

Actualidad



SEM

Microbiología de Plantas

Número 47

Junio 2009

Presentación

En nombre del Comité Organizador, me resulta especialmente grato invitar a los miembros de la Sociedad Española de Microbiología y, en general, a todas las personas que en España mantienen vínculos con esta disciplina, a esta vigésima segunda edición del Congreso Nacional de Microbiología, en la que se pretende propiciar un encuentro único entre los investigadores relacionados con esta apasionante ciencia. El congreso está abierto a todos, desde investigadores consolidados a jóvenes investigadores, por lo que cabe esperar un enriquecimiento científico generalizado. En esta ocasión, el congreso se celebra en Almería, ciudad tranquila en la que el entorno invita a crear ese clima sosegado que tan adecuado resulta para promover el intercambio de ideas. Además, en Almería se concitan parajes de extraordinaria belleza y un estilo de vida que sorprende por su sencillez y por la tranquilidad que ofrece al forastero. Sus gentes, nobles, afables, demuestran en cada gesto un carácter emprendedor inaudito; no en vano, han sido capaces de plantar en el desierto la mayor huerta de Europa. El Comité Científico ha elaborado un programa de sesiones que pretende cubrir, la mayor parte de las demandas presentadas por los investigadores del sector, combinando ponencias de primer nivel con coloquios destinados a la discusión de las comunicaciones presentadas por los distintos grupos del país. Como complemento, hay que indicar que el congreso pretende ofrecer además, momentos de esparcimiento en los que la rica gastronomía local habrá de ocupar un lugar destacado. En definitiva, os invitamos a disfrutar plenamente de esta nueva edición del Congreso Nacional de Microbiología, tanto en su vertiente científica como lúdica, en la esperanza de que al marchar, os llevéis un recuerdo imborrable de estos días.

Joaquín Moreno
Comité Organizador



Organización

Sociedad Española de Microbiología

Área de Microbiología del Departamento
de Biología Aplicada de la Universidad de Almería

Comité Organizador:

Joaquín Moreno Casco
M^a del Carmen Vargas García
M^a José López López
Francisca Suárez Estrella
José Antonio Pascual Valero
Gema M^a Guisado Úbeda
Eva M^a Fernández Orts

Fechas importantes

Plazo de inscripción (con cuota reducida): 31 de mayo de 2009. Después de esta fecha, se admitirán inscripciones hasta el 10 de septiembre de 2009.

Plazo para la remisión de Resúmenes: 15 de junio de 2009. No se admitirán resúmenes después de esta fecha.

Plazo para la remisión de candidaturas al XIII Premio Bienal 'Jaime Ferrán': 15 de marzo de 2009.

Plazo para el envío de fotografías para optar al IV Premio de Fotografía en Microbiología 'Federico Uruburu': 21 de septiembre de 2009.

Secretaría del Congreso

Dirección Postal

Departamento de Biología Aplicada
Área de Microbiología
Universidad de Almería
La Cañada de San Urbano
04120 Almería

Teléfonos de contacto

950 015 027
950 015 890
950 015 891
950 015 892

Fax

950 015 476

e-mail

CongresoSEM2009@ual.es

Web

<http://www.ual.es/Congresos/SEM2009/>

Líneas Temáticas

- Biodegradación y biodeterioro.
- Microbiología clínica.
- Microbiología de los alimentos.
- Microbiología de plantas.
- Microbiología del medio acuático.
- Microbiología industrial.
- Microbiología ambiental.
- Microbiología molecular.
- Hongos filamentosos y levaduras.
- Protistología.
- Taxonomía, filogenia y biodiversidad.
- Virología
- Otras

Cuotas

	Antes del 31/05/09	Después del 31/05/09
Socio de la SEM	280 €	350 €
No socio de la SEM	360 €	450 €
Joven investigador socio de la SEM	230 €	288 €
Joven investigador no socio de la SEM	310 €	388 €
Acompañante	180 €	225 €

Patrocinadores



Alojamiento

La agencia de viajes oficial del congreso es 'Viajes El Corte Inglés'. Para cualquier solicitud de información relacionada con el alojamiento, se puede contactar con D^a. Susana Morales en la dirección sevillacongresos1@viajeseci.es

Puedes descargar el Formulario de Alojamiento que se encuentra en la página web del congreso: <http://www.ual.es/Congresos/SEM2009>

VIAJES
El Corte Inglés



Crisis y microbiología	por Ricardo Guerrero	1
Informes de los grupos		2
Tesis Doctorales		4
Sergio Sánchez Prieto, Ana Abel Souto, Clara Beatriz García Calderón, Victoria Garrido, Raquel Conde Álvarez, Ana Domínguez Ferreras, María Ángeles González Sánchez, Roxana Beaz Hidalgo		4
Socios que deben actualizar datos		7
Reseñas de cursos		8
VII Workshop Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria		8
Nuevos socios de la SEM		18
Informe CECT 2008	por Esperanza Garay	19
Reseñas de congresos		27
II Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana (Barcelona, 2008)		27
Premio Federico Uruburu		33

Número Especial Microbiología de Plantas:

- **El Grupo Especializado de Microbiología de Plantas** por Jesús Murillo y Antonio de Vicente (pág. 10)
- **Pseudomonas syringae pv tomato DC3000 y Dickeya dadantii 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas** por Emilia López Solanilla y Pablo Rodríguez Palenzuela (pág. 14)
- **Bacterias fitopatógenas, ¿es posible su prevención?** por Ramón Peñalver, Pablo Llop, Ester Marco-Noales y María Milagros López (pág. 20)
- **El oídio de las cucurbitáceas, Podosphaera fusca** por Alejandro Pérez García (pág. 28)
- **Desatando nudos: la tuberculosis del olivo** por Cayo Ramos (pág. 34)

La Sociedad Española de Microbiología quiere hacer partícipe a sus socios del fallecimiento el pasado 15 de noviembre de 2008 de D. Francisco Soria Melguizo, fundador y Presidente de Francisco Soria Melguizo SA, el primer socio colaborador de la SEM, agradeciendo su apoyo durante todos estos años.

VISITE LA PÁGINA WEB DE LA SEM: www.semico.es

Encontrará información actualizada sobre congresos, reuniones, cursos y becas.

Junta Directiva de la SEM

Presidente

Ricard Guerrero.

Dpto. Microbiología. Facultad de Biología.
Universidad de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645.
08028 Barcelona. rguerrero@iec.cat

Vice-Presidente

Ernesto García.

Dpto. Microbiología Molecular.
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
e.garcia@cib.csic.es

Secretario

Humberto Martín Brieva.

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. 28040 Madrid.
humberto@farm.ucm.es

Tesorerera

Irma Marín Palma.

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid
Cantoblanco, 28049 Madrid. imarin@cbm.uam.es

Editores de publicaciones

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY

Jordi Mas Castellà.

Fundació Catalana per a la Recerca i la Innovació.
Paseo de Lluís Companys, 23. 08010 Barcelona.
jordi.mas25@gmail.com

Actualidad SEM

Federico Navarro García.

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. 28040 Madrid.
fnavarro@farm.ucm.es

NoticiaSEM:

Rafael Giraldo Suárez.

