



# IV Reunión del Grupo Especializado Microbiología de Plantas

## **Programa y Libro de resúmenes**

IV Reunión Grupo Especializado  
**Microbiología de Plantas**  
Tánger (Marruecos)  
16 – 20 Febrero 2011

# MiP '11

Con el patrocinio de:



[www.genesys-instrumentacion.es](http://www.genesys-instrumentacion.es)



[www.trops.es](http://www.trops.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

[www.uma.es](http://www.uma.es)



[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)



Distribuciones Industriales y Científicas S.L.

[www.dicosa.es](http://www.dicosa.es)



Y la colaboración de

VIAJES NORAFRICA  
[www.norafrica.com](http://www.norafrica.com)

## **Comité Organizador**

Antonio de Vicente Moreno	Universidad de Málaga
Cayo Ramos Rodríguez	Universidad de Málaga
Jesús Murillo Martínez	Universidad Pública de Navarra
Alejandro Pérez García	Universidad de Málaga
Francisco M. Cazorla López	Universidad de Málaga
Houda Zeriouh	Universidad de Málaga
Pablo Rodríguez Palenzuela	Universidad Politécnica de Madrid
Emilia López Solanilla	Universidad Politécnica de Madrid

# **PROGRAMA**

## **Miercoles 16 de Febrero**

- 12:00 (Aprox.) Llegada al aeropuerto de Tánger y traslado al Hotel Oumnia - Puerto.
- 19:00 (Aprox.) Llegada al puerto de Tánger y traslado al Hotel Oumnia - Puerto.  
Salida Málaga – Tánger (Bus): Aprox. 14:00, Fac. Ciencias, UMA  
Salida Tarifa – Tánger (Barco): Aprox 19:00, al menos 1 h antes en el  
puerto de Tarifa.
- 20:00 Registro y Alojamiento en el Hotel Oumnia - Puerto.
- 20:30 Copa de bienvenida en el Hotel Oumnia – Puerto.
- 21:30 Cena en el Hotel Oumnia – Puerto.

## Jueves 17 de Febrero

- 9:00 Registro de Participantes.
- 9:30 Inauguración de la reunión.
- 10:00 SESIÓN I: PATOGÉNESIS Y VIRULENCIA (Moderadores: Emilia López-Solanilla y Jaime Cubero).
- 10:00 I. Matas y C. Ramos. Identificación de genes de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335 necesarios para multiplicarse y mantenerse en olivo.
- 10:15 I. del Rio, M. Antúnez-Lamas, P. Rodríguez-Palenzuela y E. López-Solanilla. Estudio de las proteínas quimiorreceptoras (MCPs) de dos bacterias fitopatógenas modelo: *Dickeya dadantii* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.
- 10:30 A. Zumaquero, A.P. Macho, J.J. González-Plaza, I. Ortiz-Martín, J.S. Rufián y C.R. Beuzón. Contribución cuantitativa a la virulencia de los efectores del sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola.
- 10:45 J.S. Rufián, A.P. Macho, A. Zumaquero y C.R. Beuzón. Análisis de complementación y efecto de la sobreexpresión de efectores tipo III en *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola.
- 11:00 Pausa para café
- 11:30 SESIÓN I: PATOGÉNESIS Y VIRULENCIA (continuación)
- 11:30 M. Sena, J. Garita, E. Ferragud, C. Redondo y J. Cubero. Estudio de los fenómenos de motilidad y formación de biofilm en *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: avances en el conocimiento del establecimiento de la enfermedad.
- 11:45 L. Bardaji, E. Díaz Ibáñez y J. Murillo. La isla de biosíntesis de faseolotoxina se encuentra en una región genómica variable asociada a integrasas y que se mueve horizontalmente.
- 12:00 M.P. Castañeda-Ojeda, E. López-Solanilla y C. Ramos. Translocación y expresión de efectores T3SS de codificación plasmídica en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335.
- 12:15 I. de Cárdenas, M.P. Castañeda-Ojeda, L. Bardaji, C. Ramos, E. López-Solanilla y J. Murillo. Papel de los efectores en la definición del espectro de huésped de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.
- 12:30 I.M. Aragón, I.M. Matas, M. Castillo-Lizardo, M.T. Gallegos y C. Ramos. Papel de los genes *matE* e *iaaL* en la virulencia de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato.
- 12:45 Discusión General.

- 14:00 Comida en el Hotel Oumnia – Puerto
- 16:00 Sesión II: CONTROL BIOLÓGICO (Moderadores: Antonieta de Cal y Eva Arrebola)
- 16:00 H. Zeriouh, D. Romero, L. García-Gutiérrez, A. De Vicente y A. Pérez-García. Papel de surfactina en la capacidad de biocontrol de *Bacillus subtilis* frente a enfermedades bacterianas y fúngicas de cucurbitáceas.
- 16:15 S. Domínguez, V. Arjona, A. Gómez-Cadenas, C. Nicolás, R. Hermosa, M.B. Rubio y E. Monte. Estudio del metaboloma de la interacción *Trichoderma*-tomate.
- 16:30 L. García-Gutiérrez, H. Zeriouh, A. de Vicente y A. Pérez-García. Resistencia sistémica de melón inducida por rizobacterias promotoras del crecimiento: rutas de señalización y determinantes bacterianos implicados.
- 16:45 M.B. Rubio, R. Hermosa y E. Monte. Estudio comparativo de la expresión génica de diferentes especies de *Trichoderma* en interacción con plantas de tomate, usando microarrays de alta densidad.
- 17:00 Pausa para café
- 17:30 J.I. Crespo-Gómez, C. Pliego, A. de Vicente, F.M. Cazorla y C. Ramos. Identificación de genes del agente de biocontrol *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en la micofagia de *Rosellinia necatrix*.
- 17:45 G. Vázquez, A. de Cal, P. Melgarejo, M. Mallorquí, M. Martínez-Alonso, N. Gajú e I. Larena. Riesgo medioambiental de aplicación del agente de control biológico *Penicillium oxalicum* en suelo.
- 18:00 C.E. Calderón, A. de Vicente y F.M. Cazorla. Aproximación a las bases genéticas de la producción del antibiótico antifúngico 2-hexil, 5-propil resorcinol por la cepa de biocontrol *Pseudomonas fluorescens* PCL1606.
- 18: 15 Discusión General
- 18:45 Asamblea grupo MIP
- 20:30 Salida del Hotel a Ahlen Village. Cena-espectáculo y visita nocturna a la ciudad.

## Viernes 18 de Febrero

- 9:30 Sesi3n III: INTERACCIONES PLANTA-BACTERIA (Moderadores: Rafael Rivilla y Maria Jos3 Pozo)
- 9:30 *M. Redondo-Nieto, J. Morrissey, M. Barret, D. Dowling, F. O'Gara, E. Barahona, A. Navazo, F. Mart3n-Granero, M. S3nchez-Contreras, M. Mart3n y R. Rivilla.* El genoma de *Pseudomonas fluorescens* F113 revela inesperadas adaptaciones al ambiente rizosf3rico.
- 9:45 *D. P3rez-Mendoza, H. Prada, L. Romero-Jim3nez, G.P.C. Salmond, M.T. Gallegos y J. Sanju3n.* Papel del c-di-GMP en interacciones planta-bacteria.
- 10:00 *F. P3rez-Monta3o, I. Jim3nez-Guerrero, B. Guasch, T. Cubo, F.J. L3pez-Baena, F.J. Ollero, R.A. Bellog3n y M.R. Espuny.* Flavonoides inductores de los genes de nodulaci3n incrementan la producci3n total de autoinductores y la expresi3n de los genes de s3ntesis de *N*-acil homoserina lactonas en *Rhizobium*.
- 10:30 *F. Mart3n-Granero, E. Barahona, A. Navazo, M. Redondo-Nieto, R. Rivilla y M. Mart3n.* Regulaci3n ambiental de la movilidad en *Pseudomonas fluorescens* F113.
- 10:45 *I. Jim3nez-Guerrero, F. P3rez-Monta3o, R.A. Bellog3n, M.R. Espuny, F.J. L3pez-Baena y F.J. Ollero.* An3lisis preliminar del efector NopL secretado a trav3s del sistema de secreci3n de tipo III de *Sinorhizobium fredii* HH103.
- 11:00 *L.M. Bernab3u-Roda, C.V. Amaya-G3mez, J. Nogales, V. Cu3llar, J. Olivares y M.J. Soto.* Identificaci3n de genes que participan en el control del *swarming* de *Sinorhizobium meliloti*: papel en la formaci3n de biopel3culas y establecimiento de simbiosis.
- 11:15 Discusi3n General
- 11:30 Pausa para caf3
- 12:00 DEBATE: Ya he secuenciado....¿y ahora qu3? (Moderadores: Pablo Rodr3guez Palenzuela y Ram3n Penyalver)
- 13:00 Salida para Asilah. Almuerzo en "Casa Pepe" y visita a la ciudad.
- 21:30 Cena en el Hotel Oumnia – Puerto
- 23:00 Reuni3n Social en Chellah Beach.

## Sábado 19 de Febrero

- 9:30 SESIÓN IV: ETIOLOGÍA Y ECOLOGÍA (Moderadores: Inmaculada Larena y Marta Martín)
- 9:30 *M. Rincón, M. Martín, R. Rivilla y M. Sánchez-Contreras.* Caracterización de las interacciones de *Pseudomonas fluorescens* F113 con invertebrados.
- 9:45 *N. Bonilla, B.B. Landa, J.M. Hermoso, J. González, M. Martínez-Alonso, F.M. Cazorla, N. Gajú y A. de Vicente.* Efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas en las comunidades microbianas del suelo y la rizosfera de aguacate.
- 10:00 *D. Vela, A. de Vicente y A. Pérez-García.* Electrotransformación de *Podosphaera fusca*, hongo biotrofo obligado y agente etiológico del oídio de las cucurbitáceas.
- 10:15 *B. Egüen, P. Melgarejo y A. de Cal.* Resistencia de *Monilinia* spp. en huertos de melocotonero del valle del Ebro.
- 10:30 *D. Bellón, J.M. Sánchez-Pulido, C. Jousseume, A. Pérez-García y J.A. Torés.* Resistencia a fungicidas en *Podosphaera fusca* en el sur de España.
- 11:00 Pausa para café
- 11:30 SESIÓN IV: ETIOLOGÍA Y ECOLOGÍA (continuación)
- 11:30 *S. Barbé, J. Cabrefiga, M.M. López y P. Llop.* El plásmido pEPIR37 de *Erwinia piriflorinigrans*: comparación de genes de interés con los de otras *Erwinia* spp. y utilización para su identificación específica.
- 11:45 *M. Crespo-Palomo, F.M. Cazorla, J.M. Hermoso, E. Guirado, E. Arrebola, J.A. Torés y A. De Vicente.* La malformación del mango: una nueva enfermedad en España.
- 12:00 *C. Redondo, M. Villarino, P. Melgarejo y A. de Cal.* Enfermedades emergentes en el cultivo de plantas de fresa de vivero.
- 12:15 *J.A. Gutiérrez-Barranquero, V.J. Carrión, F.M. Cazorla, D.L. Arnold, J. Murillo y A. de Vicente.* Análisis de diversidad intraespecífica de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ¿un nuevo biotipo asociado al cultivo del mango?.
- 12:30 Discusión General
- 13:00 Clausura de la reunión científica
- 14:00 Almuerzo en el Hotel Oumnia – Puerto
- 16:00 Visita turística a Tánger (Grutas de Hércules, Palacio del Sultán, etc...)
- 21:00 Cena de Clausura en el Restaurante “Hamadi”



## **Domingo 20 de Febrero**

10:00-10:30 (Aprox). Traslados a Aeropuerto o Puerto de Tánger.

