueden suponer un estrés durante su ciclo vital. Estos tipos de estrés pueden clasificarse según su origen en bióticos (patógenos) y abióticos (variaciones físico-químicas).

Uno de los principales tipos de estrés bióticos, son los causados por patógenos bacterianos, los cuales conforman uno de los mayores grupos de microorganismos causantes de enfermedad en plantas. Algunos de estos patógenos bacterianos poseen un complejo sistema de secreción (T3SS) que les permite introducir proteínas efectoras directamente al interior de las células del huésped, y suprimir así las respuestas de defensas desencadenadas tras el reconocimiento del patógeno. Como contra partida, las plantas presentan diferentes genes que codifican proteínas de resistencia (genes o proteínas R) involucrados en la detección de estas proteínas efectoras. La mayoría de los genes R codifican proteínas del tipo NBS-LRR. El reconocimiento por una proteína R del efector o de su función en el interior celular, desencadena una respuesta de defensa que protege a la planta contra la infección, conocida como ETI (effector triggered immunity).

En las plantas existen dos clases principales de pequeños RNAs no codificantes: los microRNAs (miRNA) y los pequeños RNAs interferentes (siRNA), que difieren en su biogénesis y modo de acción, pero son similares en tamaño (20-24 nt). En *Arabidopsis thaliana*, los precursores de ambos son procesados por alguna de las cuatro enzimas Dicer-Like RNase III (*dcl*) y actúan como reguladores negativos de la expresión génica. Estos pequeños RNAs controlan una multitud de procesos biológicos, tales como el desarrollo, la integridad genómica, o las respuestas a estrés. Dicha regulación es específica de secuencia y puede darse tanto a nivel transcripcional (TGS) como post-transcripcional (PTGS). En los últimos años, se ha demostrado la participación del silenciamiento génico (miRNAs y siRNAs) en el control de genes implicados en las respuestas de defensas de la planta disparadas frente a patógenos bacterianos.

Diferentes análisis de expresión en mutantes de silenciamiento, y plantas infectadas por *Pseudomonas syringae*, nos ha llevado a identificar un conjunto de genes R de funciones desconocidas, englobados dentro de la familia de genes TIR-NBS-LRR que se encuentran diferencialmente expresados en ambas condiciones.

Un estudio mas exhaustivo a nivel de secuencia de ADN ha revelado una región conservada en todos ellos de aproximadamente 21 nucleótidos.

Mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas se observó que dicha secuencia conservada es complementaria a un miRNA* sin función descrita pero de acumulación constatada, lo cual sugiere una posible regulación post-transcripcional (PTGS) de estos genes de defensas por un miRNA*.

Finalmente en este estudio hemos podido identificar a uno de estos genes como un regulador negativo de la respuesta de defensa frente a *Pseudomonas syringae*.

DIVERSIDAD

Supresividad y análisis de la comunidad microbiana de un suelo agrícola enmendado con cáscara de almendra

C. Vida*, A. de Vicente y F. Cazorla.

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea " La Mayora ", Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM - UMA- CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.
Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España. E-mail: cvida@uma.es.*

La podredumbre blanca radicular, causada por el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix*, es uno de sus problemas más graves del cultivo del aguacate en el área Mediterránea. Una de las estrategias de manejo de este cultivo incluye la aplicación de enmiendas orgánicas como estrategia para mejorar el estado fitosanitario de estos suelos agrícolas. En este trabajo, se evalúa la capacidad supresiva de suelos enmendados con cáscara de almendra compostada, y la implicación de la microbiota que se desarrolla en este suelo en dicha supresividad. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de supresividad "in vitro", usando dos plantas diferentes, *Persea americana* (aguacate) y *Triticum aestivum* (trigo), ambas susceptibles a *R. necatrix*. Los resultados muestran que la adición de cáscara de almendra compostada al suelo estimula un efecto supresivo contra *R. necatrix*. Dicha supresividad está asociada a la microbiota presente en el suelo enmendado, ya que la capacidad supresiva se reduce al someter al suelo enmendado a un tratamiento térmico, y se produce su recuperación al complementar el suelo tratado con una porción de suelo natural de campo enmendado. Además, el uso de técnicas moleculares nos ha permitido conocer la composición y funcionalidad de la microbiota de los suelos supresivos. La secuenciación del ADN ribosómico del 16S (bacterias) y de las regiones ITS (hongos), reveló el predominio en la comunidad microbiana de representantes de los phyla *Proteobacteria* y *Acidobacteria* (que suponen más del 50% de las cepas bacterianas identificadas) y del phylum *Ascomycota* (40% de representantes fúngicos). Por otro lado, el uso de microarrays comerciales (GeoChip), nos ha permitido conocer el potencial génico de este suelo. Nuestros resultados revelan que en los suelos enmendados con cascara de almendra compostada, se aprecia un aumento significativo de la abundancia relativa de genes implicados en la degradación de distintas fuentes de carbono, así como una reducción de los genes relacionados con la virulencia, resistencia a metales y a otros componentes orgánicos tales como pesticidas, herbicidas o compuestos aromáticos. Estos resultados nos están permitiendo seleccionar y aislar grupos de microorganismos cultivables específicos y profundizar en los posibles mecanismos implicados en la supresividad.

Este trabajo está siendo financiado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía (MINECO, España) (AGL2011-30354-C02-01) y cofinanciado por los fondos FEDER (EU). C. Vida está siendo financiada con una ayuda del programa FPI del MINECO.

Estudio genómico de la variación de fase en *Pseudomonas fluorescens* F113 durante la colonización de la rizosfera.

P. Vesga*, M. Redondo-Nieto, M. Martín, R. Rivilla.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

E-mail: mariapilar.vesga@estudiante.uam.es

La variación de fase es un proceso regulatorio mediante el cual las bacterias sufren cambios fenotípicos reversibles como resultado de alteraciones genéticas en *loci* específicos de su genoma. Este fenómeno permite la diversificación de las poblaciones bacterianas en diferentes subpoblaciones especializadas de forma que le confiere una ventaja en la colonización de diferentes nichos como la rizosfera. Este proceso de adaptación se produce gracias a diversos mecanismos de respuesta a estrés como el sistema SOS, recombinasas específicas de sitio, transposasas, mecanismos de *Mismatch Repair*, etc., que son muy importantes en la evolución de los genomas. Para estudiar este fenómeno, se secuenció, mediante la plataforma *Illumina* (p.e 2x150), el ADN genómico de 19 colonias de *Pseudomonas fluorescens* F113 aisladas del ápice de raíces de alfalfa (*Medicago sativa*). A partir de las secuencias obtenidas, y comparando con el genoma de referencia almacenado en las bases de datos, se han detectado un total de 27 mutaciones significativas. El pequeño número de variaciones detectadas parece indicar que existe una gran presión selectiva durante el proceso de colonización de la rizosfera permitiendo la observación de los cambios más beneficiosos en el ambiente rizosférico. Además, sólo tres linajes, claramente diferenciados de la estirpe original, dominaron la población aislada de la rizosfera. De las mutaciones identificadas, 15 eran intergénicas y 12 intragénicas siendo 15 de ellas inserciones o deleciones (INDELs) y 12 cambios en un solo nucleótido (SNPs). Las variaciones intergénicas afectan a regiones no codificantes de genes relacionados con la regulación, reparación de ADN, transducción de señal, transporte, transposasas, etc. Esta abundancia de variaciones intergénicas puede estar indicando alteraciones a nivel de regulación transcripcional y/o traduccional provocados por la variación de fase. Por otra parte, una de las variaciones intragénicas afecta al gen codificante *gacA* que ha sido descrito como un blanco de la variación de fase en diferentes cepas de pseudomonas. Además, es un gen que está implicado en la regulación del movimiento, carácter de importancia en el proceso de colonización competitiva de la rizosfera. Asimismo, se pudo observar como diversas deleciones provocaban la recuperación del marco de lectura de dos transposasas de la familia *mutator* que se encontraban originalmente truncadas en la cepa silvestre. También hemos hallado inserciones y deleciones que dan lugar a cambios en el marco de lectura de transposasas IS911 de la familia IS3. Los resultados obtenidos sugieren que, en las primeras etapas de la colonización del ápice radicular, la variación de fase afecta a genes relacionados con la reordenación de los genomas.

Este trabajo ha sido financiado por la ayuda del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía y Competitividad BIO2012-31634.