Dpto. Microbiología Molecular Centro de
Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
rgiraldo@cib.csic.es

Directora de la Colección Española de Cultivos Tipo

Esperanza Garay.

Dpto. Microbiología y Ecología.
Edificio de Investigación. C/ Doctor Moliner, 50.
46100 Burjassot (Valencia)
esperanza.garay@uv.es

Vocales

Jordi Barbé.

Dpto. Genética y Microbiología.
Facultad de Biociencias.
Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra,
08290 - Barcelona. Jordi.Barbe@uab.cat

Rafael Giraldo Suárez.

Dpto. Microbiología Molecular
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
rgiraldo@cib.csic.es

Jesús López Romalde.

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia. 15706 Santiago de Compostela.
(A Coruña). mpromald@usc.es

Emilia Quesada Arroquia.

Departamento de Microbiología.
Facultad de Farmacia. Campus de Cartuja,
18071 Granada.
equesada@ugr.es

Ferran Ribas Soler.

Carretera de Capsec, 4.
17133 La Vall de Bianya, Girona.
feribsol@hotmail.com

Antonio Ventosa Utero.

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
C/Prof. García González, 2. 41012 Sevilla.
ventosa@us.es

Presidentes de Grupos

Biodeterioro y Biodegradación

Diego A. Moreno.

Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales.
ETS Ingenieros Industriales.
Universidad Politécnica de Madrid.
C/José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.
diego.moreno@upm.es

Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Amparo Querol.

Departamento de Biotecnología de los Alimentos
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.-
46100 Burjassot, Valencia
aquerol@iata.csic.es

Microbiología Clínica

Ernesto García.

Dpto. Microbiología Molecular.
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
e.garcia@cib.csic.es

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Tomás González Villa.

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia.
15782 Santiago de Compostela.
mpvilla@usc.es

Microbiología de los Alimentos

Francisco Javier Carballo García.

Área de Tecnología de los Alimentos.
Facultad de Ciencias de Ourense.
Campus Universitario, s/n. Universidad de Vigo.
32004 Vigo.
carbatec@uvigo.es

Microbiología Molecular

Juan M^a García Lobo.

Dpto. Biología Molecular.
Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria.
C/Cardenal Herrera Oría s/n.
39011 Santander.
jmglobo@unican.es

Microbiología del Medio Acuático

Albert Bosch.

Dpto. Microbiología. Facultad de Biología.
Universidad Central.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.
abosch@ub.edu

Microbiología de Plantas

Jesús Murillo Martínez.

Dpto. Producción Agraria. ETSI Agrónomos.
Universidad Pública de Navarra.
31006 Pamplona.
jesus.murillo@unavarra.es

Protistología

Aurelio Serrano Delgado.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.
CSIC-Universidad de Sevilla.
Avda. Américo Vespucio, 49. 41092 Sevilla.
aurelio@ibvf.csic.es

Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad

Jorge Lalucat Jo.

Dpto. Biología. Área de Microbiología.
Universidad de les Illes Balears.
Ctra. Valldeusa, Km. 7,5.
07071 Palma de Mallorca.
jlalucat@uib.es

Actualidad SEM es una publicación semestral
de la **Sociedad Española de Microbiología (SEM)**

Director : Federico Navarro-García. **E-mail**: fnavarro@farm.ucm.es
Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Universidad Complutense. 28040 Madrid.
La SEM y el Director no comparten necesariamente las opiniones que puedan aparecer en artículos, informaciones o cartas enviados por los socios, ni se responsabilizan de su veracidad.

ISSN: 1888-5500.

Depósito Legal: 36180-1986.

www.semico.es/ActualidadSEM.htm

Crisis y microbiología

En el lenguaje médico, se llama crisis a cualquier cambio brusco en el curso de una enfermedad aguda o de una infección, a una exaltación repentina de un fenómeno típico de una enfermedad crónica, o a un ataque paroxístico de dolor, o de alteración de alguna función. La vida en la Tierra no es una enfermedad, sino un enriquecimiento fisicoquímico de la materia que ofrecieron originalmente nuestro planeta y los dos planetas hermanos, Venus y Marte, pero que sólo se desarrolló y permaneció aquí. A lo largo de la historia de la vida ha habido muchas crisis ambientales y, como consecuencia, gran número de especies han ido desapareciendo. Sólo en el eón Fanerozoico, es decir, desde hace aproximadamente 540 millones de años, se han producido cinco grandes extinciones, que han borrado de la faz de la Tierra grupos taxonómicos enteros. Pero otros han conseguido adaptarse a las nuevas condiciones y han medrado en los nuevos ambientes, lo que ha determinado un aumento constante de la biodiversidad. Hasta ahora. El curso de la evolución ha hecho que los humanos hayan llegado a dominar su entorno de tal manera que el crecimiento de su población y el aumento constante de su requerimiento de energía exosomática hacen que su entorno se vaya empobreciendo constantemente, tanto en lo que respecta a la disponibilidad energética, como en lo que atañe a la panoplia de organismos que comparten el hábitat con nosotros.

Dentro de la complejidad que supone la organización de las sociedades humanas, aparecen nuevos factores de crisis, no relacionados con la energía ni con la biodiversidad. Desde hace unos pocos meses una, desde hace unos pocos días otra, hemos presenciado el advenimiento de dos nuevas crisis que han acaparado la atención mundial. Una es la crisis económica; otra, la amenaza de una pandemia vírica. Ni las crisis económicas ni las enfermedades infecciosas son desconocidas para los humanos, y esos dos fenómenos han sido frecuentes a lo largo de la historia, y han modificado su curso. Pero ahora es distinto. La enorme capacidad y facilidad de comunicación de nuestra sociedad hace que tengamos noticia inmediata de sucesos que acontecen en el otro extremo del globo, y que seamos capaces de responder también casi de inmediato. Pero no es lo mismo responder a una crisis económica, que a una amenaza microbiana. El primer tipo de crisis depende de factores complejos y en los que intervienen en gran manera la ignorancia, la imprudencia y la avaricia humanas —“enfermedades” contra las cuales no hay vacunas—. El segundo es un fenómeno biológico, sobre el cual tenemos experiencia y que puede ser combatido eficazmente con las armas que ha desarrollado la Microbiología en sus escasos 150 años de existencia.

Los virus son microorganismos patógenos que deben matar o debilitar células para reproducirse. No pueden mantenerse en cultivos axénicos. Son la causa de multitud de enfermedades de los humanos y otros animales y de las plantas y microorganismos. Ninguno de los organismos estudiados con profundidad está libre del ataque de virus específicos. Pero los virus también pueden transportar material genético de unas especies a otras y dentro de la misma especie, como es el caso de las transducción en bacterias, que es uno de los principales mecanismos de transferencia génica horizontal en procariotas. Además, se conocen algunos efectos de virus en plantas que podríamos decir que contribuyen a la belleza de la especie. Es el caso de los tulípanes variegados, que tanto asombró y satisfizo, y todavía lo hacen, a los amantes de esas plantas. Pero el virus causante también fue el responsable de una de las primeras crisis económicas de la Edad Moderna. Y, en muchos aspectos, comparable a la actual crisis económica, aunque en el caso de los tulípanes, restringida a una sola nación, Holanda.