**Jueves, 17 de febrero**

**SESIÓN I**

**PATOGÉNESIS Y VIRULENCIA**

(Moderadores: Emilia López-Solanilla y Jaime Cubero)

## **Identificación de genes de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335 necesarios para multiplicarse y mantenerse en olivo.**

**I. Matas\* y C. Ramos.**

*Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM). Campus de Teatinos s/n, 29010-Málaga.  
E-mail: [crr@uma.es](mailto:crr@uma.es)*

Los procesos moleculares responsables de la interacción entre la bacteria causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), y su planta huésped, *Olea europaea* L., son prácticamente desconocidos. Tras la penetración de Psv en los tejidos vegetales a través de heridas, la multiplicación del patógeno desencadena una hipertrofia e hiperplasia de los mismos y, en consecuencia, la formación de tumores. En este trabajo se planteó como objetivo principal la identificación de genes implicados en la virulencia y supervivencia de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* en un huésped leñoso, el olivo. Para ello se ha utilizado una estrategia de genómica funcional, *Signature Tagged Mutagenesis* (STM). Se construyó una colección de 4778 mutantes de la cepa de referencia Psv NCPPB 3335, cada uno de los cuales contienen un transposón mini-Tn5-Km2 portador de una etiqueta diferente (región variable de 40 pb). El análisis en masa de los mutantes, en grupos de aproximadamente 45, se realizó en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. Treinta días después de la infección, las etiquetas correspondientes a los mutantes cuya multiplicación o supervivencia *in planta* se encuentra reducida no se detectan mediante hibridación *Southern*. Se seleccionaron un total de 73 mutantes cuyas etiquetas no fueron detectadas, que presentan una única inserción del transposón en su genoma y su competitividad se encuentra significativamente reducida únicamente *in planta*. La identificación del punto de inserción del transposón reveló la identidad del gen interrumpido en todos estos mutantes. Los genes identificados se agruparon en siete categorías funcionales: 1) metabolismo central; 2) sistemas de secreción; 3) mantenimiento y envuelta celular; 4) tolerancia a estrés y adaptación ambiental; 5) proteínas relacionadas con DNA; 6) proteínas hipotéticas, y; 7) mutantes en genes que codifican proteínas con funciones diversas no relacionadas con las categorías anteriores. Tras determinar el papel en virulencia de la mayoría de los genes identificados realizando inoculaciones individuales en plantas de olivo leñosas, se analizó la estructura tumoral y la localización de células bacterianas, marcadas con GFP, en tumores inducidos en plantas de olivo *in vitro* por al menos un mutante perteneciente a cada una de las categorías anteriores. El estudio detallado de los genes metabólicos interrumpidos ha permitido reconstruir la red metabólica requerida por Psv para sobrevivir *in planta*, revelándose necesaria la biosíntesis de al menos 9 de los 20 aminoácidos comunes que constituyen las proteínas y de las vitaminas biotina, cobalamina y tiamina. Además, se identificaron 3 genes posiblemente implicados en el transporte de citrato, glutamato y sulfato. Por otro lado, se concluyó que la virulencia de Psv en olivo es dependiente, entre otros factores, de la biosíntesis de ácido indol-3-acético, de la integridad de los sistemas de secreción tipo II, III y IV, así como de la de genes posiblemente implicados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, en la fluidez de membrana y en la biosíntesis de peptidoglicano y exopolisacáridos.

## **Estudio de las proteínas quimiorreceptoras (MCPs) de dos bacterias fitopatógenas modelo: *Dickeya dadantii* 3937 y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.**

**I. del Río\*, M. Antúñez-Lamas, P. Rodríguez-Palenzuela y E. López-Solanilla.**

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. (CBGP UPM-INIA).  
E-mail: emilia.lopez @upm.es*

La quimiotaxis es la capacidad que tienen ciertas bacterias de moverse y orientarse hacia gradientes de concentración de sustancias químicas como azúcares o aminoácidos desencadenando distintos tipos de movimientos. De ellos, solamente el *swimming* y el *swarming* estarían relacionados con la presencia de flagelos. Los cambios en la dirección de rotación del flagelo están regulados por unos receptores de membrana o proteínas aceptoras de metilo (MCP) que perciben un estímulo extracelular y una serie de proteínas citoplasmáticas (CheA, CheW, CheY, CheB y CheZ) implicadas en la transducción de la señal que finaliza con la activación del motor flagelar, modificando así el movimiento celular. Las MCPs son generalmente proteínas transmembranales con varios dominios entre los cuales destaca un dominio MCP altamente conservado y un dominio de unión a ligando, generalmente extracelular, que estaría involucrado en la interacción con las sustancias químicas. En estudios previos en este laboratorio, se ha estudiado la implicación de los genes *che* y el motor flagelar en la quimiotaxis de *Dickeya dadantii* 3937 (Dd3937), que en última instancia está relacionada con la patogénesis de esta bacteria. Asimismo, se ha comprobado que Dd3937 es atraída por diversas sustancias químicas, entre las que destaca el ácido jasmónico (JA), molécula señalizadora que activa las defensas de plantas frente a patógenos, heridas, etc. Con el objetivo general de estudiar el conjunto de MCPs de Dd3937 y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPtoDC3000) y de forma particular, aquellas MCPs involucradas en la percepción de sustancias específicas de plantas como el JA, hemos llevado a cabo un análisis bioinformático mediante programas escritos en *perl* y basados en la herramienta HMMER. Este estudio ha permitido identificar las MCPs de Dd3937 y PsPtoDC3000 y conocer los distintos dominios que poseen (un dominio sensor periplásmico o de unión a ligandos, uno o más dominios transmembrana, un dominio MCP citoplasmático, un dominio estructural HAMP y un dominio Cache periplásmico o extracelular). Empleando únicamente la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a ligando, se han realizado dos análisis en paralelo. Por una parte, se llevó a cabo un análisis NETBLAST (BLAST contra toda la base de datos del NCBI) y paralelamente, estos dominios se emplearon para realizar un alineamiento con ClustalW para la elaboración de un árbol filogenético con MEGA. Estos trabajos han permitido inferir ligandos particulares para las diversas MCPs y determinar posibles quimiorreceptores del JA. Para validar experimentalmente este estudio se han realizado ensayos de quimiotaxis en placa empleando una cepa de *Escherichia coli* UU1250 defectiva en sus 5 MCPs, mediante la complementación con MCPs de Dd3937. Asimismo se han generado mutantes de Dd3937 en MCPs de interés cuyo fenotipo ha sido analizado mediante ensayos de virulencia y de quimiotaxis en placa. De este estudio también se ha obtenido información sobre dominios implicados en la percepción de luz (LOV) asociados a dominios MCPs, más frecuentes en PsPtoDC3000 que en Dd3937. Actualmente estamos tratando de analizar la respuesta de estas dos bacterias a la luz mediante ensayos de fototaxis en placa.

## **Contribución cuantitativa a la virulencia de los efectores del sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola***

**A. Zumaquero\*, A.P. Macho, J.J. González-Plaza, I. Ortiz-Martín, J.S. Rufián y C.R. Beuzón**

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

En *Pseudomonas syringae* el sistema de secreción tipo III es esencial para causar enfermedad en hospedadores compatibles, y para desencadenar la respuesta de hipersensibilidad en hospedadores incompatibles. Los distintos patovares de *P. syringae* secretan un número variable de efectores que conforman su secretoma. En este trabajo se ha analizado la translocación de varios candidatos para completar el secretoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a (*Pph* 1448a), cerrando el número en 27, incluido uno no perteneciente a ninguna familia previamente descrita. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método para la generación rápida de mutantes, empleado para generar una colección que incluye mutantes knockouts sencillos para la mayoría de los efectores tipo III de *Pph* 1448a. También hemos generado dos dobles mutantes para efectores con funciones potencialmente redundantes, HopW1-1 y HopW1-2, y AvrB4-1 y AvrB4-2. La contribución a la virulencia de la mayoría de los efectores no ha sido determinada, ya que los métodos utilizados tradicionalmente para analizar la atenuación de la virulencia en los mutantes simples de efectores carecían de la sensibilidad necesaria para detectar un fenotipo. En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que el índice de competitividad (CI) permite la detección de fenotipos de virulencia indetectables por otros métodos. En este trabajo aplicamos los CIs para determinar la contribución a la virulencia de los efectores de *Pph* 1448a, analizando mutantes sencillos de la mayoría de los efectores tipo III en diferentes etapas del proceso de infección en plantas de judía, utilizando dos métodos de inoculación diferentes: infiltración y dipping, y demostrando atenuación para muchos de ellos.

## **Análisis de complementación y efecto de la sobreexpresión de efectores tipo III en *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola***

**J.S. Rufián\*, A.P. Macho, A. Zumaquero y C.R. Beuzón**

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, 29071, Málaga.*

*E-mail: cbl@uma.es*

En *Pseudomonas syringae* el sistema de secreción tipo III es esencial para producir enfermedad en hospedadores compatibles y determina la respuesta de hipersensibilidad en hospedadores incompatibles. Los distintos patovares de *P. syringae* secretan un número variable de efectores, que constituyen su secretoma. El secretoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a (*Pph* 1448a) se compone actualmente de veintisiete efectores validados experimentalmente. Los métodos utilizados tradicionalmente para analizar la atenuación en la virulencia en mutantes simples de efectores carecían de la sensibilidad necesaria para detectar un fenotipo. En nuestro laboratorio, utilizando el método del índice de competitividad (CI) como ensayo de virulencia hemos detectado atenuación para un gran número de mutantes simples durante la infección en Judía (Canadian Wonder). En el caso de HopW1-1/HopW1-2 y AvrB4-1/AvrB4-2 ha sido necesaria la construcción de dobles mutantes para la obtención de fenotipos atenuados debido a que estos efectores presentan redundancia funcional.

En este trabajo se han construido plásmidos que expresan efectores desde su promotor nativo o desde distintos promotores constitutivos, lo que nos ha permitido llevar a cabo análisis de complementación y sobreexpresión de algunos efectores especialmente interesantes. Demostramos que la atenuación en la virulencia observada en los mutantes simples  $\Delta$ HopAB1 y  $\Delta$ HopI1 es debida a la ausencia de dichos efectores, ya que dicha atenuación es complementada con la expresión ectópica de cada uno de ellos. Asimismo, observamos una restauración de la virulencia en los mutantes dobles  $\Delta$ AvrB4-1  $\Delta$ AvrB4-2 y  $\Delta$ HopW1-1  $\Delta$ HopW1-2 cuando son complementados ectópicamente con alguno de los efectores. Además, hemos analizado el efecto de los niveles de expresión ectópica de efectores sobre el crecimiento bacteriano tanto *in planta* como *in vitro*, observando un importante impacto en el comportamiento bacteriano.

Por otra parte, hemos utilizado los plásmidos que sobreexpresan efectores para llevar a cabo ensayos de expresión heteróloga en *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) y analizar así el papel de estos efectores en Arabidopsis. La expresión de AvrB4-1, pero no la de AvrB4-2 ni de HopW1-1/2, produce atenuación en el crecimiento de *Pto* en Arabidopsis.

## Estudio de los fenómenos de motilidad y formación de biofilm en *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: avances en el conocimiento del establecimiento de la enfermedad

M. Sena\*, J. Garita, E. Ferragud, C. Redondo y J. Cubero

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

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) es junto con *X. fuscans* subsp. *aurantifolia* la bacteria causante de la cancrrosis o chancro de los cítricos, enfermedad que se caracteriza por la aparición de lesiones eruptivas en hojas, ramas y frutos que puede derivar en una caída prematura de los mismos y ocasionar una acusada defoliación. Dentro de *Xcc* existen distintas cepas clasificadas según el tipo de chancro que producen, hay cepas de tipo A que afectan a un gran número de cítricos y cepas de tipo A\* y A<sup>w</sup> que de forma natural únicamente son capaces de formar chancros en lima mejicana, aunque al inocularlos por infiltración en hojas de pomelo pueden producir necrosis. Está descrito que *Xcc*, al igual que el resto de las *Xanthomonas*, posee un único flagelo polar, necesario para el establecimiento de la enfermedad, movimiento tipo “swimming” y formación de biofilm.

En este trabajo se han realizado estudios de motilidad en *Xcc* tipos A, A\* y A<sup>w</sup>, en comparación con *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (*Xac*) causante de la mancha bacteriana de los cítricos un problema menor en plantas de pequeño tamaño y asintomática en frutos y *X. campestris* (*Xc*), el agente causal de la podredumbre negra de las crucíferas, que es incapaz de producir enfermedad en cítricos.

Los ensayos de motilidad en placas de agar semisólido mostraron diferencias entre las cepas de *Xcc* de amplio (A) y estrecho (A<sup>w</sup>/A\*) rango de huésped tanto en movimiento tipo “swimming” como “swarming”, y esta diferencia fue mayor con las otras especies ensayadas. También se observaron diferencias morfológicas entre las cepas de amplio y estrecho rango de huésped al visualizar con microscopía electrónica de transmisión bacterias recogidas del área consolidada de las colonias de “swarming” y del frente de avance. En *Xcc* tipo A se observó que el número de flagelos era mayor en el frente de avance que en el área consolidada, dicho fenómeno no se observó en *Xcc* tipo A<sup>w</sup>. Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio mediante PCR cuantitativa en tiempo real de *X. campestris* habían mostrado diferencias en la expresión génica de los genes *motA* y *fleN* entre bacterias procedentes del frente de avance y la zona consolidada de la colonia. Resultados preliminares de otros estudios que se están realizando en *Xcc* de amplio y limitado rango de huésped con los genes anteriormente mencionados y otros relacionados con morfogénesis de flagelo han mostrado también diferentes patrones de expresión entre las distintas cepas ensayadas. Además, en nuestro laboratorio se han observado diferencias en la capacidad formadora de biopelícula o biofilm “*in vitro*” e “*in vivo*” entre los dos tipos de *Xcc*, tanto en hoja como en frutos. La formación de biopelícula depende tanto del rango de huésped de las cepas ensayadas como del huésped en el que se inocule. Parece, por tanto, que existe relación entre los fenómenos de quimiotaxis y motilidad, la capacidad para formar biopelículas y el rango de huésped

En la actualidad y para profundizar en el conocimiento de las interacciones entre estos fenómenos se están realizando ensayos de quimiotaxis en medio líquido utilizando extractos de apoplasto, hoja y lavado de hoja de distintas especies de cítricos cuyos resultados preliminares se mostrarán durante la reunión.