Caracterización de sistemas de secreción tipo III y tipo VI en *Bradyrhizobium*

A. Pacheco*, D. Durán, T. Ruiz-Argüeso, J. Imperial, JM. Palacios, L. Rey

Departamento de Biotecnología (ETS de Ingenieros Agrónomos) y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid. Email: luis.rey@upm.es

El análisis de los genomas de cepas de *Bradyrhizobium* sp. aisladas de *Lupinus mariae-josephae*, *Lupinus angustifolius*, *Retama sphaerocarpa*, *Phaseolus lunatus*, *Lablab purpureus* y *Pachyrhizus erosus* ha permitido identificar la presencia de sistemas de secreción de tipo III (T3SS) y de tipo VI (T6SS). En todos los casos, los genes que codifican T3SSs están agrupados, presentando un alto grado de conservación los que codifican para componentes estructurales del sistema. La cepa *Bradyrhizobium* sp. LmjC, aislada de *L. mariae-josephae*, es un simbiote eficiente con esta planta mientras que induce pocos nódulos, ineficaces y blancos con *Lupinus angustifolius*. Esta cepa contiene un T3SS codificado en una agrupación de 30 genes. Un mutante deficiente en el regulador transcripcional TtsI, esencial para la activación del T3SS en *B. japonicum* USDA110, induce la formación de nódulos blancos, no fijadores con *L. mariae-josephae*, mientras que la inoculación de *L. angustifolius* con el mismo mutante produce nódulos abundantes rojos y efectivos. Estos resultados sugieren un papel clave del T3SS de LmjC en la definición del rango de huéspedes de esta bacteria.

Por otra parte, hemos centrado el análisis de T6SS en la cepa ISLU101, aislada de *L. angustifolius*. ISLU101 contiene dos agrupaciones de genes implicados en la formación de T6SS. Una de ellas, T6SS-1, contiene 17 genes con alto grado de conservación respecto a genes de *B. japonicum* USDA110. La otra, T6SS-2, contiene 16 genes flanqueados por secuencias de transposición. Esta segunda agrupación génica presenta una mayor similitud con el T6SS de la bacteria *Labrenzia alexandrii* DFL11, una α -proteobacteria aislada del protozoo dinoflagelado *Alexandrium lusitanicum*. Una característica distintiva de los T6SS activos es que las proteínas Hcp y VgrG que forman parte del aparato de secreción pueden secretarse al medio extracelular. La disponibilidad de anticuerpos contra Hcp es una buena herramienta para estudiar la expresión de los T6SS. En estos momentos estamos intentando sobreexpresar Hcp-1 de la cepa ISLU101 para obtener anticuerpos; por otra parte se van a obtener mutantes en genes estructurales de los T6SS para estudiar su importancia en la simbiosis con *L. angustifolius* u otros posibles hospedadores.

Caracterización del elemento genético móvil GInt

M. Echeverría^{1*}, L. Bardaji¹, P. Martínez², P. Rodríguez-Palenzuela², J. Murillo¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra; ²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, ETS Ingenieros Agrónomos.

Universidad Politécnica de Madrid

E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

Los análisis genómicos comparativos de la isla genómica de biosíntesis de faseolotoxina (Pht-PAI) de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* nos han permitido la identificación de una nueva familia de elementos genéticos móviles, designada GInt (Isla Genómica asociada a Integrasas). Los GInts tienen una estructura tripartita que consiste en: 1) un extremo 5' altamente conservado que contiene cuatro CDSs que constituyen el operón *ginABCD*; tres de ellas, *ginA*, *ginB* y *ginC*, codifican para proteínas que contienen dominios funcionales de integrasas, 2) una región de ADN altamente variable, en la que se han podido identificar genes de resistencia a cobre y mercurio, factores de virulencia y abundantes secuencias de inserción y sistemas de restricción y modificación y 3) un extremo 3' que está pobremente conservado. La filogenia de los genes *gin* sugiere que los GInts son elementos muy dinámicos que se movilizan e intercambian preferiblemente entre bacterias filogenéticamente próximas. Los GInts se escinden formando moléculas circulares extracromosómicas (o episomas) y se integran en un sitio específico, *attB*, altamente conservado en *Pseudomonas* generando dos repeticiones directas imperfectas. Como parte de la caracterización funcional de los GInts se evaluó la implicación de los genes del operón *ginABCD* en la formación de episomas y en la integración del elemento en diversas *Pseudomonas*. Para el análisis de la integración se diseñó una GInt mínima circular artificial, pGInt0. Ésta está constituida por un operón *gin* y el extremo 3' de *P. stutzeri* DSM4166 clonados, en la orientación esperada en un episoma, en un vector suicida para *Pseudomonas*. Ensayos de mutagénesis dirigida y posterior complementación demostraron que *ginA*, *ginB*, *ginC* y *ginD* son esenciales en la movilidad de los GInts y que la pGInt0 contiene toda la maquinaria necesaria y suficiente para que el elemento se integre en otros genomas y se escinda formando estos intermediarios circulares. La inserción específica del GInt en el sitio *attB*, localizado en el extremo 5' de un posible transportador tipo ABC, da lugar a la separación física de éste respecto de su promotor y por lo tanto a la interrupción de la secuencia codificante de este gen. No obstante, los resultados de RT-PCR en la cepa *P. stutzeri* DSM4166, que contiene un GInt, muestran que este transportador se está expresando activamente sugiriendo que los GInt puedan tener una región promotora interna en su extremo 5' capaz de activar la expresión de este gen y la de los genes próximos al sitio de inserción *attB*.

La filogenia del complejo *Pseudomonas fluorescens* revela nueve grupos ecofisiológicos con caracteres específicos relacionados con su capacidad PGPR y de biorremediación.

D. Garrido-Sanz*, M. Martín, R. Rivilla, M. Redondo-Nieto.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid

E-mail: miguel.redondo@uam.es

El complejo *Pseudomonas fluorescens* incluye diferentes especies del género *Pseudomonas* descritas como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) gracias a la capacidad de supresión de patógenos mediante la colonización competitiva de los tejidos de la planta, la producción de antibióticos, la inducción de respuestas sistémicas en la planta y la producción de fitohormonas o metabolitos que influyen en el desarrollo de la planta. Todas estas características hacen particularmente interesantes a las cepas de este complejo para ser utilizadas en aplicaciones de biocontrol y biofertilización. Hasta la fecha, la filogenia de este complejo se ha inferido atendiendo a la subunidad ribosomal pequeña (16S), análisis multilocus (MLSA) y caracteres fenotípicos que han dado lugar a su división en varios subgrupos. No obstante, debido a la alta heterogeneidad genética y fenotípica que muestran las cepas de este complejo, así como frecuentes cambios en su taxonomía, han dado lugar a una pobre definición del mismo. En los últimos años, el genoma de una gran cantidad de cepas ha sido secuenciado, proporcionando la información necesaria para realizar estudios filogenómicos. En el presente estudio, se han utilizado 72 cepas pertenecientes a este complejo para inferir la filogenia en base a análisis multilocus y filogenómicos. Los resultados han permitido identificar 9 subgrupos dentro del complejo *P. fluorescens* constituidos por diferentes especies. Los índices ANI y TETRA apoyan esta división, con un corte de ANI del 88%, aunque son pocas las cepas de este complejo que alcanzan el 95-96% de ANI establecido como punto de corte para delimitar especies, sugiriendo la presencia de grupos heterogéneos de especies con caracteres comunes. La comparación de las secuencias codificantes de estos genomas ha permitido establecer diferentes fracciones del genoma (genoma central del complejo, genoma central de cada grupo, genoma específico de cada cepa y genoma específico de cada linaje). El genoma específico de linaje, ha servido para la identificación *in silico* de una serie de caracteres ecofisiológicos implicados en biocontrol y biorremediación, revelando posibles aplicaciones de las cepas adscritas a estos grupos.

Este trabajo ha sido financiado por la ayuda del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía y Competitividad BIO2012-31634.