La aleccionadora historia se puede resumir así: Los tulípanes entraron en Holanda, plantados por el famoso botánico Carolus Clusius, hacia 1590, procedentes de Turquía, donde eran muy populares. Entre los diversos colores y formas de las flores, había unos que eran especialmente apreciados y codiciados: precisamente los que tenían pétalos variegados, que rompían su color uniforme. La causa de la particularidad era un virus, que se transmitía de generación en generación a través del bulbo de la planta. A principios del siglo XVII se generó en Holanda una especie de “tulipomanía” (muy bien reflejada por los pintores de la época), que hizo invertir grandes fortunas, a veces en unos bulbos que todavía no habían originado la nueva planta. Pero, en 1637, algunos de los “tulipomaníacos” se dieron cuenta de que en realidad no necesitaban ese bien antes tan buscado, y la demanda, y por tanto los precios, cayeron estrepitosamente. Como consecuencia, la “burbuja” especulativa estalló y hubo una bancarrota generalizada. (¿A quién le suena esta historia?)

La actual amenaza de pandemia producida por el virus de la gripe A (H1N1) tiene efectos mucho más serios sobre la salud humana que la actual crisis económica. Pero contamos con armas para controlar la expansión, remediar los efectos y desarrollar, con el tiempo requerido, vacunas eficaces. La sociedad debe estar informada, pero no alarmada. Deben tomarse precauciones extremas, pero sabemos que podemos vencer la enfermedad. Para eso sirve una investigación microbiológica que, generalmente sin tanto brillo mediático como el de otros campos de la investigación, es la que va a permitir resolver un problema que afecta a cientos de millones de personas y que puede tener un efecto muy grave sobre la sociedad. Dentro de unos meses, la pandemia de la gripe A (H1N1), que, nos guste el nombre o no, ha tenido un origen porcino, será sólo un recuerdo para algunos y unas páginas más en los libros y revistas de microbiología. Los medios habrán perdido interés y se dedicarán a otras noticias más “importantes”. Pero los microbiólogos no olvidaremos que nuestra ciencia ha salvado millones de vidas y con ello ha permitido el desarrollo de las sociedades modernas. La Microbiología, con toda su diversidad, es una ciencia esencial para el bienestar de la humanidad y para el conoci-

miento que tenemos de los procesos vitales. Una aproximación al desarrollo de la Microbiología en España en la última década, y su comparación con materias afines, apareció en *International Microbiología* en septiembre de 2008 [Int. Microbiol. 11(3):213-220, www.im.microbios.org] y merece ser consultada.

Las ideas y logros de la Microbiología influyen en la vida cotidiana y ayudan a crear nuevas perspectivas al ciudadano, al mismo tiempo que permiten enfocar de manera crítica y veraz el futuro del pensamiento humano. La aproximación popular de la ciencia, y la difusión de los conocimientos científicos —como éstos tan esenciales del contagio, la transmisión, los medicamentos y las vacunas— deben hacerse de una manera sencilla, pero exacta, alejándose de cualquier explicación dogmática o mágica y explicando los fenómenos como frutos de un largo período de análisis y controversias a través de los cuales los científicos se han aproximado a la realidad —y por tanto a la solución de muchos problemas, como la amenaza de una pandemia— como consecuencia de un largo proceso colectivo de interacción entre hechos e ideas.

Ricardo Guerrero

Presidente de la Sociedad Española de Microbiología

NUESTROS GRUPOS

Microbiología de los alimentos

Presidente: **Francisco Javier Carballo García**

Simposio "Resistencias antimicrobianas emergentes en la cadena alimentaria"

El día 24 de Septiembre de 2009 a las 10 de la mañana, dentro del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología a celebrar en la Universidad de Almería, tendrá lugar el Simposio "Resistencias antimicrobianas emergentes en la cadena alimentaria". Será moderado por el Dr. Miguel Prieto Maradona, del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, y contará con las siguientes ponencias y ponentes:

"Resistencias antimicrobianas: vigilancia epidemiológica, incidencia, tendencias, patógenos alimentarios implicados". Dr. Ernesto Liébana Criado. *European Food Safety Authority* (EFSA). Parma, Italia.

"Mecanismos moleculares de las resistencias antimicrobianas: avances". Dr. Jordi Vila Estapé. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona.

"Uso de antimicrobianos en la cadena alimentaria. Implicaciones para la industria agro-alimentaria". Dra. Rosa María Capita González. Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León.

"Implicaciones de las resistencias antimicrobianas en salud pública humana y veterinaria". Dr. Lucas José Domínguez Rodríguez. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

El XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos tendrá lugar, D.m., durante los días 19, 20, 21 y 22 de Septiembre de 2010 en el Palacio de Exposiciones

de Valladolid. Correrá la presidencia de la organización a cargo del Dr. David Rodríguez Lázaro, del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

Microbiología de plantas

Presidente: **Jesús Murillo**

La tercera reunión del grupo (MiP '09) se celebró en Granada del 18 al 20 de febrero de 2009, organizada por los investigadores Manuel Espinosa Urgel y M^a Isabel Ramos González, del Depto. de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín. Las sesiones científicas se celebraron en el salón de actos de la Estación Experimental del Zaidín.

La reunión contó con la participación de 86 congresistas, que presentaron un total de 49 comunicaciones orales que abordaron diversos temas de interés en microbiología de plantas. Las sesiones y sus moderadores fueron: Bases moleculares de las interacciones beneficiosas (moderadores Rafael Rivilla y M^a José Soto); Estrés, mecanismos de resistencia y adaptación (moderadores M^a José Pozo y Alejandro Pérez); Ecología (moderadores Nuria Gaju y Morteza Golmohammadi); Actividad promotora del crecimiento y control (moderadores Francisco Cazorla y Rosa Hermosa); Patogénesis (moderadores Cayo Ramos y Emilia López-Solanilla), y Análisis microbiano: marcadores evolutivos y diversidad genética (moderadores Jaime Cubero y Ramón Peñalver). Cabe destacar el gran nivel de las presentaciones así como la excelente labor de los moderadores. La reunión del grupo fue clausurada por el Director de la Estación Experimental del Zaidín, Nicolás Toro, que alabó la labor del grupo y su contribución al avance de este campo en España.

A finales de 2008 se convocaron las elecciones para la renovación parcial de la Junta Directiva del Grupo, correspondiente a los cargos de vicepresidente, secretario y un vocal. Dado que se presentó una única candidatura, la junta directiva procedió a la proclamación directa de la misma, compuesta por Pablo Rodríguez Palenzuela

(Vicepresidente), Alejandro Pérez García (Secretario) y Ramón Peñalver Navarro (Vocal), que tomaron posesión de sus cargos durante la reunión del grupo en Granada. A esta nueva junta directiva se ha incorporado Pablo Rodríguez-Palenzuela, que es profesor de Bioquímica en el Departamento de Biotecnología de la ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, y que actualmente desarrolla su actividad investigadora en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), en el Campus de Montegancedo de la UPM.