## **La isla de biosíntesis de faseolotoxina se encuentra en una región genómica variable asociada a integrasas y que se mueve horizontalmente**

**L. Bardaji\*, E. Díaz Ibáñez y J. Murillo**

*Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006-Pamplon.*

*E-mail: [jesus.murillo@unavarra.es](mailto:jesus.murillo@unavarra.es)*

La grasa, causada por *P. syringae* pv. phaseolicola (Pph), es una de las enfermedades de mayor impacto económico en judía. La utilización de semilla libre del patógeno es uno de los métodos de control más efectivos, para lo que se utilizan técnicas moleculares de detección basadas en la amplificación de fragmentos específicos de la región de biosíntesis la faseolotoxina. Esta región se compone de 22 genes que se agrupan en un cluster de 23 kb (cluster Pht) incluido en una putativa isla genómica (38 kb, Pht-PAI) y definida en un extremo por cuatro integrasas. En España existen poblaciones de Pph no productoras de faseolotoxina que carecen de al menos algunos de los genes esenciales de producción de la toxina (Tox-) por lo que no son detectables mediante estas técnicas moleculares. Con el fin de estudiar la dinámica génica y evolutiva de genes de virulencia en este patógeno, hemos abordado la secuenciación de las integrasas y del DNA asociado a las mismas en la cepa Tox- modelo Pph CYL314. La secuenciación de un clon genómico de esta cepa indica que no contiene ninguno de los genes de la isla Pht-PAI excepto las integrasas. En CYL314, las integrasas se asocian con 3 CDSs y 2 tnsas truncadas, no relacionadas con los genes de Pht-PAI, creando otra putativa isla de 15 kb insertada con la misma localización genómica que Pht-PAI. A partir de la secuencia de Pph CYL314, se diseñaron una serie de 8 parejas de cebadores cuyos fragmentos solapantes se amplificaron en una colección de 10 cepas no toxigenicas de origen diverso y filogenéticamente diferenciables. La totalidad de las cepas analizadas contienen a las integrasas, y el DNA asociado a ellas está conservado y es sinténico con respecto al DNA de Pph CYL314. La comparación de la isla de CYL314 mediante blast indica que su estructura no está conservada en ninguno de los genomas secuenciados hasta la fecha, aunque la CDS3 está presente en dos cepas de *P. syringae* pv. tomato. Mediante hibridación con 90 cepas representativas de 39 patovares de *P. syringae*, hemos detectado la presencia de al menos parte de tres de las cuatro integrasas en ocho cepas pertenecientes a patovares filogenéticamente distanciados. Las secuencias de las integrasas indican que estas son muy variables y su filogenia no coincide con la de los genes “housekeeping” *gyrB* y *rpoD*, lo que sugiere que estas islas se han transferido horizontalmente. El análisis de la secuencia de las dos islas en Pph sugiere que las integrasas capturan el DNA en las poblaciones de *P. syringae* formando putativas islas que se intercambian como elementos completos mediante transferencia horizontal.



## **Translocación y expresión de efectores T3SS de codificación plasmídica en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335**

**M.P. Castañeda-Ojeda<sup>1\*</sup>, E. López-Solanilla<sup>2</sup> y C. Ramos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM), Campus de Teatinos, 29071-Málaga.

E-mail: crr@uma.es

<sup>2</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid.

E-mail: emilia.lopez@upm.es

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) es el agente causal de la tuberculosis del olivo, enfermedad caracterizada por la aparición de tumores en los troncos y ramas de las plantas infectadas. El aislado Psv NCPPB 3335, cepa de referencia en nuestro laboratorio, contiene tres plásmidos nativos pertenecientes a la familia pPT23A (familia PFP): pPsv48A (78.3 Kb), pPsv48B (45.2 Kb) y pPsv48C (42.1 Kb). La secuenciación de éstos ha revelado, entre otros factores, la presencia de dos genes homólogos a efectores del sistema de secreción tipo III (T3SS): *hopAF1* (pPsv48A) y *hopAO1* (pPsv48B). Además, el cromosoma de NCPPB 3335 codifica un parálogo de *hopAF1*, cuya proteína presenta un 75 % de identidad con la codificada en pPsv48A y aproximadamente un 80 % con HopAF1 de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. La construcción de mutantes de pérdida de función de los genes de codificación plasmídica *hopAF1* (Psv  $\Delta$ hopAF1) y *hopAO1* (Psv  $\Delta$ hopAO1), y su posterior inoculación individual en plantas de olivo micropropagadas *in vitro*, ha revelado que el tamaño y morfología de los tumores generados por estos dos mutantes es semejante a los inducidos por la cepa silvestre. Sin embargo, los tumores inducidos por Psv  $\Delta$ hopAO1, cuyo crecimiento en planta se encuentra significativamente reducido, muestran una necrosis temprana del tejido. La densidad celular alcanzada por el mutante Psv  $\Delta$ hopAO1 en plantas de olivo *in vitro* es aproximadamente diez veces inferior a las mostradas por la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 y por el mutante Psv  $\Delta$ hopAF1. Ensayos de translocación llevados a cabo en plantas de *Nicotiana tabacum* con estos 3 efectores, utilizando fusiones al dominio adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella pertussis*, revelaron que los efectores de codificación plasmídica HopAF1 y HopAO1 se translocan a través del T3SS de Psv. En la actualidad, y con el objetivo de profundizar en la expresión de estos genes, se están llevando a cabo tanto un análisis de la expresión de los mismos mediante qRT-PCR, como fusiones transcripcionales al gen *LacZ* de las secuencias “Hrp-box” localizadas en el extremo 5' de sus ORFs, las cuales son similares a las presentes en los promotores de *P. syringae* activados por el factor sigma HrpL.

Proyecto financiado por el MICINN AGL2008-05311-C02 (01 y 02), cofinanciado por FEDER.

## **Papel de los efectores en la definición del espectro de huésped de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi***

**I. de Cárdenas<sup>1\*</sup>, M.P. Castañeda-Ojeda<sup>2</sup>, L. Bardaji<sup>1</sup>, C. Ramos<sup>2</sup>, E. López-Solanilla<sup>3</sup> y J. Murillo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra

<sup>2</sup> Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA)

<sup>3</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid

E-mail: [jesus.murillo@unavarra.es](mailto:jesus.murillo@unavarra.es)

*Pseudomonas syringae* (*P.s.*) es una proteobacteria gamma ampliamente utilizada como modelo para el estudio de las bases moleculares de la patogenicidad en plantas por su complejidad, ya que puede dividirse en más de 60 patovares en base a su espectro de huésped. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Psv*) es un miembro atípico de este grupo que causa tumores aéreos en plantas leñosas, mientras que la mayoría de los otros patovares dan lugar a necrosis foliares. Aunque se sabe que la producción de fitohormonas vegetales por *Psv* es necesaria para la inducción de tumores en olivo, no se conoce qué otros genes están implicados en la inducción de síntomas y colonización del huésped. La investigación más reciente sugiere que el complemento de efectores es el principal responsable de la definición del espectro de huésped, actuando positivamente al inhibir específicamente las respuesta inmune de la planta huésped y, negativamente, al inducir respuestas de defensa en plantas no huésped. En consecuencia, en este trabajo hemos abordado la caracterización de las actividades de los efectores de *Psv* NCPPB 3335 en su interacción con diversas plantas modelo. La inoculación de NCPPB 3335 en judía cv. Tendergreen dio lugar a una respuesta de resistencia atípica ya que, aunque las poblaciones bacterianas no aumentaron *in planta*, no se produjo acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ni deposición de calosa. Hemos abordado la clonación sistemática de los efectores identificados en NCPPB 3335 y su expresión en diversas bacterias modelo, incluyendo *P.s.* pv. *phaseolicola* 1448A. La expresión del efector *hopAOI* (PSPSV\_B0010, localizado en el plásmido pPsv48B) en la cepa 1448A dio lugar a la supresión de la producción de síntomas en hojas o vainas de judía y del crecimiento de la bacteria en hojas. Al igual que ocurre con *Psv* NCPPB 3335, la expresión de *hopAOI* en 1448A no dio lugar a la producción de calosa ni de ROS. Una cepa derivada de NCPPB 3335 y curada de los plásmidos nativos A y B—y que, por tanto, carece del efector *hopAOI*— dio lugar a los mismos síntomas en judía que la cepa silvestre NCPPB 3335, lo que indica que la actividad de *hopAOI* es redundante en esta cepa. Actualmente se está procediendo a la clonación del resto de efectores de la cepa NCPPB 3335 y al análisis de su expresión en otros patosistemas.

## **Papel de los genes *matE* e *iaaL* en la virulencia de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.**

**I.M. Aragón\*, I.M. Matas, M. Castillo-Lizardo, M.T. Gallegos y C. Ramos.**

Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM), Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga,  
E-mail: [crr@uma.es](mailto:crr@uma.es)

La formación de tumores en olivo por la infección de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), agente causal de la tuberculosis del olivo, es dependiente de la biosíntesis de la fitohormona ácido indol-3-acético (IAA). En *P. savastanoi*, la conversión de L-triptófano (L-Trp) en IAA tiene lugar en dos pasos catalizados por las enzimas L-Trp monooxigenasa (codificada por el gen *iaaM*), y la indolacetamida hidrolasa (codificada por el gen *iaaH*). En esta bacteria, el IAA puede conjugarse con el aminoácido L-Lisina (L-Lys) dando lugar al 3-indol-acetil- $\epsilon$ -L-Lys (IAA-Lys), mediante la acción del gen *iaaL*. La mayoría de las cepas de Psv aisladas de olivo presentan dos copias cromosómicas de cada uno de estos tres genes. El análisis del entorno génico de los dos genes parálogos *iaaL* de Psv, ha revelado que ambos se encuentran precedidos por un marco abierto de lectura (ORF) que codifica un posible transportador perteneciente a la familia MATE (gen *matE*). En el genoma de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000, agente causal de la mancha necrótica del tomate, se han encontrado ortólogos de los genes *matE* e *iaaL*. En ambas cepas bacterianas, el extremo 3' de la región codificante de los genes *matE* contiene una secuencia "Hrp-Box", similar a la presente en los promotores de *P. syringae* activados por el factor sigma HrpL. Análisis preliminares de la expresión de los genes *matE* e *iaaL* mediante RT-PCR sugirieron que ambos genes se podrían expresar en forma de operón, tanto en Psv como en Pto, por el contrario, análisis de hibridación *Northern* mostraron transcritos que se podrían corresponder con la expresión independiente del gen *iaaL* desde la secuencia promotora "Hrp-box". Se construyeron mutantes mediante intercambio alélico de los genes *matE* e *iaaL*, así como del gen *hrpL*, en ambas bacterias fitopatógenas. Los mutantes *matE* e *iaaL* de Psv generan tumores de mayor tamaño que la cepa silvestre en plantas de olivo *in vitro* cuatro meses después de la inoculación. Ensayos de virulencia en plantas de tomate *var. Money Maker*, mostraron que los síntomas desarrollados por el mutante *matE* de Pto fueron menos severos que los generados por la cepa silvestre. Actualmente, se están llevando a cabo ensayos de qRT-PCR con el fin de determinar las condiciones en las cuales se expresan ambos genes.

Proyecto financiado por el MICINN AGL2008-05311-C02-02, cofinanciado por FEDER, y la Junta de Andalucía P08-CVI-03475.