Evolución de la biosíntesis de faseolotoxina en *P. syringae*

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

Laboratorio de Protección de Cultivos, Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. E mail: jesus.murillo@unavarra.es

La biosíntesis de la toxina antimetabolito faseolotoxina, producida por cepas toxigénicas de *P. syringae*, está orquestada por una agrupación de genes denominada Pht cluster que en la cepa modelo *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A forma parte de una isla genómica de 38 kb (Pht-PAI). Esta isla está estructurada por un operón de cuatro genes (*ginABCD*), de los cuales tres codifican para recombinasas de tirosina, y se inserta específicamente en una región (*attB*) muy conservada en *Pseudomonas*. La hipótesis más aceptada hasta la fecha afirma que la Pht-PAI se originó inicialmente en una bacteria filogenéticamente alejada de *P. syringae*, muy probablemente gram positiva, y que *P. syringae* la habría recibido por transferencia horizontal una vez se hubo diferenciado en las genomoespecies actuales. Experimentos de hibridación, PCR y secuenciación, muestran que la Pht-PAI está altamente conservada en estructura, contenido génico y secuencia en cepas de los patovares phaseolicola y actinidiae. Este hecho apoya la movilización reciente de la Pht-PAI, ya que los patovares actinidiae y phaseolicola pertenecen a genomoespecies diferentes. Sin embargo, la cepa *P. syringae* pv. *syringae* CFBP3388, perteneciente a una genomoespecie distinta a las anteriores, también produce faseolotoxina. Nuestros experimentos demuestran que, al igual que ocurre con las demás cepas toxigénicas, la biosíntesis de faseolotoxina depende de la actividad de los genes *phtL* y *gacA*, pero en esta cepa no está regulada por temperatura. El grado de identidad de nucleótidos del Pht cluster de CFBP3388 al compararlo con Pph 1448A, es del 82,7%, muy inferior al que muestran estas regiones en phaseolicola y actinidiae. Además el Pht cluster de CFBP3388 se inserta fuera del *attB*, no está asociado al operón *gin* y no pertenece al cargo de una isla genómica. El análisis filogenético del Pht cluster muestra que los homólogos más cercanos de 15 de los 23 genes del mismo conforman el denominado “cluster de pseudofaseolotoxina”, que posiblemente es ancestral en *P. syringae*. La búsqueda y comparación de secuencias homólogas al operón *gin* nos ha permitido definir una nueva familia de elementos genéticos móviles, denominados GInts. Todos tienen en su extremo 5' un operón *gin* que muestra un grado de conservación superior al 85%, y han adquirido DNA de muy diversa naturaleza pero que, en su mayoría, proviene del género *Pseudomonas*. Además, los estudios filogenéticos y funcionales indican que estos elementos son activos e intercambiables dentro del género. En conjunto, las evidencias indican que el Pht cluster no se adquirió como tal, sino que se ensambló en *P. syringae*, habiendo sido capturado recientemente por un GInt. Así se constituyó la Pht-PAI, que se transfirió horizontalmente en *P. syringae* dando lugar a los linajes toxigénicos de los patovares phaseolicola y actinidiae.

**APLICACIONES DE LAS INTERACCIONES
PLANTA-MICROORGANISMO**

Péptidos antimicrobianos sintéticos en el control de enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Xanthomonas fragariae* y *X. arboricola* pv. *pruni*

L. Montesinos*, L. Ruz, E. Montesinos, E. Badosa

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

E-mail: laura.montesinos@udg.edu

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (*Psa*), *Xanthomonas fragariae* (*Xf*) y *X. arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) se encuentran entre las bacterias fitopatógenas de cuarentena causantes de enfermedades de impacto económico en la Unión Europea. Uno de los principales retos para minimizar este impacto económico reside en desarrollar estrategias de control integrado. Con el objetivo de disponer de soluciones para el control de estos patógenos de cuarentena que puedan integrarse en las estrategias de control es necesario el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos eficaces frente a estos patógenos, que presenten una eficacia comparable a la de los antibióticos, que no están autorizados en la UE.

Los péptidos antimicrobianos sintéticos (PAM's) ofrecen buenas expectativas ya que, en principio cumplen con los criterios adecuados sobre toxicidad e impacto ambiental y además son productos biodegradables.

Trabajos previos del grupo han demostrado que péptidos pertenecientes a quimiotecas como CECMEL11 (PAM's lineales de 11 aminoácidos derivados de un híbrido cecropina A (2-8)-Melitina (6-9)) o CYCLO10 (PAM's cíclicos de 10 aminoácidos derivados de c(KLKLKFKLKQ)), son activos contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Alentados por los resultados obtenidos, en este trabajo se ha determinado la actividad antibacteriana de 17 péptidos lineales y 21 péptidos cíclicos frente a *Psa*, *Xf* y *Xap*. Entre los péptidos lineales más efectivos de la librería CECMEL11 se cuenta con péptidos de la librería CECMEL-11 así como derivados de ésta con D-aminoácidos, péptidos alargados carboxil terminales, derivados con peptidotriazolas, péptidos biarílicos, y péptidos basados en secuencias análogas de fengicinas e iturinas. En cuanto a los péptidos cíclicos se ensayaron péptidos de la librería CYCLO10, derivados de esta librería que incluyeron lipopéptidos cíclicos, derivados biarílicos y derivados con peptidotriazolas, y finalmente una secuencia ciclada perteneciente a una iturina.

Los mejores resultados de actividad antibacteriana *in vitro* se obtuvieron con péptidos de la librería CECMEL-11 (BP77 y BP100), con derivados de BP100 con un D-aminoácido (BP157), derivados alargados de BP100 carboxil terminales (BP208 y BP211) y péptidos de la librería CYCLO10 (BPC192 y BPC194). En todos estos casos la concentración mínima inhibitoria (CMI) se situó en el rango de 1,25-6,25 microM, como la de antibióticos de referencia (p.e. estreptomycin).

Con una selección de péptidos más activos, se procederá a estudiar la capacidad de inhibición de las infecciones *in planta* causadas por las bacterias *Psa*, *Xf* y *Xap* en plantas de kiwi, fresa y melocotonero respectivamente, en condiciones de ambiente controlado en invernadero de bioseguridad, ya que se trata de enfermedades de cuarentena.

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto Europeo DROPSA (Strategies to develop effective, innovative and practical approaches to protect major European fruit crops from pests and pathogens) UE.FP7-KBBE.2013.1.2-04. GA no: 613678.

Potencial de cepas de *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. como agentes de control biológico de enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae, *Xanthomonas fragariae* y *X. arboricola* pv. pruni

I. Mora*, J. Francés, A. Bonaterra, E. Montesinos, J. Cabrefiga

Instituto de Tecnología Agroalimentaria-XaRTA-CIDSAV, Universitat de Girona. e-mail:

isabel.mora@udg.edu

Las enfermedades causadas por las bacterias fitopatógenas de cuarentena *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae (*Psa*), *Xanthomonas arboricola* pv. pruni (*Xap*) y *Xanthomonas fragariae* (*Xf*), suponen un grave impacto económico en la producción de kiwi, furta de hueso y fresón. El control de estas enfermedades supone un desafío importante para la producción de fruta en la Unión Europea, y se requiere el desarrollo de nuevas estrategias en el marco de la producción integrada.

Los agentes de control biológico (ACB) presentan la capacidad de controlar el desarrollo de patógenos en la planta, interfiriendo con el proceso de infección. Trabajos previos en nuestro grupo han demostrado la capacidad de cepas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* y especies relacionadas, así como bacterias del ácido láctico (BAL), principalmente *Lactobacillus plantarum*, en el control de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas de interés agronómico, como *Erwinia amyovora*, *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria y *Pseudomonas syringae* pv. syringae. La actividad antibacteriana de los ACB seleccionados reside principalmente en la producción de compuestos orgánicos y de una extensa variedad de metabolitos con actividad antimicrobiana (péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, inductores de defensas, etc.). Los aislados utilizados en este trabajo habían sido previamente caracterizados mediante el análisis de marcadores moleculares relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos específicos de cada género. Concretamente, en este estudio se ha determinado la actividad antibacteriana *in vitro* de 27 aislados de *Bacillus* y 55 aislados de BAL, en el control de *Psa*, *Xap* y *Xf*. Los mejores resultados en el control de *Psa*, *Xap* y *Xf* *in vitro* se obtuvieron con 10 aislados de *Bacillus* y 27 aislados de BAL. Entre los aislados más activos se seleccionaron 7 de los aislados de *Bacillus* (A1, A17, A59, A128, A130, A132 y A151) y 7 aislados de *Lactobacillus plantarum* (TC92, TC97, PM411, FC534, NC568, PM314 y PM366) para proceder a la determinación de la capacidad de inhibición de las infecciones causadas *in planta* por *Psa*, *Xf* y *Xap* en plantas de kiwi, fresa y melocotonero, respectivamente, en condiciones de ambiente controlado en invernadero de bioseguridad.

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto Europeo DROPSA (Strategies to develop effective, innovative and practical approaches to protect major European fruit crops from pests and pathogens) UE.FP7-KBBE.2013.1.2-04. GA no: 613678.