Durante la inauguración de la reunión, el grupo dedicó unas palabras de gratitud a la labor del Vicepresidente saliente, Antonio de Vicente Moreno. Antonio es profesor de Microbiología en el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, de la Universidad de Málaga y es el fundador e investigador principal del grupo de investigación "Microbiología y patología vegetal". Antonio de Vicente ha sido el principal promotor del grupo especializado y uno de sus fundadores; participó en la comisión gestora del grupo y ha ostentado el cargo de Vicepresidente hasta la fecha. Durante el ejercicio de este cargo, Antonio se ha destacado por su gran capacidad de análisis, su excelencia científica y sus grandes dotes de diplomacia; más importante aún, Antonio ha insuflado al grupo su buen humor y su profundo sentido de la amistad y la lealtad, lo que ha permitido nuclear un ambiente distendido, en el que la amistad prevalece sobre otras consideraciones, y muy favorable para la colaboración científica. El grupo especializado Microbiología de plantas debe su existencia y continuidad al excelente trabajo de Antonio; desde aquí, y en nombre de los miembros del grupo y de todos los que hemos disfrutado de las reuniones del MiP, queremos expresar nuestro reconocimiento y nuestro más profundo agradecimiento a la excelente labor de Antonio de Vicente.

Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Presidenta: **Amparo Querol**

El grupo ha organizado en este periodo el simposio "Nuevas perspectivas en Micología" que tendrá lugar en el XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Este simposio trata de agrupar los últimos avances en el campo de la Micología, tanto en el ámbito de los hongos filamentosos como de las levaduras y será moderado por Victoriano Garre.

Las ponencias propuestas son:

"Morfogénesis y Patogénesis de *Fusarium oxysporum*".
María Isabel González Roncero. Facultad de Ciencias.
Universidad de Córdoba.

"Expresión heteróloga en levadura como modelo celular para estudio de enfermedades humanas". Víctor Jiménez Cid. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

"Secuenciación de *Pleurotus*". Antonio Gerardo Pisabarro de Lucas. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra.

"Señalización en levaduras como respuesta a distintos estreses". Joaquín Ariño Carmona. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

El grupo participará con la SEM, como en años anteriores, subvencionando becas y/o premios para incentivar la participación de jóvenes científicos en este congreso.

Microbiología Molecular

Presidente: **Juan María García Lobo**

De acuerdo con lo previsto en la reunión mantenida en la reunión de Cádiz, se confirma la celebración de la próxima reunión del grupo especializado en Barcelona en el año 2010 organizada por Antonio Juárez.

Corresponde celebrar elecciones para renovación de la Junta Directiva del grupo, a cuyos efectos se ha nombrado la Comisión Electoral que ya ha puesto en marcha el proceso electoral que se prevé termine el próximo 22 de mayo con la proclamación de la nueva Junta.

El presidente del grupo aprovecha esta ocasión para expresar su agradecimiento a todos los miembros de la Junta Directiva saliente del grupo por su afecto y apoyo incondicional, a todos los miembros del grupo por su colaboración y a la SEM y su Junta Directiva con los que tenido la suerte de compartir este periodo de "gobierno".

Gracias a todos y mis mejores deseos para la nueva Junta Directiva del Grupo.

Protistología

Presidente: **Aurelio Serrano Delgado**

Como viene siendo habitual en los últimos congresos SEM, el Grupo de Protistología ha organizado un simposio sobre un tema de actualidad relacionado con los protistas en el XII Congreso Nacional de Microbiología. Se trata del Simposio XI, titulado *Protistas como biofactorías y biosensores microbianos*, cuyos moderadores serán Juan Carlos Gutiérrez Fernández (Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid) y Aurelio Serrano Delgado (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. CSIC-Universidad de Sevilla). Las ponencias serán:

"Microalgas y biocombustibles". Miguel García-Guerrero. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. CSIC-Universidad de Sevilla.

"Microalgas como biofactorías". Emilio Molina Grima. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería.

"*Tetrahymena* como biosensor celular de metales pesados: construcciones con promotores de metalotioneínas y su validación". Francisco Amaro Torres. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

"Biosensores: presente y futuro". Emiliano Enrique Díaz Portuondo. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-MYGEN S.L. Madrid.

Esperamos que el simposio sea de interés tanto para los miembros del grupo como para los asistentes al congreso en general.

Epidemiología de los *Escherichia coli* verotoxigénicos de origen ovino: estudio longitudinal y de relaciones clonales en explotaciones ovinas extremeñas mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE).

Sergio Sánchez Prieto

Directores: **Joaquín Rey Pérez y Juan Manuel Alonso Rodríguez.**

Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (UEX).

Los *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) son importantes patógenos emergentes para los seres humanos, responsables de graves procesos patológicos como la colitis hemorrágica o el síndrome urémico hemolítico. En los últimos años se ha detectado un gran número de brotes, mayoritariamente en países anglosajones y Japón, aunque existen referencias también en nuestro país. Si bien está claramente establecido que el ganado bovino y los pequeños rumiantes constituyen su principal reservorio, de forma que el consumo de alimentos contaminados a partir de heces de animales portadores, en particular carne, leche y vegetales, es su principal vía de transmisión, apenas existe información acerca de la colonización de manera natural de los ovinos por ECVT durante largos periodos de tiempo y de su ecología en las propias explotaciones.

Para abordar estos aspectos, se estudió la evolución de la prevalencia de ECVT en muestras fecales de ganado ovino tomadas mensualmente en 12 explotaciones de La Serena (Extremadura) a lo largo de 1 año, entre noviembre de 2003 y octubre de 2004. Se aislaron ECVT en el 74,1% del total de muestras analizadas, 98,6% de los animales examinados y 100% de las explotaciones de procedencia, confirmando que el ganado ovino es un importante reservorio de ECVT potencialmente patógenos para seres humanos. El ECVT O157:H7 sólo se aisló puntualmente en 2 muestras. Sin embargo, la prevalencia de ECVT no-O157 observada en los sucesivos muestreos mensuales se mantuvo entre el 65,9 y el 81,9% a lo largo de todo el año, por lo que no se observó ningún patrón estacional en la infección del ganado ovino.

Con objeto de completar el estudio de seguimiento longitudinal y analizar las relaciones clonales existentes entre aislados del mismo serogrupo, se determinó el antígeno O de los aislados de las 4 explotaciones más representativas. Entre ellos, se subtiparon mediante PFGE los 285 aislados de los serogrupos O5, O87, O91, O146, O166 y O176, todos ellos serogrupos frecuentes entre los ECVT ovinos y presentes en muchos casos entre los ECVT humanos. Se observó una considerable diversidad genética entre los aislados de cada sero-

grupo, con numerosos perfiles de PFGE diferentes dentro de cada una de las explotaciones. La mayoría de los clones se circunscribieron a 1 única explotación, con escasas excepciones. Aunque dentro de cada explotación se detectaron numerosos clones, algunos fueron claramente más prevalentes y se aislaron en distintos animales. Se puso de manifiesto la persistencia de determinados clones en las explotaciones durante periodos de hasta 11 meses, aislados consecutivamente hasta en 9 muestreos sucesivos. En los animales, individualmente, se pudo constatar asimismo la persistencia de clones concretos, con periodos de eliminación de hasta 9 meses, que se tradujo, sin embargo, en un patrón de eliminación intermitente en la mayoría de los casos, observándose en muchos de los animales la persistencia simultánea a lo largo del año de 2 ó incluso 3 clones pertenecientes a serogrupos diferentes. La transmisión horizontal de estos clones entre animales habría permitido su diseminación y, por tanto, el mantenimiento de la infección en las explotaciones.