**Jueves, 17 de febrero**

**SESIÓN II**

**CONTROL BIOLÓGICO**

(Moderadores: Antonieta de Cal y Eva Arrebola)

## **Papel de surfactina en la capacidad de biocontrol de *Bacillus subtilis* frente a enfermedades bacterianas y fúngicas de cucurbitáceas**

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

*Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA)*

*E-mail: hzeriuoh@uma.es*

Diversas especies del género *Bacillus* representan una alternativa atractiva para el control de enfermedades microbianas por su gran capacidad antagonista mediante la producción de compuestos antimicrobianos, su habilidad para colonización de las superficies vegetales y su capacidad de inducción de resistencia sistémica en las plantas. Además, la producción de endoesporas permite una fácil formulación para propósitos comerciales. Entre los antibióticos producidos por *Bacillus*, los lipopéptidos están recibiendo una atención especial, ya que parecen contribuir al control de las enfermedades mediante diferentes mecanismos de acción. En nuestro laboratorio, se seleccionaron dos cepas de *Bacillus subtilis* (UMAF6614 y UMAF6639) por su capacidad antagonista frente a un amplio rango de hongos y bacterias fitopatógenas. En trabajos anteriores se demostró que estas dos cepas de *B. subtilis* producían las tres principales familias de lipopéptidos (fengicinas, iturinas y surfactinas), y se confirmó la implicación de fengicinas e iturinas en la capacidad de control de oídio de cucurbitáceas, enfermedad causada por el hongo biotrofo *Podosphaera fusca*, y la mancha bacteriana y la podredumbre blanda, dos enfermedades de origen bacteriano causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectivamente. Además, mediante microscopía electrónica de transmisión se visualizó el efecto de estos lipopéptidos sobre las conidiosporas de *P. fusca* y las células *X. campestris* pv. *cucurbitae*, resultando ser los principales responsables de la inducción de importantes daños ultraestructurales, fundamentalmente a nivel de membrana plasmática y citoplasma. En ningún caso, las surfactinas mostraron actividades antifúngica o antibacteriana, sin embargo, no se ha descartado la implicación de surfactinas en la capacidad de control de estas dos cepas. El principal objetivo de este trabajo es evaluar el papel de surfactinas en la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* e *in vivo* y en la capacidad de colonización de superficies de hojas y frutos de cucurbitáceas. Para ello, se obtuvieron mutantes defectivos en la producción de surfactina. Los estudios que se están llevando a cabo con estas cepas de *B. subtilis* y sus mutantes respectivos incluyen dinámica de poblaciones, microscopía electrónica de barrido, así como ensayos de biocontrol con hojas de melón frente a *P. fusca* y las bacterias fitopatógenas. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que las surfactinas están implicadas en la formación de biopelículas tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que en los mutantes defectivos en surfactina se observó la disminución de la formación de la matriz extracelular y en la capacidad de colonización con respecto a las cepas silvestres. Además, en los ensayos de control biológico los mutantes en surfactina perdieron significativamente la capacidad de reducción de las enfermedades anteriormente mencionadas.

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL07-65340-C02-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

## Estudio del metaboloma de la interacción *Trichoderma*-tomate

S. Domínguez<sup>1\*</sup>, V. Arbona<sup>3</sup>, A. Gómez-Cadenas<sup>3</sup>, C. Nicolás<sup>2</sup>, R. Hermosa<sup>1</sup>, M.B. Rubio<sup>1</sup> y E. Monte<sup>1</sup>

Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamentos de Microbiología y Genética<sup>1</sup> y Fisiología Vegetal<sup>2</sup>, Universidad de Salamanca; y Departamento de Ciencias Agrarias y Medio Natural, Universidad Jaume I<sup>3</sup>  
E-mail: [sara126\\_5@usal.es](mailto:sara126_5@usal.es)

Muchas especies del género *Trichoderma* son conocidas por su capacidad como agentes de control biológico. Durante muchos años, se han estudiado los distintos mecanismos de *Trichoderma* como agente de biocontrol, aunque ha sido con la llegada de las ómicas (genómica, transcriptómica y proteómica) cuando se han empezado a comprender mejor algunos de los mecanismos de interacción molecular de *Trichoderma* con patógenos y plantas (Lorito y col., 2010). Recientemente, se está prestando mayor atención a las respuestas beneficiosas que *Trichoderma* ejerce sobre la planta: estimulando el crecimiento, activando las defensas, y solubilizando y secuestrando nutrientes inorgánicos (Shoreh y col., 2010). Con el objetivo de conocer mejor dichos mecanismos de acción, nos pareció interesante recurrir a una aproximación metabolómica para estudiar los metabolitos diferenciales, en ausencia y presencia de *Trichoderma*, producidos en la interacción de este hongo con la planta.

Para ello, se germinaron y crecieron semillas de tomate, durante dos semanas y a 22°C, en cajas “*Phytatray II*”™ conteniendo medio MS líquido. Trascorrido ese tiempo, se inocularon las plantas de tomate con el micelio de *Trichoderma harzianum* T34 obtenido tras cultivar el hongo en medio PDB durante 48 h. Los cultivos se mantuvieron a 25°C y 80 rpm, durante 20 ó 44 h. Para analizar los metabolitos diferenciales presentes en la interacción *Trichoderma*-tomate, se recogió el micelio de *Trichoderma*, la parte aérea de las plantas, la raíz y el medio de cultivo MS, por separado, a cada uno de estos tiempos.

Tras la extracción de los metabolitos contenidos en cada una de las muestras con metanol al 80%, y su posterior análisis por espectrometría de masas, los primeros datos han reflejado picos diferenciales para las distintas condiciones estudiadas. Lo más significativo ha sido el gran número de compuestos que se secretan a la rizosfera y que proceden, principalmente, del sistema de exudación de la planta. Los picos cromatográficos diferenciales obtenidos se están analizando con objeto de identificar su estructura y dilucidar su papel en la interacción *Trichoderma*-planta.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AECID (A/024529/09)

Lorito, M.; Woo, S.L.; Harman, G.E. y Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 395-417.

Shoreh, M.; Harman, G.E. y Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43.

## **Resistencia sistémica de melón inducida por rizobacterias promotoras de crecimiento: rutas de señalización y determinantes bacterianos implicados**

**L. García-Gutiérrez\*, H. Zeriuoh, A. de Vicente y A. Pérez-García**

*Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, (IHSM-UMA)*

*E-mail: lauragg@uma.es*

El oídio (*Podosphaera fusca*) es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas tanto en España como en el resto del mundo. En la actualidad el control de la enfermedad se basa en el empleo continuado de fungicidas lo que ha originado la aparición de resistencias frente a las principales materias activas utilizadas para su control. El cultivo de melón se desarrolla principalmente en explotaciones a campo abierto, lo que representa una seria limitación para muchos de los agentes de control biológico desarrollados frente a oídio que están actualmente diseñados para su empleo en cultivos protegidos. Una posible alternativa biológica en la lucha contra el oídio podría ser el empleo de microorganismos inductores de resistencia sistémica (ISR) como son algunas rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR). En trabajos anteriores se seleccionaron dos cepas de *Bacillus subtilis* UMAF6639 y UMAF6614, una de *Bacillus cereus* UMAF8564, y dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* UMAF6031 y UMAF8402 capaces de inducir resistencia sistémica en melón frente a oídio. La aplicación conjunta de algunas de las cepas seleccionadas proporcionó reducciones de esta enfermedad mayores a las obtenidas por cada cepa de forma independiente. Además, estas cepas fueron capaces de promover el crecimiento en melón, pepino y *A. thaliana*. Con el objetivo de profundizar en los mecanismos de defensa inducidos por estas bacterias, se realizaron ensayos de inducción de resistencia en *Arabidopsis thaliana* frente a oídio (*Golovinomyces cichoracearum*), con la intención de utilizar mutantes afectados en las dos principales rutas de transducción de señales relacionadas con la defensa, las rutas del ácido salicílico y la del ácido jasmónico y etileno. Para esclarecer los mecanismos de defensa inducidos por estas bacterias se ha estudiado la expresión de genes de melón relacionados con la defensa como los de PR-1, peroxidasa y quitinasa. Para la identificación de los determinantes bacterianos implicados en la activación de los mecanismos de defensa en melón, nos hemos centrado en el posible papel de los lipopéptidos de *Bacillus* en la inducción de ISR. Para el desarrollo de este objetivo hemos utilizado mutantes de la cepa *B. subtilis* UMAF6639, defectivos en la producción de surfactina, iturina y fengicina.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-65340-C02-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

## **Estudio comparativo de la expresión génica de diferentes especies de *Trichoderma* en interacción con plantas de tomate, usando microarrays de alta densidad**

**M.B. Rubio\*, R. Hermosa y E. Monte**

*Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca*  
E-mail: [belenru@usal.es](mailto:belenru@usal.es)

Muchas especies del género *Trichoderma* son capaces de favorecer a las plantas, bien activando las defensas, estimulando el crecimiento, o solubilizando y secuestrando nutrientes. Ensayos *in vivo* de interacción de 11 cepas de *Trichoderma*, representantes de la diversidad genética existente en este género, con plantas de tomate pusieron de manifiesto que las cepas con mayor poder fertilizante eran *T. reesei* T6, *T. hamatum* T7 y *T. harzianum* T34, mientras que la cepa con menor poder fertilizante era *T. virens* T87.

Inicialmente, se realizó un análisis comparativo de la expresión génica de las cepas *T. reesei* T6, *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 con respecto a *T. virens* T87, en presencia o no (controles) de plantas de tomate, empleando *microarrays* de oligonucleótidos de alta densidad. Dicho análisis demostró que no existían genes de *Trichoderma* implicados exclusivamente en el proceso de fertilización de las plantas, ya que no se encontró ningún gen común, activado o reprimido, en *T. reesei* T6, *T. hamatum* T7 y *T. harzianum* T34 en interacción con la planta que no lo estuviera en *T. virens* T87.

Posteriormente, se realizó un análisis comparativo de la expresión génica de las cepas *T. hamatum* T7, *T. harzianum* T34 y *T. virens* T87 en presencia de plantas de tomate con respecto a las cepas en ausencia de planta. En este caso, no se incluyó en el estudio la cepa *T. reesei* T6, debido a que es una cepa con propiedades principalmente celulolíticas y filogenéticamente muy diferente a las otras tres cepas estudiadas. Un total de 200 genes se expresaron diferencialmente en la interacción de *T. hamatum* T7 con plantas de tomate: 43.14% relacionados con función molecular y 56.86% con procesos biológicos. Un total de 615 genes se expresaron diferencialmente en la interacción de *T. harzianum* T34 con plantas de tomate: 33.47% relacionados con función molecular, 34.50% con procesos biológicos y 32.03% con componentes celulares. Y un total de 370 genes se expresaron diferencialmente en la interacción de *T. virens* T87 con plantas de tomate: 31.4% relacionados con función molecular, 42.3% con procesos biológicos y 26.3% con componentes celulares. Únicamente se encontraron 7 genes expresados diferencialmente en la interacción con la planta que fueran comunes a estas tres especies de *Trichoderma*.



## **Identificación de genes del agente de biocontrol *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO 110 implicados en la micofagia de *Rosellinia necatrix***

**J.I. Crespo-Gómez<sup>1,2\*</sup>, C. Pliego<sup>1</sup>, A. de Vicente<sup>2</sup>, F.M. Cazorla<sup>2</sup> y C. Ramos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Área de Genética y <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA), Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga.

<sup>1</sup>E-mail: [crr@uma.es](mailto:crr@uma.es), <sup>2</sup>E-mail: [cazorla@uma.es](mailto:cazorla@uma.es)

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110, agente de biocontrol seleccionado frente a la podredumbre blanca del aguacate causada por *Rosellinia necatrix*, coloniza las hifas de este hongo de forma competitiva, alimentándose de los metabolitos exudados por el mismo durante su crecimiento, fenotipos característicos de la micofagia bacteriana de tipo biotrófico extracelular. Además de la capacidad de asimilar nutrientes del exudado fúngico, se ha descrito que la colonización competitiva de las hifas por bacterias biotrofas extracelulares depende de su resistencia a la acción de compuestos antimicrobianos, así como de su habilidad para modificar la permeabilidad de las membranas, el metabolismo fúngico, el flujo de metabolitos exudados o el desarrollo del hongo. Con el objetivo de identificar genes de *P. pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en su comportamiento micofágico frente a *R. necatrix*, se está llevando a cabo una estrategia de genómica funcional denominada “Signature Tagged Mutagenesis” (STM). Hasta la fecha, se ha analizado la capacidad de 3408 mutantes de esta cepa de crecer y sobrevivir durante 48 horas en medio BM-RE, un medio mínimo que contiene compuestos exudados por las hifas de *R. necatrix*. Tras dos rondas consecutivas de STM, hasta ahora hemos seleccionado un total de 61 mutantes portadores de una única copia del transposón, a los que actualmente se les está analizando su competitividad respecto a la cepa silvestre en medio rico LB y en BM-RE. Hasta la fecha, se han seleccionado un total de 9 mutantes denominados mutantes GAM (“Growth Attenuated Mutants”), cuya competitividad se encuentra reducida exclusivamente en medio BM-RE. La secuenciación del fragmento de ADN colindante al transposón en estos 9 mutantes, ha revelado los genes afectados en los mismos. Tres de estos mutantes (GAM-1, GAM-5 y GAM 8) se encuentran afectados en genes relacionados con el metabolismo, codificantes de la Acil-Coa deshidrogenasa, una FAD oxidoreductasa y una proteína implicada en la activación de la glutamina sintetasa, respectivamente. A esta categoría pertenece también GAM-9, afectado en la isocitrato liasa, cuya competitividad en LB se encuentra también reducida. GAM-3 contiene el transposón en un gen que codifica una proteína relacionada con el metabolismo del segundo mensajero di-GMPc, implicado en la regulación de procesos relacionados con el biocontrol, como la formación de “biofilms” y la colonización de raíces. Por último, los mutantes GAM-4 y GAM-2 se encuentran afectados en una peptidasa y una enterotoxina, respectivamente, mientras que GAM-6 y GAM-7 contienen el transposón en genes codificadores de proteínas hipotéticas.