Identificación y caracterización de bacterias de la rizosfera de olivo con potencial como agentes de control biológico de amplio espectro

D. Ruano-Rosa*, A. Valverde-Corredor, C. Gómez-Lama Cabanás, J. Mercado-Blanco

Departamento de Protección de Cultivos, Instituto Agricultura Sostenible (CSIC), Campus 'Alameda del Obispo' s/n, Apartado 4084, 14080 Córdoba; E-mail: ruanodavid@gmail.com

En las últimas décadas la preocupación por los riesgos derivados del uso continuado de productos fitosanitarios de síntesis química para el control de enfermedades de cultivos ha experimentado un notable aumento. Parte de la comunidad científica ha dirigido sus esfuerzos al desarrollo de estrategias de control alternativas y eficaces frente a patógenos de plantas. Entre ellas destacan las basadas en el uso de agentes de control biológico (ACB). Características tales como su bajo riesgo medioambiental, o el potencial que tienen para ser aplicados de forma individual, combinados con otros microorganismos, o en estrategias de control integrado, hacen que tengan un elevado interés agronómico, económico y social. El presente trabajo surge de la necesidad de mejorar la sanidad de los cultivos usando métodos más sostenibles y de bajo impacto medioambiental. Se proyectó la creación de una colección de bacterias cultivables procedentes de raíces de olivo como base para el desarrollo de bioformulaciones que, utilizadas individualmente o en combinación, resultasen efectivas frente a diversos patógenos y/o presentaran capacidad de promoción del crecimiento vegetal. Se generó una “bacterioteca” compuesta por 189 aislados que han sido caracterizados a nivel: (1) molecular, mediante la secuenciación parcial del gen 16S rDNA; (2) de capacidad antagonista, evaluando su actividad inhibidora frente aislados de patógenos fúngicos (*Verticillium dahliae*, *Rosellinia necatrix*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum nymphaeae*, *Colletotrichum godetiae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Ganoderma lucidum*), del oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, de dos cepas de la bacteria fitopatogena *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, y del ACB *Trichoderma harzianum* CECT2413; y (3) enzimático y bioquímico, determinando actividades quitinasa, proteasa, fosfatasa, catalasa, o la producción de sideróforos y de 2,3-butanodiol. También se analizó el metabolismo de fuentes de carbono y sensibilidades químicas mediante el uso del sistema Biolog. La clasificación molecular determinó que más del 45% de las bacterias seleccionadas pertenecían al grupo filogenético Proteobacterias, siendo *Pseudomonas* el género más representado. Ningún aislado fue eficaz frente al 100% de los patógenos evaluados. Sin embargo, la mayoría mostraron antagonismo frente a buen número de ellos, destacando varias cepas del género *Paenibacillus*. El patógeno más frecuentemente antagonizado fue *V. dahliae*, mientras que *G. lucidum* fue el que menos. El ACB *T. harzianum* fue antagonizado por menos del 20% de aislados. Los resultados mostraron la presencia generalizada de actividades enzimáticas frecuentemente asociadas tanto al control biológico como a la promoción directa del crecimiento vegetal. Así, la actividad catalasa se detectó en el 100% de las bacterias. Por el contrario, solo un 2% de los aislados mostraron actividad fosfatasa. Este hecho, así como la amplia capacidad antagonista detectada, permiten concluir que algunos de los aislados bacterianos identificados y caracterizados son susceptibles de ser utilizados como ACB frente a diversos patógenos en futuras bioformulaciones.

Financiado por los proyectos P12-AGR667 de la Junta de Andalucía y RECUPERA 2020 del MINECO/CSIC, ambos con cofinanciación FEDER de la UE.

Análisis del potencial biofertilizante de bacterias PGPR para la mejora del enraizamiento de cereales

L. Celador-Lera^{1*}, E. Menéndez¹, J.D. Flores-Félix¹, S. Sánchez-Herrero¹, E. Velázquez^{1,2},
R. Rivas^{1,2}

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

Uno de los principales objetivos de la Unión Europea en materia de agricultura es la reducción del uso de fertilizantes químicos, minimizando la emisión de gases de efecto invernadero derivados de su proceso de fabricación y evitando la contaminación de ecosistemas y los efectos negativos para la salud humana.

Por esta razón, el uso de biofertilizantes se presenta como una alternativa eficiente, barata y sostenible capaz de mejorar la productividad de los cultivos, ya que su aplicación en determinados cultivos, como por ejemplo en hortalizas y cereales, incrementa el peso de las partes comestibles y la producción de grano, respectivamente (Yanni *et al.*, 2001; Flores-Felix *et al.*, 2013).

De entre los microorganismos susceptibles de ser incluidos en la formulación de un biofertilizante eficaz, el género *Rhizobium* es considerado como un buen candidato, ya que se trata de un género conocido por sus múltiples connotaciones positivas en la agricultura y sus interacciones beneficiosas como endófito o como bacteria promotora del crecimiento vegetal. Además su aplicación es idónea, ya que no presenta peligro alguno para la salud humana y animal, no siendo nociva para el medio ambiente. Por tanto, la selección de cepas efectivas en los distintos tipos de cultivos de interés agroalimentario resulta imprescindible con el fin de obtener el máximo rendimiento en producción.

Debido a ello, en este trabajo se pretende evaluar la capacidad de cepas pertenecientes a dicho género *Rhizobium* para promover el desarrollo radicular de cereales como el maíz, el trigo y el centeno. La mejora del desarrollo radicular contribuye significativamente al crecimiento de la planta, ya que al tener mayor superficie también se absorbe más agua y los nutrientes minerales disueltos en ella, provocando un mayor crecimiento. Este incremento también está relacionado con un mayor anclaje y fijación al suelo, soportando mejor las fluctuaciones ambientales, pues la raíz llega a capas más profundas del suelo y es menos sensible a las situaciones de estrés hídrico o nutricional.

Por ejemplo, las semillas de maíz inoculadas mostraron mejores resultados en comparación con las semillas sin inocular, observándose una mayor elongación y un aumento en el grosor de la raíz primaria. Además, se pudo apreciar un aumento significativo en el número de raíces adventicias y un incremento en el número de pelos radicales. Esto se traduce, en un aumento en el volumen de la raíz, lo que proporciona una mayor absorción de nutrientes, minerales y agua, en definitiva un mayor crecimiento de las plantas.

Análisis de la diversidad en *Lactobacillus plantarum* con potencial como agentes de biocontrol de bacteriosis de las plantas

N. Daranas*, G. Roselló, E. Badosa, E. Montesinos, A. Bonaterra.

Instituto de Tecnología Agroalimentaria - CIDA, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: nuria.daranas@udg.edu

Las bacterias del ácido láctico (BAL) se consideran actualmente excelentes candidatas para el desarrollo de nuevos bioplaguicidas. Su actividad antimicrobiana se debe a una gran diversidad de mecanismos de acción como antibiosis (producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular), competencia por nutrientes y colonización del huésped. En un proyecto más amplio se constituyó una colección de 45 aislados de *Lactobacillus plantarum* obtenidos a partir de plantas y productos vegetales cosechados, que mostraron elevada actividad antagonista frente a bacterias fitopatógenas de importancia económica, como *Erwinia amylovora* causante del fuego bacteriano, y de otras como *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae, *Xanthomonas fragariae* y *Xanthomonas arboricola* pv. pruni.

En este trabajo se ha realizado una caracterización genética del conjunto de cepas de *L. plantarum* con el fin de estudiar la diversidad y seleccionar los mejores candidatos a agentes de control biológico. Por un lado, esta caracterización consistió en determinar la presencia de genes biosintéticos de diversas plantarinas, RAPDs y secuenciar varios genes *housekeeping*. Por otro lado, se determinó el potencial de producción de las plantarinas EF y JK de 7 cepas seleccionadas cuantificando el nivel de expresión de los genes *plnE* y *plnJ* mediante PCR cuantitativa de los transcritos de mRNA (*Reverse transcription quantitative PCR*, RT-qPCR).

En la totalidad de las 45 cepas de *L. plantarum*, excepto en una, se detectó la presencia de los genes responsables de la producción y regulación de las plantarinas EF y JK. Las secuencias parciales de 6 genes *housekeeping* (*pgm*, *ddl*, *gyrB*, *purK1*, *gdh* y *mutS*) permitieron determinar diversos polimorfismos entre la colección de cepas (*Multilocus sequence typing*, MLST) y además, esta diversidad genética se confirmó mediante RAPDs. Los genes *plnE* y *plnJ* se expresaron con distinta intensidad en las 7 cepas de *L. plantarum* seleccionadas.

Mediante los resultados de dichas técnicas se seleccionarán las cepas con mayor potencial con el fin de estudiar en trabajos posteriores su adaptabilidad a condiciones adversas y durante la colonización de plantas huésped, para un eficiente control de las enfermedades de los cultivos de interés.

Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos AGL-2009-13255-C02-01 y AGL-2012-39880-C02-01 del MEC, cofinanciado con fondos FEDER, en el marco del proyecto FP7-KBBE.2013.1.2-04 613678 DROPSA de la UE y por una beca 2015 FI_B 00515.

El uso de mutantes fluorescentes demuestra que *Trichoderma harzianum* coloniza las raíces de olivo y reduce el desarrollo de la Verticilosis causada por *Verticillium dahliae*

I. Carrero-Carrón^{1,2*}, M. B. Rubio¹, E. Monte¹, R. M. Jiménez-Díaz², R. Hermosa¹.

¹Departamento de Microbiología y Genética. Instituto Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca. E-mail: rhp@usal.es. ²Departamento de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC.