Validación de técnicas de electroforesis bidimensionales para el estudio del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria meningitidis*

Ana Abel Souto

Directores: **Sandra Sánchez Poza y M^a Teresa Criado Alvarez.**

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

La separación analítica de las proteínas de la membrana externa bacteriana es esencial para la identificación de candidatos adecuados para el desarrollo de vacunas pero hay que tener en cuenta que en muchos casos, la inmunogenicidad de las mismas dependerá de que éstas se expresen en su forma nativa, lo que hace necesaria la utilización de métodos no desnaturizantes, tal como es el caso de la electroforesis Blue-Native (BN). Para este objetivo analítico, se utiliza frecuentemente la electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y/o la electroforesis bidimensional en conjunción con isoelectrofoque (IEF/ SDS-PAGE). Independientemente del método que se utilice, el primer paso necesario es el enriquecimiento, pues las proteínas de membrana constituyen una parte reducida del proteoma de la célula y debido a ello no pueden ser analizadas fácilmente mediante métodos que consideren el total de las proteínas presentes en la misma. En el caso de *N. meningitidis* se aprovecha la capacidad de la bacteria para producir OMVs constituidas principalmente por membrana externa.

En este estudio hemos evaluado la utilidad de tres técnicas electroforéticas bidimensiona-

les diferentes para el análisis del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria*. La evaluación de las relaciones existentes entre las distintas proteínas es importante desde el punto de vista inmunológico, pues su unión puede determinar la formación de epítopos conformacionales o compartidos.

La 2D SDS-PAGE (electroforesis bidimensional diagonal) utilizando diferentes tratamientos en cada dimensión ha demostrado ser un método rápido, simple y fiable tanto para la detección de complejos multiproteicos, como para estudiar la disociación de proteínas inducidas por temperatura o los cambios conformacionales debidos a la misma.

El análisis mediante 2D BN/SDS-PAGE permite determinar la composición de los complejos de membrana en condiciones nativas, pues se trata de un sistema electroforético no desnaturizante, que posibilita el estudio funcional de los complejos una vez separados.

La técnica 2D IEF/SDS-PAGE excluye del análisis proteico de la membrana externa de *Neisseria* aquellas con tendencia a formar complejos y además en el caso de algunas proteínas mayoritarias, la técnica detecta numerosas isoformas que en realidad son artefactos, lo que nos lleva a concluir que no es la más adecuada para el estudio de la membrana externa si bien los mapas proteicos de *Neisseria lactamica* y *Neisseria meningitidis* obtenidos, nos permite establecer que existe un grado de similitud entre ambas especies comparable al observado entre cepas de *Neisseria meningitidis*.

Tanto la electroforesis 2D dSDS/SDS-PAGE como la 2D BN/SDS-PAGE han resultado ser técnicas muy útiles y sencillas para la detección y análisis de complejos de proteínas de membrana externa. Además, la primera de ellas permite una óptima detección y resolución de proteínas con movilidad dependiente de la temperatura como es el caso de las proteínas de opacidad (Opa) de *Neisseria*.

En desacuerdo con la estructura homomérica propuesta para los poros de *Neisseria meningitidis*, los resultados de las electroforesis 2D dSDS/SDS-PAGE y BN/SDS-PAGE permite concluir que los complejos de porinas meningocócicas de membrana externa presentes en condiciones naturales en las cepas salvajes de esta especie, están formados por heterómeros de PorA y PorB y, en menor cantidad, por homómeros de PorB. Las asociaciones homoméricas de PorA únicamente de detectan en las cepas mutantes carentes de PorB.

Finalmente, postulamos que el sistema básico de transporte de *Neisseria meningitidis* estaría constituido por poros mixtos de PorA/PorB cuyo funcionamiento estaría complementado por la unión transitoria de distintas proteínas, entre ellas la RmpM, en función de las necesidades de transporte específicas de cada momento del ciclo celular. Por tanto, las dos porinas de *Neisseria meningitidis* podrían constituir un entramado dinámico de poros cuya composición sería variable a lo largo del tiempo y en función de las necesidades de las bacterias.

Contribución del regulón Rcs a la virulencia de *Salmonella*: análisis genético y molecular

Clara Beatriz García Calderón

Directores: Francisco Ramos Morales y Josep Casadesús Pursals.

Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Salmonella es un patógeno intracelular que causa enfermedad sistémica, gastroenteritis o aborto. La virulencia de muchas bacterias patógenas está mediada por sistemas de dos componentes, que transmiten estímulos externos, generando una respuesta específica. El sistema Rcs es un sistema de dos componentes formado por las proteínas de membrana interna, RcsC y RcsD, y el regulador de respuesta RcsB, que es un factor transcripcional. Se sabe que mutaciones en determinados genes, como *igaA*, conllevan la activación del sistema. Este gen es esencial, y mutaciones viables en el mismo atenúan la virulencia de *Salmonella*. El objetivo de este trabajo fue el estudio del regulón IgaA-Rcs.

Inicialmente se obtuvo una batería de mutantes *rscC* con activación constitutiva del sistema. Se caracterizaron once mutaciones, todas en la porción citoplásmica de la proteína. La mayoría eran dominantes, excepto dos, situadas en el dominio receptor de la proteína. Los distintos mutantes eran mucosos, inmóviles y exhibían diferentes grados de activación del sistema Rcs. Ensayos de infección en ratones demostraron que todos los mutantes estaban muy atenuados, y que la atenuación correlacionaba con el grado de activación del sistema. Los fenotipos de estos mutantes eran suprimidos por mutaciones en el gen *rscB*. Mutaciones en *gmm* o *rscA* (implicados en la síntesis de cápsula de ácido colánico) suprimían parcialmente la avirulencia del mutante *rscC* constitutivo, lo que sugiere que la sobreproducción de cápsula desempeña un papel negativo en la virulencia de *Salmonella*.

Se generó una colección de fusiones transcripcionales *lacZ* aleatorias en el cromosoma de *Salmonella*, y se comparó la expresión en condiciones de alta y baja activación del sistema Rcs. Así se identificaron trece genes regulados por Rcs, algunos específicos de *Salmonella* como los del operón *srfABC*, cuyos productos se habían descrito como posibles efectores de un sistema de secreción de tipo III. Ensayos de secreción indicaron que la proteína *SrfC* podía ser secretada por este mecanismo. El estudio de este operón indicó que estaba regulado negativamente tanto por el sistema Rcs como por el sistema PhoPQ, lo que nos hizo plantearnos que existiese una relación más amplia entre ambos regulones. Los ensayos en ratones con mutantes dobles y simples demostraron que, en efecto, existía un solapamiento parcial entre ambos regulones en las funciones de virulencia.