## **Riesgo medioambiental de aplicación del agente de control biológico *Penicillium oxalicum* en suelo**

**G. Vázquez<sup>1\*</sup>, A. De Cal<sup>1</sup>, P. Melgarejo<sup>1</sup>, M. Mallorqui<sup>2</sup>, M. Martínez-Alonso<sup>2</sup>, N. Gaju<sup>2</sup> e I. Larena<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña 7500, 28040 Madrid.  
E-mail: ilarena@inia.es*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biociencias. UAB. 08193 Bellaterra, Barcelona.  
E-mail: nuria.gaju@uab.es*

*Penicillium oxalicum* (PO) ha demostrado ser un eficaz agente de control biológico (ACB) frente a diferentes enfermedades de plantas hortícolas así como frente al oidio de la fresa causado por *Sphaeroteca macularis* f. sp. *fragariae*. Un aspecto importante en el proceso de registro y comercialización de un ACB es la valoración del riesgo medioambiental que supone su aplicación, puesto que éste puede no sólo actuar sobre el patógeno diana sino también sobre otros microorganismos indígenas. Además, el efecto protector de muchos ACBs está relacionado con su capacidad de colonización por lo que su supervivencia tras su aplicación es crítica para su eficacia frente a la enfermedad. Sin embargo, conviene tener en cuenta que el ACB en la zona de aplicación sólo puede mantenerse (persistencia) durante el período necesario para el control del patógeno a fin de minimizar los riesgos medioambientales que puedan derivarse de su presencia en el ecosistema. Por tanto, para evaluar el riesgo de la aplicación PO sobre los suelos de cultivo se estudió su movilidad tanto horizontal como vertical y su persistencia en el suelo, así como se analizaron las variaciones en las poblaciones de microorganismos (hongos) del suelo tras su aplicación. Para ello, se ha diseñado un ensayo experimental en invernadero en ausencia del agente patógeno con turba estéril y un ensayo comercial al aire libre con inoculación natural del patógeno. Cada ensayo fue repetido 2 veces. En los dos tipos de ensayos se emplearon plantas de tomate tratadas en semillero con PO 7 días antes del trasplante. Los tratamientos fueron: plantas control (no tratadas) y plantas tratadas con conidias secas de PO. En ambos ensayos se evaluaron 2 parámetros: la movilidad tanto horizontal (0-15 y 16-30 cm de la planta) como vertical (0-2,5 y 2,6-5 cm de profundidad) y la persistencia. Para ello se estimaron cada 15 días desde el trasplante hasta 106 d en invernadero y 180d en campo: (i) la viabilidad de PO en el suelo mediante crecimiento en medio semiselectivo, y (ii) la detección y cuantificación del mismo en suelo mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran que las conidias secas de PO sobreviven durante menos tiempo en campo que en invernadero, no detectándose diferencias entre las profundidades ni las distancias a las plantas. Finalmente, se estudió el posible efecto de la aplicación del ACB sobre la composición fúngica del suelo mediante la técnica molecular PCR-DGGE, en los 2 ensayos al aire libre. Se tomaron muestras de suelo a los 0, 90 y 180 días desde el trasplante. Los 180 días corresponden a la finalización del cultivo del tomate. Los patrones o perfiles genéticos resultantes nos mostraron la diversidad de la comunidad fúngica en suelo y su respuesta a la introducción del ACB. Las poblaciones fúngicas varían a lo largo del tiempo en superficie y en profundidad. Sin embargo, la aplicación de PO no afecta significativamente a estas poblaciones.

## **Aproximación a las bases genéticas de la producción del antibiótico antifúngico 2-hexil, 5-propil resorcinol por la cepa de biocontrol *Pseudomonas fluorescens* PCL1606**

**C.E. Calderon\*, A. de Vicente y F.M. Cazorla**

*Departamento de Microbiología, IHSM-UMA, 29071-Málaga.España.Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos.*

*E-mail: cazorla@uma.es*

*Pseudomonas fluorescens* PCL1606 es una rizobacteria con capacidad de biocontrol frente a *Rosellinia necatrix*, agente causal de la podredumbre radicular blanca. Ésta bacteria contiene los genes que codifican para la producción de antibióticos tales como Pirrolnitrina (PRN), Pioluteorina (PLT), 2,4-diacetilfloroglucinol (PHL), ácido cianhídrico (HCN) y 2-hexil-5-propil resorcinol (HPR), además, la producción de HPR en *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 está relacionada con su capacidad antagonista. Se ha puesto de manifiesto, mediante amplificación por PCR, la presencia del operón *dar* (implicado en la producción de HPR en otras *Pseudomonas*) en la cepa *P. fluorescens* PCL1606, mostrando el mismo número de genes y el mismo orden, aunque con ligeras diferencias. Con objeto de determinar si los genes homólogos a los genes *dar* presentes en *P. fluorescens* PCL1606 también constituyen un operón *dar*, se llevo a cabo un análisis por RT-PCR, que mostró una organización diferente a la descrita hasta el momento en otras especies. Simultáneamente, se determinó el papel de cada uno de los genes homólogos a los genes *dar*, su implicación en la producción de HPR y su capacidad de biocontrol. Para ello, se ha construido una colección de mutantes dirigidos por inserción en cada uno de los genes homólogos a los genes *dar*. Sobre estos mutantes, se realizó una caracterización fenotípica de las propiedades relacionadas con el biocontrol, entre ellas la capacidad de antagonismo frente a *Rosellinia necatrix* y *Fusarium oxysporum*, la producción de antibióticos, los diferentes tipos de movilidad, la producción de biopelícula, la producción de Acil-homoserina lactonas (AHL) y ensayos de control biológico en los sistemas experimentales aguacate-*Rosellinia* y tomate-*Fusarium*. Los resultados obtenidos muestran que los mutantes en los genes homólogos a *darA* (MutA) y *darB* (MutB) pierden la capacidad de producir el antibiótico HPR, además MutA, pierde la capacidad de producir AHL. Paralelamente en los ensayos de biocontrol se observó una disminución de la actividad antagonista con respecto a la cepa silvestre de cada uno de los diferentes mutantes.

Esta investigación ha sido financiada por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05453-C02-01) cofinanciado por fondos FEDER. CE Calderón ha recibido una beca de FPI, MICINN, España.

**Viernes, 18 de febrero**

**SESIÓN III**

**INTERACCIONES PLANTA-  
BACTERIA**

(Moderadores: Rafael Rivilla y María José Pozo)

## **El genoma de *Pseudomonas fluorescens* F113 revela inesperadas adaptaciones al ambiente rizosférico.**

**M. Redondo-Nieto<sup>1</sup>, J. Morrissey<sup>2</sup>, M. Barret<sup>2</sup>, D. Dowling<sup>3</sup>, F. O’Gara<sup>2</sup>, E. Barahona<sup>1</sup>, A. Navazo<sup>1</sup>, F. Martínez-Granero<sup>1</sup>, M. Sánchez-Contreras<sup>1</sup>, M. Martín<sup>1</sup> y R. Rivilla<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. Spain.*

<sup>2</sup>*Biomerit Research Centre. University College Cork. Cork. Ireland*

<sup>3</sup>*Institute of Technology. Carlow. Ireland*

\**rafael.rivilla@uam.es*

*P. fluorescens* F113 fue aislada de a partir de la rizosfera de remolacha en una explotación agrícola en Irlanda. Esta cepa presenta capacidad de biocontrol basada en la producción de varios compuestos antibióticos y antifúngicos así como en su capacidad para colonizar la rizosfera. El genoma de *P. fluorescens* F113 ha sido secuenciado utilizando tecnologías de secuenciación masiva: 454 (Roche) y Solexa (Illumina). Mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas para el ensamblaje y la predicción de ORFs hemos obtenido un borrador del genoma anotado. El genoma de F113 está formado por un único replicón, un cromosoma circular de alrededor de 6.9 Mb, y que contiene más de 5587 ORFs, siendo al menos 839 de ellas únicas para esta estirpe al no aparecer en los genomas de otras cepas de *P. fluorescens* ya secuenciadas y anotadas. Entre estas ORFs únicas en *P. fluorescens* F113, hemos hallado islas génicas y genes que podrían contribuir a la adaptación de esta bacteria al ambiente de la rizosfera. Entre ellas, podemos destacar: 1) Genes necesarios para la desnitrificación, que permiten a la bacteria el crecimiento anaerobio utilizando nitrato y nitrito como aceptor final de los electrones. 2) Dos sistemas de secreción tipo 3, uno de ellos con homología con patógenos de animales. 3) Dos sistemas de secreción tipo 6, similares a los presentes en bacterias patógenas. 4) Un segundo aparato flagelar, que parece ser importante en la colonización de la rizosfera. 5) Genes que presentan homología con genes que codifican toxinas, principalmente dirigidas contra insectos y 6) Genes que codifican rutas de degradación de compuestos orgánicos aromáticos.

## Papel del c-di-GMP en interacciones planta-bacteria

D. Pérez-Mendoza<sup>1\*</sup>, H. Prada<sup>1</sup>, L. Romero-Jiménez<sup>1</sup>, G.P.C. Salmond<sup>2</sup>, M.T. Gallegos<sup>1</sup> y J. Sanjuán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Departamento de Microbiología del suelo y Sistemas Simbióticos. C/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada.

E-mail: [dpmendoza@eez.csic.es](mailto:dpmendoza@eez.csic.es).

<sup>2</sup>. Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QW, UK.

Tanto bacterias patógenas como mutualistas de plantas han desarrollado sistemas que les permiten invadir y establecer infecciones crónicas en sus respectivos huéspedes. Diferentes estudios han revelado que existe una sorprendente analogía entre los mecanismos moleculares que gobiernan ambos tipos de interacciones bacteria-planta [1]. Tanto las bacterias fitopatógenas como las mutualistas ejercen un control estricto de las funciones implicadas en la interacción con la planta, lo cual les permite pasar de un modo de vida libre a otro más ventajoso en estrecha relación con su hospedador. El c-di-GMP [bis-(3'-5')-cíclico di-guanosina monofosfato o diguanilato cíclico] se ha revelado como un segundo mensajero clave en la regulación de los mecanismos moleculares y genéticos (virulencia, motilidad, agregación, adhesión y formación biopelículas, etc.) que gobiernan la transición entre estos dos modos de vida bacterianos. El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP gracias a la acción de diguanilato ciclasas (DGC) y se hidroliza en 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) por fosfodiesterasas específicas (PDE). En concordancia, tanto bacterias fitopatógenas (p.ej. bacterias del género *Pectobacterium* y *Pseudomonas*) como simbióticas (p.ej., las conocidas comúnmente como Rizobios) presentan en sus genomas una gran cantidad de genes que potencialmente codifican proteínas implicadas en la síntesis y degradación de este segundo mensajero.

En este trabajo se aborda el estudio del impacto generado por concentraciones intracelulares anormalmente altas de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de la DGC PleD\* de *Caulobacter crescentus* en la cepa fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (*Pba*) y simbiótica de *Sinorhizobium meliloti* (*Sme*). El incremento intracelular de c-di-GMP en estas bacterias se corroboró mediante el uso de técnicas espectroscópicas y su impacto en motilidad, agregación y producción de biopelículas ha sido ensayado tanto *in vitro* como en la interacción con la planta hospedadora. Adicionalmente, el empleo de una novedosa estrategia ha permitido la identificación de la  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamina y celulosa como los exopolisacáridos clave, regulados por c-di-GMP, implicados en la producción de biopelículas en *Pba* y *Sme*, respectivamente. Este estudio pone de manifiesto que, aunque mediante el empleo de sustancias diferentes, el c-di-GMP juega un papel central en los fenómenos de adhesión presentes en las interacciones planta-microorganismo, tanto simbióticas como patogénicas.

[1] Soto MJ, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J, Olivares J (2009) Mutualism versus pathogenesis: The give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* 11: 381-388.