La Verticilosis del Olivo (VO) causada por el hongo del suelo *Verticillium dahliae* está descrita como una de las enfermedades más importantes del cultivo en todas las zonas olivareras del mundo (excepto Australia) y en España constituye la principal amenaza sanitaria del olivar andaluz. A esto último ha contribuido la expansión de un patotipo defoliante (D) altamente virulento sobre las variedades de olivo de mayor interés comercial, que es el prevalente en Andalucía. El control de la VO requiere la aplicación de estrategias de lucha integrada, de las cuales son elementos clave el desarrollo de material vegetal resistente a *V. dahliae* D y la protección del material de plantación mediante la aplicación de agentes de biocontrol. Los hongos del género *Trichoderma* incluyen especies que se utilizan como agentes de control biológico de una diversidad de enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos de suelo porque su capacidad como antagonistas se basan en varios modos de acción, incluyendo antibiosis, micoparasitismo e inducción de defensas contra estreses bióticos y abióticos, junto con la promoción del crecimiento vegetal. En este trabajo hemos estudiado el proceso de infección y colonización por *V. dahliae* D V-138I de dos clones de acebuche susceptibles o resistentes al mismo en ausencia y en presencia de *T. harzianum* T34. Para ello se obtuvieron transformantes del antagonista y del patógeno que sobreexpresan una proteína verde fluorescente (GFP) y una proteína amarilla fluorescente (YFP), respectivamente, que conservan los fenotipos correspondientes de los aislados silvestres in planta. Plantas de los clones de acebuche se inocularon individual o conjuntamente con los aislados transformados (T34-GFP and V138-Yh), se incubaron en condiciones óptimas para la infección y se muestrearon en un curso temporal para observación con microscopía confocal. Las imágenes de microscopía confocal muestran que la colonización de las raíces de ambos clones de acebuche por el antagonista reduce el progreso del patógeno en la planta. Asimismo, estas imágenes se correlacionan con la sintomatología observada en las plantas y con la extensión de la colonización de sus tejidos indicada por la proporción con que el patógeno se reaisló a partir de muestras de las zonas baja, media y alta de los tallos.

Financiado por el proyecto P10-AGR 6082, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, y fondos FEDER.

Aislamiento de bacterias endófitas de *Crocus serotinus* y análisis de su potencial PGPB en *Crocus sativus* (Azafrán).

A. Díez-Méndez^{1*}, E. Menéndez¹, L. Celador-Lera¹, M. Marcos-Gacía¹, E. Martínez-Molina^{1,2}, R. Rivas^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.² Unidad Asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC (IRNASA).

E-mail: alexandradm@usal.es

Las plantas, tanto de sistemas agrícolas como de hábitats naturales, establecen simbiosis con diversos microorganismos beneficiosos que se encuentran en las inmediaciones de la rizosfera, los denominados *PGPRs* (de sus siglas en inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Este tipo de mutualismo tiene un gran impacto en la planta, ya que mejoran el crecimiento y desarrollo de la misma a través de dos tipos de mecanismos, directos, ya que facilitan la adquisición de nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo y minerales esenciales, e indirectos a través de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas; constituyendo una alternativa al uso de fertilizantes químicos. Por otra parte, su potencial como agentes de biocontrol las cataloga como una herramienta sostenible frente al uso de pesticidas tradicionales. Uno de los grupos de microorganismos más estudiados como un potencial biofertilizante, son las bacterias del género *Rhizobium* debido a la simbiosis que establecen con plantas leguminosas. No obstante, los microorganismos endófitos constituyen una nueva fuente de posibles biofertilizantes aún sin descubrir. En este sentido, decidimos estudiar tanto la biodiversidad de microorganismos endófitos de *Crocus serotinus* (Azafrán de otoño), así como evaluar el potencial para promover el crecimiento de los aislados en plantas de *Crocus sativus* (Azafrán). Se obtuvieron un total de 20 aislados, a los que se realizó una caracterización genotípica basada en la obtención y análisis de perfiles RAPD (Rivas et al., 2001) y la amplificación parcial del gen ribosómico 16S que nos reveló que los aislados pertenecen a los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus* y *Curtobacterium*. A todos ellos se les evaluó su potencial como promotores del crecimiento vegetal, a través de ensayos en placa de producción de sideróforos, solubilización de fosfato y producción de ácido indolacético. Las cepas que presentaron mejores resultados *in vitro* se emplearon para realizar un ensayo de inoculación de plantas de la especie *Crocus sativus* (Azafrán) en invernadero. Se analizaron diferentes variables como la floración, la longitud radicular, longitud y peso seco de los estigmas. Algunos de los tratamientos inoculados con las cepas seleccionadas incrementaron significativamente la producción de azafrán respecto al control. Así pues, los datos obtenidos en este estudio ponen de manifiesto el elevado potencial de nuestros aislados como promotores del desarrollo vegetal de *Crocus sativus*. Además, estos resultados incrementan el interés de la realización de futuros estudios sobre co-inoculaciones aplicadas al cultivo del azafrán así como la importancia de investigar nuevos reservorios para una nueva agricultura sostenible y eficiente.

Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas* con actividad PGPR

S. García, M. Torres, M. Martín, R. Rivilla, E. Arrebola

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. E-mail:
eva.arrebola@uam.es

La rizosfera confiere un nicho ecológico para la proliferación de las bacterias, estableciendo una relación con la planta, en la que las bacterias se benefician de los compuestos exudados por las raíces. Dentro del grupo de microorganismos capaces de colonizar la rizosfera, se encuentran los PGPRs, los cuales influyen de forma positiva, directa o indirectamente en la planta. Varias especies de *Pseudomonas* pertenecientes al complejo de especies de *P. fluorescens*, como *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. brassicacearum* o *P. chlororaphis*, son un ejemplo de PGPRs, ya que algunas de ellas no solo son buenas colonizadoras de la rizosfera, sino que además son capaces de reducir los niveles de etileno en la planta, promoviendo así el crecimiento de la misma. Otras actúan como agentes de biocontrol mediante la producción de ciertos compuestos que inhiben la proliferación de fitopatógenos (como el DAPGs, la fenazina o el ácido cianhídrico). Estos microorganismos tienen un gran interés a nivel biotecnológico y socioeconómico, en la mejora de la producción en el sector de la agricultura.

En base a esto se ha realizado una búsqueda de cepas tanto rizosféricas como endófitas con capacidad PGPR y/o de biocontrol. Concretamente se ha buscado cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* en tres plantas diferentes: pimientos (*Capsicum annuum*), tomates (*Solanum lycopersicum*), y calabazas (*Cucurbita maxima*); procedentes de distintos suelos y tipo de cultivo. Previamente a su análisis, se descartaron las cepas capaces de crecer a 37°C, para evitar posibles patógenos. Para evitar el aislamiento de clones, se realizaron análisis mediante técnicas BOX-PCR, descartando aquellos aislados idénticos. A los aislados seleccionados, tanto de rizosfera como endófitos, se les realizó una búsqueda de genes de interés para PGPR y biocontrol. Estos genes marcadores fueron: *phlC* (DAPG), *phzF* (fenazina), *hcnB* (ácido cianhídrico) y PSF113_1028 (ACC deaminasa). Además, se identificaron aquellas cepas que fueron positiva en alguno/s de estos marcadores, utilizando la secuenciación del 16S. Los resultados obtenidos hasta el momento han mostrado cuatro cepas de rizosfera y cuatro cepas endófitas que potencialmente son de interés agronómico.

De estas cepas seleccionadas, se ha escogido una cepa endófitas, la cual presenta el gen de la ACC deaminasa, y una cepa rizosférica, que contiene los genes que codifican la ACC deaminasa, ácido cianhídrico y DAPG para realizar ensayos de colonización. Para ello se ha empleado alfalfa (*Medicago sativa*) crecida en perlita, y las cepas seleccionadas marcadas con GFP, mediante el plásmido pDSK-GFPuv. Estos ensayos mostraran la eficacia de colonización de estas cepas y su posible utilidad en la agricultura.

Trabajo financiado por un Proyecto con la empresa KIMITEC y el Proyecto BIO2012 31634 del Ministerio de Economía y Competitividad

***Rhizobium leguminosarum* como potencial biofertilizante de cultivos de espinaca**

A. Jiménez-Gómez^{1*}, E. Menéndez¹, J.D. Flores-Félix¹, P. García-Fraile¹, P. F. Mateos¹, R. Rivas¹.

¹*Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca. E-mail: alexjg@usal.es*

La rizosfera es la porción de suelo donde los procesos microbianos están influidos por la presencia de la raíz, siendo esta zona el lugar idóneo para establecer relaciones beneficiosas entre las plantas y los microorganismos. Un ejemplo de interacción positiva entre bacterias y plantas es la ocurrida entre los cultivos de interés agronómico con las rizobacterias (PGPRs), las cuales son capaces de promover el desarrollo y productividad de los cultivos. Para que estas bacterias puedan ser aplicables agrobiotecnológicamente, es fundamental una colonización eficaz de la rizosfera por su parte, siendo la distribución y la abundancia dos factores importantes en este proceso.