En la última parte de la tesis realizamos un estudio del gen *igaA* en el que caracterizamos el punto de inicio de la transcripción y demostramos que *igaA* es el primer gen de un operón compuesto por cuatro genes cuya transcripción es dependiente del factor σ -70. Mediante

un escrutinio genético basado en fusiones *igaA::lacZ*, encontramos que este operón está regulado a nivel transcripcional por la proteasa Lon y por el regulador de respuesta MviA. Experimentos adicionales demostraron que MviA controla la transcripción de *igaA* por medio de RpoS y que ejerce además un control postranscripcional sobre *rscB*, por una vía independiente de IgaA, RpoS y RcsC.

Valoración cuantitativa de riesgos microbiológicos: aplicación a listeriosis y alimentos listos para consumo

Victoria Garrido

Directoras: Isabel García Jalón-De la Lama y Ana Isabel Vitas Pemán.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra.

Garantizar la seguridad alimentaria continua siendo un reto para los gestores y responsables de las Administraciones Públicas, debido, entre otros aspectos, a la globalización y a la rápida distribución a nivel internacional de los alimentos. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos de transmisión alimentaria que ha despertado mayor interés en los últimos años por la grave sintomatología que la enfermedad produce en los grupos de población de riesgo (ancianos, personas con inmunodepresión y mujeres embarazadas). Además, aunque en la transmisión del microorganismo pueden estar implicados diferentes grupos de alimentos, son los denominados listos para consumir o ready-to-eat (RTE) los que potencialmente representan un mayor riesgo para contraer la enfermedad, debido a la gran aceptación que tienen en la sociedad actual, su almacenamiento en refrigeración que permite el desarrollo del patógeno psicrófilo y a que no requieren cocinado antes de su consumo.

Una de las herramientas utilizada por los gestores para conocer y controlar posibles efectos nocivos sobre la salud de los consumidores es la Valoración de Riesgos (Risk Assessment). Debido al incipiente desarrollo de la metodología de Valoración de Riesgos Microbiológicos en España, el objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de un modelo de riesgo de listeriosis aplicado a nivel regional (Comunidad Foral de Navarra) con el fin de desarrollar una herramienta que pueda servir de referencia para utilizarse en ámbitos más amplios. Para ello, fue necesaria la obtención de datos de las diferentes etapas de la valoración del riesgo: identificación y caracterización del peligro, valoración de la exposición y caracterización del riesgo.

El modelo desarrollado describe la probabilidad de contraer listeriosis por consumo de pescados ahumados y cárnicos cocidos loncheados, productos en los que la concentración del patógeno puede aumentar según el tiempo transcurrido entre la adquisición y el consumo. Los datos primarios fueron obtenidos en diferentes estudios y seguimientos realizados en Navarra entre 2003 y 2007. La incidencia media de listeriosis en esta Comunidad fue de 0,9/100.000 habitantes, siendo las personas ancianas

(46,4%) mayores de 60 años y las mujeres embarazadas (39,3%), los grupos más afectados. El alimento en el que con mayor frecuencia se aisló el patógeno fue el pescado ahumado (25% de las muestras positivas), seguido de los cárnicos cocidos loncheados adquiridos a granel (8,5%). Además, el 76,7% de las personas entrevistadas admitió consumir este último grupo de productos, incluidos ancianos y embarazadas. En cuanto a las condiciones de almacenamiento post-venta, el 69,7% de los refrigeradores domésticos presentaron temperaturas superiores a 6°C, permitiendo el rápido crecimiento del patógeno. Los modelos de predicción desarrollados para cada uno de los alimentos investigados, estimaron un mayor número de casos de listeriosis por año por consumo de jamón cocido, especialmente en su presentación a granel. El estudio de diferentes escenarios ha demostrado que el descenso de la temperatura de refrigeración durante toda la vida útil del producto (incluido el almacenamiento en el hogar), es el factor clave para reducir el riesgo de listeriosis. Debido a la amplia aceptación de los cárnicos cocidos loncheados adquiridos a granel se considera importante informar a los consumidores acerca del potencial riesgo de contraer listeriosis y de las medidas preventivas que deberían seguir para prevenirlo, poniendo especial énfasis en los grupos de personas ancianas y embarazadas. Teniendo en cuenta el aumento de la incidencia de la enfermedad observado en este último grupo, se propone incidir en el diagnóstico temprano de la enfermedad, siendo recomendable la investigación de los episodios febriles y gastrointestinales de las mujeres gestantes en cualquier etapa del embarazo.

A study on the role of phosphatidylcholine and inner lipopolysaccharide sections in *Brucella* virulence

Raquel Conde Álvarez

Directores: Maite Iriarte Cilveti e Ignacio Moriyón Uría.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra.

Brucella are gram-negative bacteria that cause brucellosis. The role of phosphatidylcholine (PC) (eukaryotic phospholipid absent from most prokaryotes but present in *Brucella*), lipopolysaccharide core and phosphatase genes possibly involved in envelope remodeling in *B. abortus* virulence was investigated. Evidence was found that *pcs* and *pmtA* (encoding enzymes of the possible PC biosynthetic routes) are functional under different conditions. PC was necessary for full virulence, and *Pcs* and *PmtA* possibly have complementary roles *in vivo*. A mutant in homologue of *lpcC* (*Rhizobium leguminosarum* core glycosyltransferase) lacked part of the lipopolysaccharide core but kept the O-chain, was sensitive to normal serum and bactericidal peptides and attenuated in dendritic cells, inducing their maturation and high TNF α and IL-12 levels. The mutated LPS reproduced these effects and had a higher binding to MD-2. In mice, the mutant was attenuated and elicited

intense protective immunoresponses, showing that core mutants are promising brucellosis vaccines. *B. abortus* genes *lpxE1* and *lpxE2* (homologous to *lpxE* and *lpxF* of bacteria that partially dephosphorylate lipid A) were under control of BvrR/BvrS, a regulator of *Brucella* virulence that modulates sensitivity to bactericidal peptides. However, *lpxE1* and *lpxE2* mutants were not attenuated and, although mutant *lpxE-1* was peptide sensitive, its lipopolysaccharide was similar to wild type in lipid A phosphorylation and MD-2 interaction. It is proposed that *lpxE1* acts by dephosphorylating an undetermined envelope lipid, thereby contributing to peptide resistance in *B. abortus*. The results of this thesis complement previous results showing the critical importance of envelope molecules in *Brucella* virulence.

Identificación y caracterización de genes de osmoadaptación en *Rhizobium* y de su papel en simbiosis con leguminosas

Ana Domínguez Ferreras

Directores: Juan Sanjuán Pinilla y María José Soto Misffut.

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

Este trabajo de tesis doctoral tuvo como objetivo general el estudio de mecanismos de adaptación a estrés osmótico en rizobios. Para ello se llevó a cabo por una parte una aproximación global, mediante la determinación del transcriptoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en respuesta a la aplicación de NaCl y sacarosa a varias concentraciones (Domínguez-Ferreras et al., 2006). Los resultados mostraron que estas condiciones provocaban la inducción de numerosos genes de función desconocida, mientras que se reprimían muchos genes que codifican proteínas de función conocida. Además, la mayoría de los genes de *S. meliloti* 1021 que se sobreexpresan en respuesta a un choque osmótico se encuentran localizados en los plásmidos simbióticos, especialmente en el pSymB, mientras que los genes reprimidos fueron mayoritariamente cromosómicos.