## **Flavonoides inductores de los genes de nodulación incrementan la producción total de autoinductores y la expresión de los genes de síntesis de *N*-acil homoserina lactonas en *Rhizobium***

**F. Pérez-Montaña\*, I. Jiménez-Guerrero, B. Guasch, T. Cubo, F.J. López-Baena, F.J. Ollero, R.A. Bellogín y M.R. Espuny.**

*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.  
E-mail: fperez@us.es*

La Percepción de Quórum (PQ) es un proceso dependiente de densidad celular en el que se producen y secretan unas moléculas extracelulares difusibles denominadas autoinductores (AI). Cuando se alcanza una concentración umbral, estas moléculas entran de nuevo en la célula y coordinan la expresión de ciertos genes. En las bacterias Gram negativas el grupo de AIs más importante son las *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). Dentro de la familia *Rhizobiaceae*, los genes regulados por PQ están implicados en mayor o menor medida en la simbiosis con la leguminosa. Esta simbiosis se caracteriza por un diálogo molecular entre la bacteria y la planta, que se inicia con la activación de los genes *nod* de la bacteria ante la presencia de flavonoides específicos que son producidos por la planta.

En este trabajo, se estudió la producción de AI por tres estirpes de rizobios con diferentes rangos de hospedador (*Sinorhizobium fredii* SMH12, *Rhizobium etli* ISP42, y *Rhizobium sllae* IS123). Las tres bacterias producen un patrón similar de AI en el que siempre aparecen la *N*-octanoil homoserina lactona y sus derivados 3-oxo y/o 3-hidroxi. Cuando se estudió la influencia de flavonoides en la producción de AI se detectó un incremento en la producción total de AI, pero únicamente en presencia de aquellos flavonoides que son inductores de los genes de nodulación. Además, experimentos con *qRT-PCR* demostraron que la expresión de genes de síntesis de AHLs de *S. fredii* SMH12 (*traI*) y *R. etli* ISP42 (*rail* y *cinI*) también se veía incrementada en presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación.

Todos estos resultados parecen indicar que las leguminosas pueden modular los sistemas de PQ de las bacterias simbiotes a través de la producción de flavonoides, contribuyendo al éxito de la simbiosis.

## **Regulación ambiental de la movilidad en *Pseudomonas fluorescens* F113.**

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

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

La movilidad es uno de los caracteres más relevantes para la colonización competitiva de la rizosfera por las *Pseudomonas*. El análisis de la movilidad de numerosos variantes fenotípicos aislados de la rizosfera indicaba que era un carácter cuantitativo y posiblemente su regulación era poligénica. Por ello, realizamos un estudio de la movilidad mediante el análisis de una librería de mutantes generados por transposición. Este análisis, junto con la secuenciación del genoma de la cepa F113, nos ha permitido definir tres niveles en los que la regulación ambiental puede actuar reprimiendo la capacidad de movimiento. El primer nivel corresponde a la represión de la producción de los componentes del aparato flagelar a través de la represión de la transcripción de *fleQ*, que codifica un activador transcripcional necesario para la síntesis de las proteínas del flagelo. Ésta es una vía compleja y ramificada en la que tiene un papel protagonista el factor sigma codificado por *algU* que es necesario para la expresión de *amrZ* que codifica un represor de la transcripción de *fleQ*. *algU* está a su vez regulado a nivel de transcripción por SadB y a nivel de traducción por el sistema Gac. El segundo nivel corresponde a la producción de un segundo flagelo críptico regulado por el máster operón *flhDC*. Este segundo flagelo es homólogo al de *Azotobacter* y Enterobacterias y no es producido por la estirpe silvestre, ya que la transcripción de este máster operón está reprimida por KinB proteína que también interviene en la síntesis de alginato. Mutantes en *kinB* y variantes fenotípicos aislados de la rizosfera producen este flagelo incrementándose su capacidad de movimiento. Ya que la expresión de *kinB* requiere el factor sigma AlgU, estas dos vías están interrelacionadas. El tercer nivel corresponde a la velocidad de rotación del flagelo y está mediada por los niveles de diGMPc. Hemos identificado una proteína flagelar, FlgZ, que contiene un dominio PilZ, sensor de diGMPc producido por el sistema Wsp y la proteína SadC y en respuesta a ellos actúa como freno del motor flagelar.



## **Análisis preliminar del efector NopL secretado a través del sistema de secreción de tipo III de *Sinorhizobium fredii* HH103**

**I. Jiménez-Guerrero\*, F. Pérez-Montaño, R.A. Bellogín, M.R. Espuny, F.J. López-Baena y F.J. Ollero.**

*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.  
E-mail: ijimgue@us.es*

Muchas bacterias Gram-negativas son capaces de secretar proteínas al medio extracelular a través de diversos sistemas de secreción. Entre estos sistemas se encuentra el sistema de secreción de tipo III (T3SS), presente tanto en bacterias patógenas de animales, bacterias fitopatógenas o en microorganismos simbiotes como los rizobios.

A través del sistema del T3SS estos organismos secretan una serie de proteínas, denominadas efectores, directamente al interior de la célula eucariota ejerciendo en ésta alguna función. En el caso de los rizobios, este sistema además se encuentra relacionado con la determinación del rango de hospedador entre éstos y las leguminosas. De hecho, en *S. fredii* HH103 se observan diferentes fenotipos simbióticos dependiendo de la leguminosa hospedadora. Las proteínas Nop de *S. fredii* HH103 son necesarias para una nodulación eficiente con *Glycine max* (soja).

*Sinorhizobium fredii* HH103 secreta a través del sistema de secreción de tipo III al menos ocho proteínas denominadas Nop: NopA, NopB, NopC, NopD, NopL, NopM, NopP y NopX.

En el presente trabajo se realiza un estudio preliminar del efector NopL secretado por *S. fredii* HH103. Para ello, se construyó un mutante en el gen *nopL* mediante mutagénesis dirigida. La inactivación del gen *nopL* impide la secreción de la proteína NopL pero no afecta a la secreción del resto de proteínas Nop.

La ausencia de la proteína NopL no parece tener ningún efecto significativo en la simbiosis de la estirpe *S. fredii* HH103 con la variedad de soja Williams o con la leguminosa *Sophora tomentosa*. En cambio, la proteína NopL de *S. fredii* HH103 tiene un efecto negativo en la simbiosis con la leguminosa *Cajanus cajan*. Así, la inoculación de plantas de la especie *Cajanus cajan* con el mutante afectado en la secreción de la proteína NopL resultó en un aumento significativo tanto de la masa fresca de nódulos, como de la masa seca aérea respecto a la estirpe parental.

La proteína NopL de *Sinorhizobium fredii* NGR234, estirpe que comparte gran homología con HH103, es fosforilada por proteínas quinasas de la planta, por lo que es posible que este efector esté involucrado en la modulación de la respuesta de defensa de la planta hospedadora. En un futuro próximo se estudiará la respuesta de defensa que se produce en plantas de la especie *C. cajan* al ser inoculadas con estirpes de HH103 afectadas en genes relacionados con el T3SS, entre las que se encuentra aquella afectada en la secreción de la proteína NopL.

## **Identificación de genes que participan en el control del *swarming* de *Sinorhizobium meliloti*: papel en formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis.**

**Lydia M Bernabéu-Roda\*, Carol V Amaya-Gómez, Joaquina Nogales, Cuéllar V, José Olivares, María J Soto**

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, España.*

El *swarming* y la formación de biopelículas son dos fenómenos multicelulares ligados a superficie y estrechamente relacionados cuyas bases moleculares están siendo profusamente investigadas en bacterias patógenas, ya que existen numerosas evidencias que los relacionan con la capacidad infectiva e invasiva de estos microorganismos. Los escasos estudios que se han realizado sobre estos dos fenómenos en bacterias beneficiosas como *Rhizobium* sugieren que, al igual que en bacterias patógenas, componentes que participan en movilidad *swarming* y/o formación de biopelículas pueden ser importantes en la interacción con su hospedador.

En *Sinorhizobium meliloti*, el simbionte habitual de alfalfa, el *swarming* se identificó por primera vez asociado a un mutante en el gen *fadD* que codifica una acil-CoA ligasa específica de ácidos grasos de cadena larga (Soto et al. 2002. Mol. Microbiol. 43:371-382). Con el objetivo de desvelar genes bacterianos importantes en la colonización e invasión de la planta, en este trabajo se ha llevado a cabo la identificación de componentes que participan en el control del *swarming* mostrado por mutantes *fadD* de dos cepas de *S. meliloti*. Tras realizar una mutagénesis generalizada con un transposón se han seleccionado transposantes alterados en *swarming* (defectivos e *hiperswarmers*). La caracterización genética de estos mutantes ha revelado que en *S. meliloti*, el *swarming* dependiente de una mutación en el gen *fadD* requiere la participación de genes flagelares, quimiotaxis, genes de respuesta a estreses ambientales, reguladores de la producción de exopolisacárido, así como genes de función aún desconocida. Aunque todos los mutantes son capaces de establecer simbiosis con plantas de alfalfa, algunos de ellos mostraron defectos en infectividad o competitividad. Hemos realizado un estudio más profundo de algunos de estos mutantes que sugieren que i) una hipermotilidad descontrolada en *S. meliloti* puede causar defectos en infectividad o que ii) la super-producción de succinoglucano o EPSI afecta al *swarming*, formación de biopelículas e infectividad de esta bacteria.

**Sábado, 19 de febrero**

**SESIÓN IV**

**ETIOLOGÍA Y ECOLOGÍA**

(Moderadores: Inmaculada Larena y Marta Martín)

## **Caracterización de las interacciones de *Pseudomonas fluorescens* F113 con invertebrados.**

**M. Rincón, M. Martín, R. Rivilla y M. Sánchez Contreras\*.**

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Email: maria.contreras@uam.es*

Las pseudomonas fluorescentes colonizan de forma eficiente la rizosfera y la filosfera de especies vegetales muy variadas, incluyendo algunos cultivos. La estirpe *P. fluorescens* F113 fue aislada de la rizosfera de remolacha y ha sido utilizada en bioremediación y también en biocontrol frente a hongos fitopatógenos. En el nicho ecológico de la rizosfera, las bacterias están expuestas a la predación por invertebrados bacteriófagos, como las amebas y los nematodos, y probablemente han desarrollado mecanismos para hacer frente a esta presión ecológica. Además, en los genomas de las estirpes de *Pseudomonas fluorescens* secuenciadas (SBW25, Pf0-I y Pf5) se han encontrado homólogos a genes que codifican para proteínas insecticidas. Recientemente se ha demostrado que las estirpes SBW25 y Pf5 causan toxicidad oral en larvas de *Drosophila melanogaster*.

La secuencia del genoma de *P. fluorescens* F113 está casi completa. Como en otras estirpes de *P. fluorescens*, F113 posee homólogos a genes que codifican para proteínas insecticidas en otras bacterias. Por ejemplo genes con homología a los *tc*, que codifican para un complejo de toxinas en la bacteria entomopatógena *Photorhabdus luminescens*. Experimentos preliminares demuestran que F113 es tóxico por ingestión (o repele) el nematodo modelo *Caenorhabditis elegans* y la ameba *Acanthamoeba polyphaga*. Para estudiar la posible acción insecticida, hemos usado larvas del Lepidóptero *Galleria mellonella* (gusano de la cera o la miel). La inyección de F113 en estos gusanos causa mortalidad a las 48 horas. Los experimentos para probar la toxicidad de F113 frente a larvas de *D. melanogaster* están en curso.

La caracterización de acción toxica de F113 frente a insectos y otros invertebrados del suelo y el estudio de los genes responsables puede dar lugar a nuevas aplicaciones biotecnológicas de esta estirpe bacteriana.

## Efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas en las comunidades microbianas del suelo y la rizosfera de aguacate

N. Bonilla\*<sup>1</sup>, B.B. Landa<sup>2</sup>, J.M. Hermoso<sup>3</sup>, J. González<sup>3</sup>, M. Martínez-Alonso<sup>4</sup>, F.M., Cazorla<sup>1</sup>, N. Gaju<sup>4</sup> y A. de Vicente<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, (IHSM-UMA), Facultad de Ciencias, Campus Teatinos, 29071 Málaga.

E-mail: [bonilla@uma.es](mailto:bonilla@uma.es)

<sup>2</sup> IAS Córdoba (CSIC). Finca Alameda del Obispo 14080 Córdoba.

<sup>3</sup> E.E. "La Mayora" (CSIC) 29750 Algarrobo Costa, Málaga.

<sup>4</sup> Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de la UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona.