En este trabajo hemos analizado la capacidad PGPR de la cepa PEPV12, identificada como *Rhizobium leguminosarum*, que fue aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*. Se comprobaron, por medio de diferentes pruebas, que esta cepa poseía mecanismos PGPR adecuados para su aplicación a cultivos. A continuación, se realizaron ensayos para determinar si esta cepa podría favorecer el desarrollo vegetal en cultivos de interés para dietas saludables, como es la espinaca (*Spinacia oleracea*), viéndose incrementado su desarrollo en estadíos tempranos. Para comprobar que esta cepa interactuaba positivamente adhiriéndose a la raíz de la planta, se decidió analizar el proceso de colonización, la localización y la posible formación de biofilms por parte de nuestra cepa.

Posteriormente, se realizaron ensayos en condiciones controladas de invernadero, resultando en un mayor desarrollo de la parte comestible de la espinaca. Adicionalmente, se cuantificó el contenido en clorofila y los nutrientes (elementos esenciales) contenidos en las hojas de espinaca. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en los parámetros analizados que nos indicaron la interacción positiva de esta cepa en el cultivo seleccionado. Debido a los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que, la cepa de *Rhizobium* empleada es susceptible de ser aplicada como producto agrobiotecnológico seguro y de ser incluida en las formulaciones de biofertilizantes para cultivos de *Spinacia oleracea*.

Detección de compuestos producidos por dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* relacionados con su capacidad bioestimulante y actividad antimicrobiana.

M.C. Magno^{1*}, J. Hierrezuelo¹, C. Ramos², A. de Vicente¹, A. Pérez-García¹ y D. Romero¹.

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

²*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31, 29071 Málaga.*

Algunos miembros del género *Bacillus* presentan ciertas características que los convierten en potenciales agentes de biocontrol de enfermedades de plantas. Entre estas ventajas destaca la producción de compuestos antimicrobianos e insecticidas, así como la promoción del crecimiento de la planta y la inducción de las respuestas de defensa de la planta hospedadora. En trabajos previos de nuestro grupo hemos demostrado que las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 8237 (UMAF6639) y CECT 8238 (UMAF6614) poseen estas propiedades, las cuales contribuyen a la protección de la planta frente a patógenos fúngicos y bacterianos.

Con el fin de identificar los factores bacterianos implicados en esta acción beneficiosa se secuenciaron los genomas de ambas cepas y se llevó a cabo un intenso análisis del contenido genómico utilizando una gama de herramientas bioinformáticas. Por un lado, encontramos toda la colección de factores previamente descritos en otras cepas de *Bacillus* y cuya funcionalidad había sido demostrada en la actividad de biocontrol: i) Genes de biosíntesis de metabolitos secundarios. Junto a los lipopéptidos, detectados en estudios previos, demostramos la producción de seis compuestos adicionales, que podrían contribuir a la inhibición del crecimiento de patógenos. ii) Identificamos los genes de síntesis y analizamos la producción de 2,3-butanodiol y acetoína, dos compuestos volátiles implicados en la inducción de los mecanismos de defensa de la planta. Por otro lado, se localizaron singularidades genéticas en ambos genomas que podrían contribuir al potencial de biocontrol de *B. amyloliquefaciens* CECT 8237 y CECT 8238. Entre ellas destacamos dos regiones genómicas que hipotéticamente estarían implicadas en la producción de metabolitos secundarios no descritos hasta la fecha.

El estudio de estas nuevas regiones genómicas contribuirá a conocer mejor los mecanismos de acción mediante los cuales estas cepas desarrollan su potencial de biocontrol, para así poder mejorar su contribución beneficiosa a la salud de las plantas.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2010-21848-CO2-01 y AGL-2012-31968) y de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (P10-AGR-5797), cofinanciados con fondos FEDER (EU). Este trabajo también ha sido subvencionado con fondos de la empresa Koppert B.V. (8.06/60.4086).

***Azoarcus* sp. CIB, un nuevo endófito del arroz con importantes propiedades útiles en fitorremediación**

M. Carmona Pérez^{1*}, H. Fernández-Llamosas¹, M. Fernández-Pascual², S. Fajardo², C. Morcillo², L. Castro³, M. L. Blázquez³ y E. Díaz¹

¹*Departamento de Biología Ambiental. CIB-CSIC, Madrid*

²*Departamento de Protección Vegetal, ICA-CSIC, Madrid*

³*Facultad de Químicas. Universidad Complutense de Madrid, Madrid*

E-mail: mcarmona@cib.csic.es

Azoarcus sp. CIB es una beta-Proteobacteria desnitrificante capaz de degradar aeróbica y anaeróbicamente compuestos aromáticos, incluyendo entre ellos algunos tan tóxicos como el tolueno o el *m*-xileno (1). Un análisis *in silico* de la secuencia del genoma de *Azoarcus* sp. CIB ha permitido identificar genes cuyos productos están relacionados con la asociación bacteriana con plantas, tales como la fijación de nitrógeno, la producción de pili tipo IV y flagelo, y la biosíntesis de fitohormonas. Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad de fijar nitrógeno, producir ácido indolacético y de solubilizar fosfato insoluble, propiedades descritas en microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (PGP). Además, empleando técnicas de microscopía de luz visible, epifluorescencia, confocal y electrónica hemos demostrado la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB de colonizar la raíz del arroz (*Oryza sativa*) (2). El análisis *in silico* de la secuencia del genoma de la cepa CIB también ha permitido identificar genes que codifican proteínas que poseen una alta identidad con otras que han sido relacionadas con resistencia a metales pesados. Experimentalmente hemos demostrado que la cepa CIB es resistente a arsenito (2 mM), arsenato (50 mM), telurito (3.5 mM), selenito (8 mM), cadmio (1 mM) y zinc (1 mM). Comprobamos así mismo que la cepa CIB es capaz de transformar el selenito, telurito y el cadmio²⁺ a sus formas metálicas, selenio, telurio y cadmio, respectivamente. Estas formas metálicas aparecen como nanopartículas de alta pureza y calidad cristalográfica tal y como mostraron los experimentos realizados por espectroscopía de rayos X. Mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido comprobamos que las nanopartículas se acumulan en el citoplasma durante el crecimiento celular en forma de nanoesferas de selenio o cadmio, con un tamaño de 30-150 nm de diámetro, o de nanotubos de 20 nm de anchura y 300 nm de longitud en el caso del telurio. Cuando las células mueren las nanopartículas son liberadas al medio del cultivo, desde el cual se pueden purificar con facilidad.

Los resultados presentados aquí muestran que *Azoarcus* sp. CIB es una bacteria que posee un elevado potencial en tareas de biorremediación de metales pesados y contaminantes aromáticos, tanto como organismo de vida libre como asociado a plantas (endofitorremediación). Además su versatilidad metabólica permiten utilizarla en producción de sustancias de interés, tales como fitohormonas que estimulen el crecimiento vegetal o nanopartículas metálicas con propiedades ópticas y semiconductoras versátiles en aplicaciones nanotecnológicas (3)

Referencias:

- (1) M.J. Barragán y col. (2004) J.Bacteriol. 186:5762-5774.
- (2) H. Fernández-Llamosas y col. (2014) PLoS ONE 9(11): e114955.
- (3) D. Kim y col. (2012) Bioresource Technol. 125:127-131.

Evaluación del potencial del género *Populus* como fuente de obtención de microorganismos productores de celulasas de interés biotecnológico.

P.M. Ávila-Barba¹, E. Menéndez¹, X. Cruz-González¹, P. García-Fraile², P.F. Mateos¹ y R. Rivas^{1,3*}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias. Universidad de Salamanca. ²Institute of Microbiology. Academy of Sciences of the Czech Republic.

³Unidad asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC(IRNASA).e-mail: raulrg@usal.es

Desde hace algunos años ha aumentado el número de estudios en los que se pretende identificar enzimas con actividad celulásica de origen microbiano que posean un buen rendimiento y sean de fácil producción, como son las celulasas bacterianas. Estas enzimas ofrecen a la industria un formidable atractivo. Estas celulasas son ampliamente utilizadas en la industria textil, papelera y alimentaria, además de ser muy utilizadas en la producción de detergentes y blanqueadores. La búsqueda y aplicación industrial de celulasas estables a amplios rangos de temperatura y pH es uno de los principales intereses de la industria. Las principales fuentes de obtención de especies microbianas degradadoras de celulosa son las plantas.

Los árboles del género *Populus* han sido objeto de estudios con la finalidad de determinar la composición de las comunidades microbianas asociadas a sus distintas partes (Taghavi *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2012). Entre otras cualidades destacables, algunos de los géneros de microorganismos presentes en dichas comunidades son productores de celulasas.