Por otra parte, se realizó una aproximación genética al estudio de mecanismos conocidos de adaptación a estrés hiperosmótico en dos rizobios modelo (*S. meliloti* 1021 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099): captación de potasio y síntesis de trehalosa. Se determinó la presencia de 4 posibles sistemas de transporte de potasio en *S. meliloti* 1021 (Kup1, Kup2, Kdp y Trk) y de 3 en *M. loti* MAFF303099 (Kup1, Kup2 y Kdp). En *S. meliloti* 1021, Trk resultó ser el principal sistema implicado en adaptación a estrés osmótico. Además, la presencia de Trk o Kup1 es necesaria para el crecimiento de la bacteria en condiciones de laboratorio y es también importante durante el establecimiento de simbiosis con alfalfa (Domínguez-Ferreras et al., 2009). Por otra parte, en *M. loti*, carente de un sistema Trk, los sistemas Kup son necesarios para el crecimiento de la bacteria y para su adaptación a estrés osmótico en condiciones

de laboratorio. En ambas especies de rizobios el sistema Kdp adquirió relevancia durante la adaptación a estrés osmótico a bajas concentraciones de potasio.

Por último, se estableció la presencia de tres posibles sistemas de síntesis de trehalosa codificados en el genoma de *S. meliloti* 1021 (OtsA, TreYZ y TreS), y de uno (OtsAB) en *M. loti* MAFF303099. El sistema OtsAB de *M. loti* se encuentra implicado en la acumulación de este compuesto durante la adaptación de la bacteria a elevadas concentraciones de solutos. En *S. meliloti*, la acumulación de trehalosa necesaria para una correcta osmoadaptación depende principalmente de OtsA, aunque los otros sistemas, especialmente TreS, también están implicados en este proceso. Además, la expresión de los genes que codificaban los tres sistemas se induce en respuesta a un choque osmótico. Nuestros resultados indicaron que la presencia de al menos un sistema de síntesis de trehalosa es importante en *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 para el establecimiento de simbiosis con leguminosas. Así, la ausencia de OtsAB provocó una disminución de la infectividad de *M. loti* MAFF303099 y de su eficiencia simbiótica, mientras que en *S. meliloti* 1021 la carencia de los tres sistemas descritos fue causa de una menor competitividad para la nodulación.

Domínguez-Ferreras et al. 2006. *J. Bacteriol.* 188: 7617-7625.

Domínguez-Ferreras et al. 2009. *J. Bacteriol.* 191 (en prensa; doi:10.1128/JB.01567-08).

Selección y caracterización de bacterias con actividad de biocontrol de *Rosellinia necatrix* Prill. en aguacate

María Ángeles González Sánchez

Directores: Rosa M. Pérez Jiménez, Francisco M. Cazorla López y Antonio de Vicente Moreno.

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) y Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, y presentada en esta última institución.

Rosellinia necatrix Prill. es el agente causal de la podredumbre blanca radicular, enfermedad limitante del cultivo del aguacate en Andalucía. El control biológico de esta enfermedad mediante la incorporación de microorganismos de suelo como agentes de control biológico se presenta como un sistema alternativo o complementario a los actuales métodos de lucha. El objetivo principal de este trabajo fue la selección de cepas bacterianas con potencial capacidad de biocontrol frente a esta enfermedad mediante una estrategia basada en el análisis directo de la protección de la planta de aguacate, evitando de esta forma una preselección basada en mecanismos de biocontrol concretos, como el antagonismo o colonización de raíz, que recientemente habían sido utilizados en otros trabajos previos. Para abordar este estudio se generó una colección de bacte-

rias a partir de muestras de raíz y suelo de árboles situados en diversas fincas de aguacate andaluzas. Un total de 143 aislados representativos de la colección fueron evaluados en una primera fase de ensayos de biocontrol que utilizaron plántulas de aguacate procedentes de embriones germinados *in vitro* y un bajo número de réplicas, resultando en la selección de 22 aislados candidatos con potencial biocontrol. Al total de candidatos se les analizó el espectro de antagonismo frente a diversos patógenos de suelo y diversas propiedades relacionadas con el biocontrol tales como: producción de sustancias antimicrobianas, colonización y persistencia en raíz, tipos de movilidad, persistencia en suelo y actividad promotora del crecimiento vegetal. Adicionalmente, los aislados candidatos fueron de nuevo evaluados en una segunda fase de experimentos de biocontrol que utilizaron plántulas de aguacate clonales micropropagadas y un mayor número de réplicas. De estos ensayos se seleccionaron por su efecto protector de la enfermedad las cepas *P. fluorescens* CB32, *P. chlororaphis* CB254, *P. fluorescens* CB306 y *B. subtilis* CB115. Todas las cepas seleccionadas inhibían *in vitro* a diversos patógenos de suelo incluyendo en el caso de las cepas CB32, CB115 y CB254 a *R. necatrix*. De esta observación se pudo concluir que una estrategia de selección basada en el antagonismo *in vitro* frente al patógeno, hubiera rendido un número muy similar de bacterias con la capacidad para controlar a *R. necatrix* con la estrategia de selección directa *in planta* utilizada en este trabajo. El análisis de los tipos y número de mecanismos de biocontrol exhibidos por las cepas que protegían y que no protegían permitió deducir que probablemente no existe un mecanismo universal ni determinante en la capacidad de biocontrol y que ésta capacidad es polifásica, siendo por tanto alcanzada por la combinación de varios mecanismos. En experimentos con plantas adultas de aguacate comerciales bajo condiciones de invernadero se observó que la cepa *B. subtilis* CB115 y *P. fluorescens* CB32 redujeron el desarrollo de la podredumbre blanca radicular, aunque la consistencia en la eficacia del biocontrol fue mayor en el caso de la cepa CB115.

Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis.

Roxana Beaz Hidalgo

Directores: Jesús L. Romalde y Susana Prado.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

Algunas especies del género *Vibrio* son importantes patógenos bacterianos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Las patologías causadas por vibrios en moluscos se conocen desde los años 60, sin embargo son escasos los estudios sistemáticos y en profundidad en especies de bivalvos distintos de la

ostra plana (*Ostrea edulis*) o americana (*Crassostrea virginica*). Debido a los sucesivos episodios de altas mortalidades en poblaciones de almeja cultivada registrados en los últimos años en Galicia se hace necesario el estudio de la microbiota asociada con el fin de detectar posibles nuevos patógenos limitantes para el cultivo de este molusco bivalvo.

Los muestreos realizados a lo largo de 18 meses en 4 zonas geográficas distintas de Galicia demostraron una variación estacional en la carga bacteriana de las poblaciones de almeja cultivada (*Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus*). Como era de esperar se observó un claro incremento en los niveles de bacterias totales y de vibrios en los meses más cálidos. Se aislaron un total de 768 vibrios. La caracterización bioquímica y fisiológica permitió una identificación preliminar de los aislados, agrupados en diversos fenones según sus perfiles. Los datos fenotípicos revelaron una gran diversidad de especies dentro del género, aunque hubo una clara dominancia de aislados del grupo *V. splendidus* constituyendo el 54% del total de las cepas. Otras especies abundantes fueron *V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* y *V. aestuarianus*.