La aplicación de enmiendas orgánicas es una práctica agrícola muy extendida en el cultivo ecológico del aguacate. La materia orgánica aplicada a pie de árbol contribuye al mantenimiento de los suelos de cultivo y a la salud general de la planta. En el presente trabajo se ha descrito el efecto supresivo de varios tratamientos orgánicos sobre el desarrollo de la podredumbre blanca del aguacate, producida por el hongo *Rosellinia necatrix*. Los suelos modificados utilizados en los ensayos de supresividad se analizaron y compararon en base a sus características físico-químicas, microbiológicas y enzimáticas para determinar los cambios producidos por las enmiendas y su posible relación con el efecto supresivo. El análisis microbiológico de suelo y rizosfera se realizó mediante aislamiento y recuento en placa y mediante PCR-DGGE. Los recuentos de microorganismos cultivables mostraron mayores niveles poblacionales de bacterias heterótrofas, pseudomonas, bacterias aerobias esporuladas y de actinomicetes en varios de los tratamientos, especialmente en los que contenían gallinaza mezclada con otras enmiendas o restos de jardinería compostados. Los perfiles obtenidos mediante PCR-DGGE mostraron variaciones tanto en la complejidad como en la composición de las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera dependiendo del tratamiento orgánico aplicado. Sin embargo, cambios más pronunciados en la diversidad no se relacionaron con un mayor efecto supresivo. Actualmente se está llevando a cabo la secuenciación de las bandas diferenciales de los perfiles de DGGE para determinar las poblaciones puntuales afectadas por los distintos tratamientos. La diversidad metabólica de las comunidades microbianas se analizó utilizando Biolog Ecoplates<sup>TM</sup>, que revelaron fuertes cambios en los perfiles metabólicos de algunos de los suelos supresivos. Otras actividades enzimáticas en suelos y rizosfera se detectaron mediante el sistema API-ZYM. Los resultados mostraron mayor diversidad enzimática en la mayoría de suelos tratados que en el control, destacando la presencia de algunas actividades hidrolíticas de especial interés en algunos de los tratamientos supresivos.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el efecto supresivo de las enmiendas no está relacionado con cambios masivos en las comunidades microbianas de los suelos, y que es más probable que el efecto se deba a cambios puntuales en poblaciones microbianas clave o bien en las actividades enzimáticas llevadas a cabo por la comunidad microbiana.

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional I+D+I del MCI (AGL08-5453-C02-01) cofinanciado con fondos FEDER (EU) y el Plan Estratégico BIOÁNDALUS, CICE-Junta de Andalucía (BIOÁNDALUS 08/1/11.1).

## **Electrotransformación de *Podosphaera fusca*, hongo biotrofo obligado y agente etiológico del oídio de las cucurbitáceas**

**D. Vela\*, A. de Vicente y A. Pérez-García**

*Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA)*  
*E-mail: dvela@uma.es*

Los oídios (Erysiphales) son probablemente el grupo más numeroso de patógenos de plantas que permanecen sin caracterizar desde el punto de genético y molecular. Su estilo de vida como parásitos biotrofos obligados y la consiguiente incapacidad de crecer en medios de cultivo ha dificultado considerablemente su investigación. El control eficaz de las enfermedades requiere un buen conocimiento de la biología del agente patógeno. Otra cuestión sin resolver y tecnológicamente muy importante es su manipulación genética. Desde los primeros informes de transformación de hongos filamentosos modelo, como *Neurospora crassa* y *Emericella nidulans*, muchas especies de hongos importantes desde el punto de vista comercial y agrícola se han transformado con éxito. Sin embargo, los hongos biotrofos se han mostrado recalcitrantes a este proceso. Los métodos más comunes, como la fusión de protoplastos y la transformación mediada por *Agrobacterium*, no son adecuados para tales organismos. De hecho, el bombardeo de partículas ha sido el único método válido para transformar este tipo de parásitos, si bien esta técnica ha demostrado carecer de reproducibilidad. En este trabajo presentamos los avances en el desarrollo de un protocolo de transformación fiable y estable para *Podosphaera fusca*, agente causal del oídio de cucurbitáceas, mediante el método de transformación más versátil, la electrotransformación. Se han utilizado diversos marcadores de selección como el gen de resistencia a higromicina B (*hph*) y el gen de la proteína verde fluorescente (*egfp*), bajo el control de los promotores de los genes *trpC* y *gpd* de *E. nidulans*, respectivamente. Junto a estos, se usó el alelo del gen  $\beta$ -tubulina de *P. fusca*, portador de la mutación que confiere resistencia a carbendazima, para construir un plásmido que permite una selección alternativa al uso de higromicina B. Se obtuvieron transformantes con la mayoría de las construcciones utilizadas. En condiciones selectivas, los transformantes resistentes a higromicina B mostraron un crecimiento muy lento, así como una débil señal GFP de las hifas fluorescentes. Aún no se han obtenido transformantes con la construcción portadora del gen de resistencia a carbendazima. Sin embargo, este método promete ser de mayor eficacia que el método de selección mediante resistencia a higromicina B puesto que la presencia de este alelo no conlleva un coste sobre la capacidad de crecimiento de los aislados que lo poseen. En todos los casos se detectaron secuencias de los marcadores mediante PCR y se encontraron copias de los plásmidos transformantes integrados en el genoma del hongo. Hasta el momento, este es el primer caso de transformación genética de un hongo biotrofo obligado por electroporación de conidios.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-65340-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU). David Vela agradece al MICINN la concesión de una beca FPI.

## RESISTENCIA DE *Monilinia spp.* EN HUERTOS DE MELOCOTONERO DEL VALLE DEL EBRO

B. Egüen\*, P. Melgarejo y A. De Cal

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de la Coruña km. 7,5 28040 Madrid. España.

La podredumbre parda de los frutales de hueso es la enfermedad causada por *Monilinia spp.* que ocasiona importantes pérdidas en el cultivo. *Monilinia laxa* y *Monilinia fructigena* eran las especies causantes de la enfermedad en España hasta el año 2006 que apareció una tercera especie, *Monilinia fructicola*, en el Valle del Ebro. *M. fructicola* presenta un alto potencial de desarrollo de resistencia a bencimidazoles, dicarboximidas y triazoles, donde esta especie está establecida desde hace muchos años. Sin embargo, ningún aislado resistente de *M. laxa* o *M. fructigena* se había observado en España hasta 2006.

El objetivo de este trabajo es estudiar la resistencia a bencimidazoles (metiltiofanato), dicarboximidas (iprodiona) y triazoles (ciproconazol) de los aislados de *Monilinia spp.* encontrados en 2006 y 2007. Se caracterizan 389 y 243 aislados de *Monilinia spp.* procedentes de huertos del Valle del Ebro en distintas fases del ciclo de cultivo en los años 2006 y 2007 respectivamente. En el año 2006 se caracterizaron 324 aislados de *M. laxa*, 1 de *M. fructigena* y 64 de *M. fructicola*, mientras que en el 2007 fueron 200 aislados de *M. fructicola* y 43 de *M. laxa*. Las dosis discriminatorias entre aislados resistentes y sensibles para bencimidazoles (metiltiofanato), dicarboximidas (iprodiona) y triazoles (ciproconazol) fueron: 2-6 mg/l, 5 mg/l y 0,3 mg/l en agar patata dextrosa respectivamente.

Los aislados de *M. fructicola* recogidos en 2006 y 2007 en el Valle del Ebro presentan un alto grado de resistencia a metiltiofanato a dosis 6 mg/l (con un crecimiento relativo superior al 90%), mientras que sólo algunos aislados de *M. laxa* presenta resistencia a este fungicida. Por otra parte, el porcentaje de aislados resistentes a iprodiona de *M. laxa* y *M. fructicola* es menor, con niveles de crecimiento relativo muy similares en ambas especies. El único aislado de *M. fructigena* en este ensayo se mostró resistencia a metiltiofanato y susceptibilidad a iprodiona. No se registra crecimiento significativo sobre ciproconazol a dosis de 0,3 mg/l en ninguna de las tres especies. Se discuten las posibles consecuencias para el control de la enfermedad de la alta resistencia mostrada por los aislados de *M. fructicola* y la aparición por primera vez de aislados resistentes de *M. laxa* a bencimidazoles y dicarboximidas en España.

## Resistencia a fungicidas en *Podosphaera fusca* en el sur de España

D. Bellón<sup>1\*</sup>, J.M. Sánchez-Pulido<sup>1</sup>, C. Jousseume<sup>2</sup>, A. Pérez-García<sup>3</sup> y J.A. Torés<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-CSIC)

<sup>2</sup>Dow AgroSciences Ibérica S.A.

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Facultad de Ciencias

E-mail: [davinia@eelm.csic.es](mailto:davinia@eelm.csic.es)

El oídio de las cucurbitáceas, *Podosphaera fusca*, es uno de los principales problemas que afectan a estos cultivos en todo el mundo. Como la mayoría de los oídios, *P. fusca* es un ectoparásito, lo que favorece el uso de fungicidas como principal estrategia de control. Desgraciadamente, el empleo excesivo de fungicidas conlleva el importante problema de desarrollo de resistencias, especialmente frente a productos con dianas muy específicas. En trabajos previos de nuestro grupo se describieron importantes niveles de resistencia a fungicidas QoI (inhibidores de la respiración) y DMI (inhibidores de la síntesis ergosterol), los fungicidas más comúnmente empleados contra el oídio de las cucurbitáceas, en diferentes localizaciones del sur de España. Para explorar la eficacia de otras materias activas autorizadas, en este estudio tratamos de determinar posibles cambios en la sensibilidad a fungicidas tales como quinoxifén (inhibidor de transducción de señales), bupirimato (inhibidor de síntesis de ácidos nucleicos) y metil-tiofanato (inhibidor de la división celular) en las poblaciones de *P. fusca*. Para ello se seleccionó una colección de aislados de *P. fusca* entre dos grupos de aislados. El primer grupo estaba formado por una serie de aislados obtenidos en las campañas 2002-2004, previamente caracterizados por su sensibilidad a QoI y DMI, y mantenidos congelados en nuestro laboratorio. El segundo grupo comprendía aislados obtenidos en el año 2009 de cultivos tratados repetidamente con quinoxifén. Utilizando la técnica de discos de cotiledón, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los fungicidas mencionados anteriormente, quinoxifén, bupirimato y metil-tiofanato. Para el quinoxifén los valores de CMI oscilaron entre 1-20 µg/ml en ambos grupos de aislados. Para el bupirimato y metil-tiofanato, las CMI variaron entre 10 y 1000 µg/ml, diferenciándose claramente dos grupos de aislados, los sensibles y los resistentes a esta materia activa. Para metil-tiofanato, la mayoría de aislados eran resistentes ya que mostraron una CMI de 1000 µg/ml. Los datos obtenidos sugieren que el uso de metil-tiofanato para el control de oídio de cucurbitáceas en España debería reconsiderarse. Por el contrario, quinoxifén puede ser una buena herramienta para el control de esta enfermedad y bupirimato debe usarse con precaución ya que se observa un aumento preocupante de la resistencia a este fungicida en las poblaciones del patógeno. Además se han iniciado trabajos de para establecer el coste biológico de la resistencia a fungicidas en *P. fusca*. Los primeros estudios se están llevando a cabo con una colección de cepas sensibles y resistentes a DMI, evaluando a distintas temperaturas parámetros como porcentaje de germinación de conidios y número de tubos germinativos. Los resultados obtenidos hasta la fecha apuntan a la existencia de un coste biológico asociado a la resistencia a DMI en *P. fusca*. Estos estudios proporcionarán información relevante que podría ser usada para el diseño racional de estrategias de anti-resistencia en *P. fusca*.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-65340-C02-02), cofinanciado con fondos FEDER (EU) y Dow AgroSciences Ibérica. Davinia Bellón agradece al MICINN la concesión de una beca FPI.



## **El plásmido pEPIR37 de *Erwinia piriflorinigrans*: comparación de genes de interés con los de otras *Erwinia* spp. y utilización para su identificación específica.**

**S. Barbé\*, J. Cabrefiga, M.M. López y P. Llop**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera km 4,5. 46113, Moncada. Valencia, España.*

*E-mail: [barbe\\_sil@gva.es](mailto:barbe_sil@gva.es)*

*Erwinia piriflorinigrans* es una nueva especie bacteriana del género *Erwinia* que se ha aislado recientemente en Valencia. Produce una sintomatología muy similar a la del fuego bacteriano causado por *E. amylovora*, necrosando las flores de peral, pero sin progresar a otras partes de la planta. Se ha estudiado el contenido plasmídico de esta nueva especie y se ha observado que contiene un plásmido denominado pEPIR37 de 37 Kb, similar a otro plásmido de 29 Kb presente en la mayoría de cepas de *E. amylovora* y que está relacionado con el aumento de la virulencia de las mismas. La hibridación entre ambos plásmidos reveló la presencia de secuencias similares, lo que llevó a su anotación y a la comparación con los de otras especies cercanas previamente descritas como *E. pyrifoliae* (patógena de peral) y *E. tasmaniensis* y *E. billingiae* (no patógenas), observándose una gran similitud en sus secuencias, y en el caso del pEPIR37, un papel en virulencia observado en fruto inmaduro.