En anteriores trabajos, nuestro grupo de investigación logró aislar e identificar una especie nueva perteneciente al género *Rhizobium* (*R. cellulolyticum*) de árboles del género *Populus* (García-Fraile *et al.*, 2007). Dicha especie bacteriana produce una gran cantidad de celulosa y muestra una elevada actividad celulásica, además de ser un microorganismo no patógeno, lo cual la hace interesante desde el punto de vista biotecnológico.

En el presente trabajo de investigación, se pretende identificar potenciales microorganismos productores de celulasas con un amplio rango de actividad, con lo cual, se procedió al aislamiento de una gran cantidad de cepas bacterianas capaces de degradar carboximetilcelulosa (CMC) provenientes de varios ejemplares del género *Populus*. Una de las cepas aisladas se identificó como *Sphingomonas faeni*, aislada originalmente de la Antártida, que presentó una elevada actividad celulásica, siendo este estudio el primero en demostrar que esta especie posee mecanismos para la degradación de celulosa, es decir, que produce celulasas. Además, las celulasas producidas por esta especie, fueron efectivas en un amplio rango de temperaturas y pHs. Por consiguiente, esta primera aproximación demuestra su potencial utilización como un posible agente en aplicaciones biotecnológicas e industriales.

Taghavi *et al.*, (2009) Appl Environ Microbiol 75(3), 748–757.

Brown *et al.*, (2012) J Bacteriol 192(21), 5991-5993.

García-Fraile *et al.*, (2007) IJSEM 57, 844-848.

Una región genómica implicada en la formación de fibras tipo amiloide en el biofilm de *Bacillus cereus*.

J. Caro-Astorga*, A. Pérez-García, A. de Vicente y D. Romero.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España. E-mail: jcaroastorga@uma.es

Bacillus cereus es una bacteria patógena responsable de numerosos brotes de intoxicación alimentaria. Las esporas y el biofilm son considerados los reservorios más importantes de *B. cereus* que se pueden encontrar en frutas y verduras frescas contaminadas. Los biofilms son comunidades bacterianas difíciles de erradicar de superficies bióticas y abióticas debido a una matriz extracelular estable que recubre y protege a las células bacterianas. Estas matrices extracelulares suelen estar formadas de exopolisacáridos, proteínas, ADN extracelular, y otros componentes minoritarios. Estudios de biofilms en *Bacillus subtilis*, especie filogenéticamente relacionada con *B. cereus*, han demostrado la existencia de fibras tipo amiloide en su matriz extracelular, y su relevancia en el desarrollo de biofilms. El objetivo de este trabajo ha sido investigar la existencia de este tipo de proteínas en *B. cereus* y su implicación en la formación de biofilms.

El análisis comparativo de los genomas de *B. subtilis* y *B. cereus* nos permitió identificar una región genómica que contiene dos loci que codifican ortólogos de la proteína tipo amiloide TasA y un ortólogo de la correspondiente peptidasa señal SipW, responsable del correcto procesamiento de TasA previo a su secreción. La mutación de esta región genómica condujo a la incapacidad de *B. cereus* de formar biofilms, un fenotipo compartido por mutantes en el gen *sipW*. Los mutantes en *tasA* o *calY* no perdieron completamente la capacidad de formación de biofilms, aunque desarrollaron fenotipos diferenciados entre sí. El estudio con microscopía electrónica reveló que TasA, y en menor medida CalY, polimerizan en forma de fibras largas y abundantes en la superficie de las células. La expresión heteróloga de estos loci en una cepa de *B. subtilis* que carece de los factores necesarios para el ensamblaje de fibras de tipo amiloide de TasA reveló: (i) la implicación de esta región genómica *B. cereus* en la formación de películas en la interfase aire-líquido y (ii) la capacidad intrínseca de TasA para formar fibras similares a las fibras formadas por su ortólogo en *B. subtilis*.

Los resultados obtenidos en este estudio indican: (i) La implicación de la región genómica que contiene los genes *sipW*, *tasA* y *calY* en la formación de biofilms de *B. cereus* en superficies abióticas, (ii) las propiedades adhesivas de TasA y CalY, y (iii) la potencial naturaleza amiloide de la proteína TasA de *B. cereus* como su ortólogo en *B. subtilis*.

Este trabajo ha sido financiado con una ayuda del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012-31968), cofinanciado con fondos FEDER (UE).

Una colección de vectores de integración para estudios de expresión y regulación génica en cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*

A. Polonio*, M. Rincón, A. de Vicente, A. Pérez, D. Romero

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”-Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. E-mail: polonio@uma.es

Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 8237 y CECT 8238, aisladas en nuestro laboratorio, tienen capacidad de biocontrol frente a diversas enfermedades que afectan a cucurbitáceas. En trabajos previos hemos demostrado que estas cepas producen lipopéptidos en la superficie aérea de plantas, donde desempeñan al menos dos funciones: i) inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos y bacterianos y ii) participar en la formación de biofilms lo que garantiza la eficiente colonización y persistencia de estos agentes de biocontrol en la planta. Dada la relevancia de estos compuestos, queremos conocer cómo distintas condiciones ambientales afectan a la biosíntesis de estas moléculas especialmente *in planta*. Para llevar a cabo este estudio, hemos construido una colección de “biosensores”, cepas bacterianas derivadas de *B. amyloliquefaciens* CECT 8237 o CECT 8238 que expresan de forma estable fusiones transcripcionales del promotor del gen a estudiar a distintas proteínas reporteras. En primer lugar, las fusiones transcripcionales fueron clonadas en vectores suicidas que se integran de forma ectópica en un locus neutro del genoma de *B. amyloliquefaciens* cuya mutación no afecta al fenotipo estudiado, y a continuación evaluamos la estabilidad de las integraciones. El uso de microscopía confocal y citometría de flujo nos permitió confirmar la funcionalidad del “biosensor” para la producción de iturina y estudiar la dinámica de expresión de este lipopéptido en poblaciones de *B. amyloliquefaciens* crecidas *in vitro* en condiciones planctónicas o en biofilms. Los plásmidos construidos representan una herramienta útil para su uso en estudios de expresión, *in vitro* y en planta, de genes de interés de *B. amyloliquefaciens* CECT 8237 y CECT 8238 y potencialmente otras cepas de *B. amyloliquefaciens*, dado el alto grado de identidad de los locus escogidos para su integración ectópica.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2010-21848-CO2-01 y AGL-2012-31968), cofinanciados con fondos FEDER (EU). Este trabajo también ha sido subvencionado con fondos de la empresa Koppert B.V. (8.06/60.4086).

ÍNDICE DE PARTICIPANTES

PARTICIPANTES

Acosta Jurado, Sebastián

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda/ Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla. E-mail: sacosta@us.es

Añorga García, Maite

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadia, s/n, 31006 Pamplona, Navarra. E-mail: maite.anorga@unavarra.es

Arrebola Díez, Eva María

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: eva.arrebola@uam.es

Bardaji, Leire

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadia, s/n, 31006 Pamplona, Navarra. E-mail: leire.bardaji@unavarra.es

Bernabeu Roda, Lydia M^a

Estación Experimental del Zaidín, CSIC. c/ Profesor Albareda, 1 18008. Granada. E-mail: lydia.bernabeu@eez.csic.es

Carmona Pérez, Manuel

Departamento de Biología Ambiental. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). c/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040. Madrid. E-mail: mcarmona@cib.csic.es

Caro Astorga, Joaquín

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: jcaroastorga@uma.es

Carrero Carrón, Irene

Departamento Microbiología y Genética. Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor, c/ del Duero, 12, 37185 Villamayor. Salamanca. E-mail: irene.carrero@hotmail.com

Castañeda Ojeda, María del Pilar

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: pilar.co@uma.es

Cazorla, Francisco M.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: cazorla@uma.es

Celador Lera, Lorena

Departamento Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca. E-mail: lorenacelador@usal.es

Daranas Boadella, Nuria

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA. Universitat de Girona. c/ Maria Aurèlia Capmany, 61. 17071. Girona. E-mail: daranas.nuria@gmail.com

de Vicente Moreno, Antonio

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: adevicente@uma.es

del Cerro Sánchez, Pablo

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda/ Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla. E-mail: pdelcerro@us.es

Díez Méndez, Alexandra

Departamento Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, Plaza Doctores de la Reina s/n. Salamanca. E-mail: alexandradm@usal.es

Echeverría Ancín, Myriam

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadia, s/n, 31006 Pamplona, Navarra. E-mail: myriam.echeverria@unavarra.es

García Méndez, Sonia

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: sonia.garciamendez@estudiante.