Además, los genes implicados en la biosíntesis de tiamina, asociados a la formación de amilovorano (demostrado factor de patogenicidad en *E. amylova*) y levano (factor de virulencia) y el gen *msrA* (gen relacionado con el estrés oxidativo), se han analizado a nivel de secuencias proteicas, y se ha observado que muestran una elevada similitud en los plásmidos descritos en las especies de *Erwinia* patógenas de frutales de pepita y en el ADN cromosómico de las no patógenas.

Dada la semejanza en los síntomas producidos por las especies de *Erwinia* patógenas y no patógenas del peral y la existencia de ciertas características bioquímicas y fenotípicas comunes, y su homología a nivel molecular y genético, se han diseñado unos iniciadores específicos para amplificar mediante PCR una región del plásmido pEPIR37 presente en todas las cepas aisladas de *E. piriflorinigrans*, para poder diferenciar esta nueva especie de otras del mismo género.

## **La Malformación del Mango: una nueva enfermedad en España.**

**M. Crespo-Palomo\*, F.M. Cazorla, J.M. Hermoso, E. Guirado, E. Arrebola, J.A. Torés y A. de Vicente**

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071, Málaga. E.E. “La Mayora” (CSIC), 29750 Algarrobo Costa, Málaga.*

Una de las enfermedades más destructivas y con mayor distribución mundial que afectan al mango es la malformación. Esta enfermedad afecta a brotes vegetativos y florales, los cuales muestran reducción de los entrenudos con hojas pequeñas y enrolladas, y exceso de ramificaciones y acortamiento de los ejes respectivamente; impidiéndose el desarrollo normal de la panícula floral con la consecuente pérdida de fruto.

La malformación fue descrita por primera vez en la India hace más de un siglo, pero todavía numerosos aspectos sobre la dinámica de infección y el número de especies implicadas están por resolver. Hasta el momento al menos cuatro especies del género *Fusarium* han sido asociadas con la malformación: *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. proliferatum* y *F. mexicanum*. La identificación de estas especies de hongos se ha basado en características morfológicas, culturales y moleculares.

Desde el 2006 se han observado esporádicamente árboles con síntomas de esta enfermedad en plantaciones de mango del sur de la península. En los años 2009 y 2010 se han llevado a cabo prospecciones en fincas con síntomas de malformación de la Axarquía (Málaga). El aislamiento y el cultivo en PDA y FCLA del hongo, el estudio morfológico de estructuras de reproducción asexual, así como análisis por PCR utilizando cebadores específicos para *F. mangiferae* y para *F. sterilihyphosum*, que amplifican fragmentos de 608 pb y 445 pb, respectivamente, se han utilizado para confirmar la presencia de *F. mangiferae* en plantas de mango con síntomas (aproximadamente la mitad), junto con al menos una segunda especie de *Fusarium*. Se están realizando inoculaciones experimentales para cumplimentar los postulados de Koch y determinar la patogenicidad de estos aislados de *Fusarium* asociados a la malformación en España. Asimismo, se están iniciando trabajos para estudiar la diversidad genética y biológica de las poblaciones de *Fusarium* aisladas de mango, mediante análisis MLSTs (genes CYP51, ITS,  $\alpha$  tubulina y factor de elongación 1 $\alpha$ ) y de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs).

Este trabajo ha sido financiado por la CICE-Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia P07-AGR-02471, cofinanciado por fondos FEDER (EU); así como por la SAT-2803 TROPS.

## Enfermedades emergentes en el cultivo de plantas de fresa de vivero

C. Redondo, M. Villarino, P. Melgarejo y A. De Cal\*.

*Departamento de Protección Vegetal. INIA. Madrid.*

*E-mail: [cal@inia.es](mailto:cal@inia.es)*

Las plantas de fresa de vivero es un cultivo de gran importancia en España que requiere producciones libres de patógenos. Los viveros de altura, situados principalmente en Castilla-León producen planta que posteriormente se comercializan en las zonas productoras de fruta del sur de España o se exportan a países de la Unión Europea, donde son trasplantadas. Se producen anualmente más de 643 millones de plantas en una extensión de 1,100 ha. La aplicación de bromuro de metilo al suelo mantenían las plantas libres de patógenos del suelo, en especial *Phytophthora cactorum* y *Verticillium* spp., causantes de la marchitez y la podredumbre de cuello, las dos enfermedades más importantes en los viveros de altura.

El uso de bromuro de metilo fue prohibido en Europa desde 2005, aunque se mantuvo en los viveros de fresa como “usos críticos” hasta 2007. Desde esta fecha, este producto ha sido sustituido por aplicaciones de distintas combinaciones de cloropicrina, dicloropropeno, dazomet y metamsodio. También desde esta fecha se ha ido observando una mayor frecuencia de plantas enfermas donde no se aislaban ninguno de los dos patógenos mayoritarios, sino especies del género *Fusarium*, especie esporádicamente patógena cuando se usaba bromuro de metilo. Ante esta nueva situación, los viveristas de la zona están preocupados por las pérdidas potenciales que una enfermedad emergente pueda causar.

Se han realizado ensayos, durante los últimos cinco años, para conocer la evolución de la población del género *Fusarium* en el suelo antes y después de la fumigación con bromuro de metilo y los productos alternativos, en dos viveros comerciales situados en Segovia (Navalmanzano) y Avila (Arevalo). Cada ensayo se establecía con un diseño de bloques al azar, con cuatro repeticiones por bloque. El tamaño de cada parcela de tratamiento era de 400 m<sup>2</sup> (5.5 x 72). Tres semanas después de los tratamientos (finales de Abril) se plantaban plantas madre de fresa cv. ‘Camarosa’ procedentes de viveros de la Universidad de California (USA) y se cosechaban a primeros de Octubre de cada año. Se plantaban dos filas de 115 plantas por parcela. Se evaluó la incidencia de la enfermedad de las plantas de fresa que crecieron en las parcelas descritas anteriormente, aislándose e identificándose los hongos patógenos desde el tejido enfermo de las plantas. Los aislados de *Fusarium* fueron trasladados a cultivos puros sobre medio de cultivo y comprobada su patogenicidad sobre plantas de fresa cv. ‘Candongá’ en ensayos *in vivo*.

Se ha observado un incremento de la población fúngica de *Fusarium* en el suelo, especialmente en las parcelas que no habían sido tratadas con bromuro de metilo. Por otra parte también se ha observado un aumento de plantas enfermas desde las que se aisla *Fusarium*. Tres de estos aislados de *Fusarium* han demostrado su patogeneidad en plantas de fresa en ensayos *in vivo*.

## **Análisis de diversidad intraespecífica de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ¿un nuevo biotipo asociado al cultivo del mango?**

**J.A. Gutiérrez-Barranquero<sup>1\*</sup>, V.J. Carrión<sup>1</sup>, F.M. Cazorla<sup>1</sup>, D.L. Arnold<sup>3</sup>, J. Murillo<sup>2</sup> y A. de Vicente<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, (IHSM-UMA), Facultad de Ciencias, Campus Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: jagutierrez@uma.es.

<sup>2</sup> Laboratorio de Patología Vegetal, ETSIA, Universidad Pública de Navarra. 31006-Pamplona.

<sup>3</sup> CRIPS, University of the West of England, Bristol BS16 1QY, UK.

La necrosis apical del mango (NAM), principal enfermedad limitante del cultivo del mango en el área mediterránea está producida por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss). Un estudio epidemiológico sobre 120 cepas representativas de Pss ha sido llevado a cabo para establecer el origen y distribución de este patógeno bacteriano. Estudios de AP-PCR (arbitrarily primed) con 4 sets de cebadores diferentes (ERIC1-ERIC2, BOXA1R, GTG-5 and CAG-5), han revelado diferencias intraespecíficas a diferentes niveles. Un subgrupo de 60 cepas fue utilizado para profundizar más en aspectos epidemiológicos mediante la técnica de RAPD-PCR con 3 cebadores diferentes. Los resultados obtenidos mostraron un patrón similar a los obtenidos con AP-PCR. Las cepas de Pss aisladas de mango se agrupan principalmente dependiendo de la zona de aislamiento. Además, se ha llevado a cabo el estudio de secuencias multilocus (MLST), para comparar la posible relación entre la filogenia y distribución de estas cepas, generando diferentes grupos en función de la producción de mangotoxina. Dos genes housekeeping (*gyrB* y *rpoD*) fueron seleccionados para este propósito. En este estudio, también hemos analizado la variabilidad fenotípica de Pss mediante diferentes aproximaciones: ensayos de resistencia a antibióticos, ensayos de resistencia cobre, capacidad de crecer en diferentes fuentes de carbono (Biolog GN2), ensayos de virulencia en hojas de tomate *in vitro* e hibridaciones específicas mediante dot-blot y también bioensayos para determinar la producción de las principales toxinas antimetabolito: mangotoxina, faseolotoxina, coronatina y tabtoxina. Los genes de resistencia cobre presentan diferencias entre los diferentes aislados y se localizan principalmente en plásmidos nativos, sobre todo en los plásmidos de 62 Kb, que presentan secuencias homólogas al operón *copABCD* descrito previamente para otras bacterias fitopatógenas. Para intentar conocer el origen de estos genes y corroborar la hipótesis de que la adquisición de los mismos proviene de diversas fuentes debido a la variabilidad encontrada, se ha llevado a cabo el estudio del gen *repA* (gen de la replicasa de los plásmidos PFP's), sugiriendo los resultados obtenidos el posible origen común de los plásmidos de 62 Kb. Estos resultados, junto con otros previos obtenidos en nuestro grupo, sugieren la presencia de un nuevo biotipo de Pss específico asociado al cultivo del mango.

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

## PARTICIPANTES

Aragón Cortés, Isabel María  
 Arrebola Díez, Eva  
 Barbé, Martínez, Silvia  
 Bardaji Goikoetxea, Leire  
 Barón Ayala, Matilde  
 Bellón Gómez, Davinia  
 Bernabéu-Roda, Lydia María  
 Bonilla Ruiz, Nuria  
 Cal y Cortina, M<sup>a</sup> Antonieta de  
 Cambra Álvarez, Mariano  
 Cárdenas de Nó, Inés de  
 Castañeda Ojeda, M<sup>a</sup> del Pilar  
 Castillo Lizardo, Melissa Gissel  
 Cazorla López, Francisco Manuel  
 Codina Escobar, Juan Carlos  
 Crespo Gómez, José Ignacio  
 Crespo Palomo, María  
 Cubero Dabrio, Jaime  
 Domínguez Hernández, Sara  
 Egüen Recuenco, Beatriz  
 Escaño Calderón, Claudia  
 García Gutiérrez, Laura  
 Garita Cambrero, Jerson  
 Gutiérrez Barranquero, José Antonio  
 Jiménez Guerrero, Irene  
 Larena Nistal, M<sup>a</sup> Inmaculada  
 Linares Rueda, Irene  
 López González, M<sup>a</sup> Milagros  
 López Solanilla, Emilia  
 Lucía Quintana, Ainhoa  
 Martín Basanta, Marta  
 Matas Casado, Isabel María  
 Muñoz Muñoz, María  
 Murillo Martínez, Jesús  
 Penyalver Navarro, Ramón  
 Pérez García, Alejandro  
 Pérez Mendoza, Daniel  
 Pérez Montaña, Francisco  
 Pozo, M<sup>a</sup> José  
 Ramos Rodriguez, Cayo  
 Río Álvarez, Isabel del  
 Rivilla Palma, Rafael  
 Rodríguez Palenzuela, Pablo  
 Rubio Pérez, M<sup>a</sup> Belén  
 Rufián Plaza, José Sebastián  
 Sánchez Contreras, María  
 Sena Vélez, Marta  
 Vázquez García, Gema  
 Vela Corcía, David  
 Vicente Moreno, Antonio de  
 Vila Tierno, Carmen  
 Zeriouh, Houda  
 Zumaquero Jiménez, Adela

## CENTRO

UMA  
 CSIC-Mayora  
 IVIA  
 UPNA  
 CSIC-Zaidín  
 CSIC-Mayora  
 CSIC-Zaidín  
 UMA  
 INIA  
 IVIA  
 UPNA  
 UMA  
 UMA  
 UMA  
 UMA  
 UMA  
 INIA  
 USAL  
 INIA  
 UMA  
 UMA  
 INIA  
 UMA  
 USE  
 SGIT-INIA  
 UMA  
 IVIA  
 CBGP  
 UMA  
 UAM  
 UMA  
 UMA  
 UPNA  
 IVIA  
 UMA  
 CSIC-Zaidín  
 USE  
 CSIC-Zaidín  
 UMA  
 CBGP  
 UAM  
 CBGP  
 USAL  
 UMA  
 UAM  
 INIA  
 INIA  
 UMA  
 UMA  
 UMA  
 UMA