Garrido Sanz, Daniel

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: dan.garrido@estudiante.uam.es

Gómez-Lama Cábanas, Carmen

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Campus Alameda del Obispo. Avenida Menéndez Pidal s/n. 14004. Córdoba. E-mail: cgomezlama@gmail.com

Jiménez Gómez, Alejandro

Departamento Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca. E-mail: alexjg@usal.es

Jiménez-Guerrero, Irene

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda/ Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla. E-mail: ijimgue@us.es

López Baena, Francisco Javier

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda/ Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla. E-mail: jlopez@us.es

López Márquez, Diego

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: dlm@uma.es

López Solanilla, Emilia

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es

Magno Pérez-Bryan, Concepción

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: conchitamagno@uma.es

Martín Basanta, Marta

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: m.martin@uam.es

Martínez Cruz, Jesús

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: jesusmcruz@uma.es

Montesinos Barreda, Laura

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA. Universitat de Girona. c/ Maria Aurèlia Capmany, 61. 17071. Girona. E-mail: laura.montesinos@udg.edu

Mora Pons, Isabel

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA. Universitat de Girona. c/ Maria Aurèlia Capmany, 61. 17071. Girona. E-mail: isabel.mora@udg.edu

Morales Nicolás, Gerard

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA. Universitat de Girona. c/ Maria Aurèlia Capmany, 61. 17071. Girona. E-mail: xarart@gmail.com

Muriel Fernández, Candelas

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: candelas.muriel@uam.es

Murillo, Jesús

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, s/n, 31006 Pamplona, Navarra. E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

Navas Vásquez, Mariela José

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-mail: marielajose.navas@upm.es

Pacheco Moreno, Alba

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda/ Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla. E-mail: alba.pacheco.moreno@alumnos.upm.es

Palacios Alberti, José Manuel

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-mail: Jose.palacios@upm.es

Peñalver Navarro, Ramón

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera, km 4.5. 46113. Moncada. Valencia. E-mail: rpenal@ivia.es

Pérez García, Alejandro

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: aperez@uma.es

Pérez-Montaño, Francisco

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda/ Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla. E-mail: fperez@uma.es

Polonio Escalona, Álvaro

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: polonio@uma.es

Ramos, Cayo

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

Redondo Nieto, Miguel

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: miguel.redondo@uam.es

Remesal González, Efrén

Agroindustrial Kimitec S.L. Ctra. de Alicún Almería, 369. 04721. Roquetas de Mar. Almería. E-mail: efréng@kimitec.es

Rey Navarro, Luis

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-mail: luis.rey@upm.es

Rivas González, Raúl

Departamento Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca. E-mail: raulrg@usal.es

Rivilla Palma, Rafael

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail: rafael.rivilla@uam.es

Rodríguez Herva, José Juan

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-mail: jj.rodriguez@upm.es

Rodríguez Palenzuela, Pablo

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-mail: pablo.rpalenzuela@upm.es

Romero, Diego

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-mail: diego_romero@uma.es

Ruano Rosa, David

Departamento de Protección de Cultivos.
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC.
Campus Alameda del Obispo. Avenida
Menéndez Pidal s/n. 14004. Córdoba. E-mail:
ruanodavid@gmail.com

Rubio Pérez, M^a Belén

Departamento Microbiología y Genética.
Centro Hispano-Luso de Investigaciones
Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca.
Campus de Villamayor, c/ del Duero, 12, 37185
Villamayor. Salamanca. E-mail:
belenru@usal.es

Santamaría Hernando, Saray

Centro de Biotecnología y Genómica de
Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de
Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía
M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-
mail: saray.santamaria@upm.es

Sanz López, Alejandro

Centro de Biotecnología y Genómica de
Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de
Madrid. Campus de Montegancedo. Autovía
M-40 Pozuelo de Alarcón. 28223. Madrid. E-
mail: a.sanzl@alumnos.upm.es

Soto Misffut, María José

Estación Experimental del Zaidín, CSIC. c/
Profesor Albareda, 1 18008. Granada. E-mail:
mariajose.soto@eez.csic.es

Torés, Juan Antonio

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y
Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC).
Campus de Teatinos, s/n. 29071. Málaga. E-
mail: tores@eelm.csic.es

Torres de la Casa, Marta

Departamento de Biología, Facultad de
Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/
Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail:
marta.torrescasa@estudiante.uam.es

Vesga Aguado, María Pilar

Departamento de Biología, Facultad de
Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. c/
Darwin, 2. 28049. Madrid. E-mail:
mariapilar.vesga@estudiante.uam.es

Vida Hinojosa, Carmen

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

ÍNDICE DE AUTORES

AUTORES

Acosta-Jurado, S.	10	Gutiérrez, S.	1
Añorga, M.	17	Hermosa, R.	1, 34
Arrebola, E.	36	Hierrezuelo, J.	38
Ávila-Barba, P. M.	40	Hungría, M.	8
Badosa, E.	29, 33	Imperial, J.	23
Bardaji, L.	17, 24, 26	Jalvo, B.	6
Bejarano, E. R.	18	Jiménez-Díaz, R. M.	34
Bernabéu-Roda, L.	9	Jiménez-Gómez, A.	37
Bertrand, S.	13	Jiménez-Guerrero, I.	2, 5, 8
Beuzón, C. R.	18	Llorente, I.	14
Blázquez, M. L.	39	López-Baena, F. J.	2, 5, 8
Bonaterra, A.	30, 33	López-Márquez, D.	18
Brito, B.	3	López-Solanilla, E.	4, 13, 16
Cabrefiga, J.	30	Magno, M. C.	38
Calatrava-Morales, N.	9	Marcos-Gacía, M.	35
Cardoza, R. E.	1	Martín, M.	6, 22, 25, 36
Carmona Pérez, M.	39	Martínez, P.	24
Caro Rodríguez, S.	4	Martínez-Cruz, J.	15
Caro-Astorga, J.	41	Martínez-García, P. M.	13
Carrero-Carrón, I.	34	Martínez-Molina, E.	35
Castañeda-Ojeda, M. P.	16	Mateos, P. F.	37, 40
Castro, L.	39	Megías, M.	8
Cazorla, F.	21	Menéndez, E.	32, 35, 37, 40
Celador-Lera, L.	32, 35	Mercado-Blanco, J.	7, 31
Cruz-González, X.	40	Monreal, J. A.	2
Daranas, N.	33	Monte, E.	1, 34
de la Torre, N.	3	Montesinos, E.	14, 29, 30, 33
de Vicente, A.	15, 21, 38, 41, 42	Montesinos, L.	29
del Cerro, P.	8	Mora, I.	30
Díaz, E.	39	Moragrega, C.	14
Díez-Méndez, A.	35	Morales, G.	14
Domínguez, S.	1	Morcillo, C.	39
Durán, D.	23	Murdoch, P. S.	10
Echeverría, M.	24, 26	Muriel, C.	6
Fajardo, S.	39	Murillo, J.	17, 24, 26
Fernández-Llamosas, H.	39	Navas Vásquez, M. J.	13
Fernández-Pascual, M.	39	Nicolás, C.	1
Ferrara, M.	7	Nigro, F.	7
Flores-Félix, J. D.	32, 37	Ollero, F. J.	2, 5, 8
Fones, H.	2	Pacheco, A.	23
Francés, J.	30	Palacios, J. M.	3, 23
García, S.	36	Pérez-García, A.	15, 38, 41, 42
García-Fraile, P.	37, 40	Pérez-Montaño, F.	2, 5, 8
Garrido-Sanz, D.	25	Polonio, A.	42
Gil-Serrano, A.	8	Preston, G. M.	2
Gómez-Lama Cabanás, C.	7, 31	Ramos, C.	16, 17, 38
González-Mula, A.	13	Redondo-Nieto, M.	6, 22, 25
Göttfert, M.	10	Rey, L.	23

Rincón, M.	42	Sánchez-Herrero, S.	32
Río-Álvarez, I.	13	Santamaría-Hernando, S.	4
Rivas, R.	32, 35, 37, 40	Sanz-López, A.	3
Rivilla, R.	6, 22, 25, 36	Schiliro, E.	7
Rodríguez-Carvajal, M. A.	8, 10	Senovilla, M.	13
Rodríguez-Herva, J. J.	13	Soto, M. J.	9
Rodríguez-Negrete, E. A.	18	Torres, M.	36
Rodríguez-Palenzuela, P.	13, 24	Valverde-Corredor, A.	7, 31
Romero, D.	15, 38, 41, 42	Velázquez, E.	32
Roselló, G.	33	Vesga, P.	22
Ruano-Rosa, D.	31	Vida, C.	21
Rubio, M. B.	1, 34	Vinardell, J. M.	10
Rubio-Sanz, L.	3	Vioque, B.	2
Ruiz-Argüeso, T.	23	Wong, T.	6
Ruiz-Sainz, J. E.	10	Zehner, S.	10
Ruz, L.	29	Zumaquero, A.	18