Se seleccionaron 145 aislados representativos de los grupos fenotípicos para obtener una identificación más exacta mediante caracterización molecular. La técnica de polimorfismos de amplificación del DNA (AFLP) reveló la presencia de diversidad específica y permitió esclarecer la identificación de muchos aislados que estaban enmascarados en el grupo de *V. splendidus* por la identificación fenotípica. Se observó que los datos de la identificación fenotípica y genética tan sólo coincidieron en un 29,82% posiblemente debido a la gran variabilidad intraespecífica en muchas pruebas y a la falta de pruebas claras para diferenciar entre especies. Hoy se considera necesario recurrir a un sistema de clasificación e identificación bacteriana basado en datos genéticos.

El 60,7% de los vibrios analizados por AFLP no lograron ser identificados a nivel de especie lo que apuntaba a la posible existencia de nuevas especies en el género. Se seleccionaron los 8 clusters no identificados de AFLP con mayor número de aislados, y se procedió a un estudio filogenético basado en la amplificación del gen

16S rRNA y cuatro genes *housekeeping*: *recA*, *rpoA*, *pyrH* y *atpA*. Los datos de la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA) revelaron la existencia de 8 posibles nuevas especies dentro de la Familia *Vibrionaceae*, 6 en la rama filogenética de *V. splendidus*, 1 en la rama de *V. haliotocoli* y 1 en la rama de *Aliivibrio fischeri*.

Una completa descripción bioquímica, los análisis filogenéticos de los 5 genes y los datos aportados por hibridación DNA-DNA permitieron la definición de tres nuevas especies: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. y *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

Los análisis filogenéticos situaron a la especie *V. breoganii* en el grupo de *V. haliotocoli*, siendo las especies más cercanas *V. comitans*, *V. rarus* y *V. inusitatus*. Las células son pequeños bacilos inmóviles que carecen de flagelo. Está compuesta por 7 aislados fenotípicamente homogéneos con diferencias principalmente en la fermentación de azúcares. Los genes *atpA* y *pyrH* demostraron ser los mejores candidatos para diferenciar *V. breoganii* de las especies más cercanas. Se observó una variabilidad intraespecífica en los perfiles de ERIC-PCR, sin embargo los perfiles de REP-PCR presentaron altos porcentajes de similitud. La cepa tipo de *V. breoganii* es RD 15.11^T (= CECT 7222^T = LMG 23858^T) aislada de almeja fina (*R. decussatus*).

Los datos del MLSA situaron a la nueva especie *V. gallaecicus* dentro del grupo polifilético *V. splendidus*. La especie está compuesta por tres aislados fenotípicamente homogéneos. Todos los genes secuenciados menos el *atpA* situaron a los aislados de *V. gallaecicus* en una rama independiente del resto de las especies del grupo. Las secuencias concatenadas de los genes situaron a *V. gallaecicus* cerca de *V. chagasii*, la especie más distante del grupo. Los porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA con las especies cercanas fueron inferiores al 97,3%. El gen *recA* es el más discriminativo para diferenciar la nueva especie de sus congéneres filogenéticos. Los tres aislados presentaron variabilidad intraespecífica en los perfiles obtenidos mediante ERIC y REP-PCR. La cepa tipo de *V. gallaecicus* es VB 8.9^T (=CECT 7244^T = LMG 24045^T) aislada de almeja japonesa.

El grupo de *Aliivibrio finisterrae* está compuesto por 4 cepas de las cuales una se diferen-

cia claramente desde el punto de vista fenotípico, como en la prueba de hidrólisis de la urea que es negativa para esta cepa. El congénere filogenético más cercano es *A. wodanis* con un 98,1% de similitud en el gen 16S rRNA, aunque los genes *recA* y *atpA* sitúan la especie más de cerca de *A. fischeri* y *A. salmonicida* respectivamente. En este caso el gen más discriminativo es el *recA*. La cepa tipo de *A. finisterrae* es CMJ 11.1^T (= CECT 7228^T = LMG 23869^T) aislada de almeja japonesa (*R. philippinarum*).

En todos los casos, la técnica de MLSA y secuencias concatenadas de varios genes ofreció una mayor fiabilidad y solidez que la utilización de un solo gen para la determinación de la posición filogenética de las especies descritas.

El estudio de los productos extracelulares (ECP) de 57 cepas previamente caracterizadas por AFLP demostró, en general, una baja actividad enzimática y alta variabilidad en los perfiles que no se pudieron relacionar con los clusters de AFLP. La mayor citotoxicidad en líneas celulares correspondió a cepas con ECPs con mayor actividad enzimática y concretamente proteolítica. Las cepas identificadas que mostraron mayor citotoxicidad fueron *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* y *V. diabolicus*. En la cepa RD 8.15 (*V. splendidus*-like) de uno de los grupos mayoritarios de AFLP no identificados se detectaron actividades enzimáticas en los ECP así como una destrucción total en la línea celular SAF-1 y además mostró virulencia en los ensayos de infección vía intravalvar en almeja adulta. En el análisis realizado de los ECP se observó actividad citotóxica en casi todas las cepas, sin embargo las cepas tipo de las tres nuevas especies y las 4 cepas de *Vibrio* sp. pertenecientes a los grupos de AFLP no identificados no resultaron virulentas en los ensayos realizados in vivo en larvas de almeja japonesa, ni en inoculaciones por baño en almeja adulta.

El presente trabajo ha confirmado la importancia de los métodos moleculares en la identificación de especies de *Vibrio*. Los datos obtenidos por AFLP señalan la existencia de numerosas especies dentro de este género aún no descritas. Futuros estudios sobre las cepas descritas en esta memoria llevarán probablemente a la descripción de nuevas especies bacterianas dentro del género.

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

Actualidad SEM publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación* (si es distinto) y *Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos *Teseo* es apropiado también.

Actualidad SEM se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la microbiología.

Socios que deben actualizar datos

Abad Lozano, José Luis
Bertolín Serra, Fco. Javier
Bordes Benitez, Ana
Fernández Orts, Eva María

Lafarga Capuz, Bernardo
López Ponce, Francisco José
Medieros Almendros, Jesús
Miranda Casas, Consuelo

Rubio Vallejo, Manuel Fco
Sagardia Redondo, M^a Begoña
Sesma Bea, Begoña
Vázquez Domínguez, Evaristo

Los datos correspondientes a cambios de dirección o de la domiciliación bancaria deben enviarse a la Secretaría de la SEM por correo electrónico, normal o fax (ver www.semico.es).



Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert *Universitat Autònoma de Barcelona*

Del 25 al 28 de noviembre de 2008, tuvo lugar el VII *workshop* sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (MRAMA), en la sala de actos de la Facultad de Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB; Bellaterra, Cerdanyola del Vallès), dirigido por los Drs. Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert, profesores de Ciencia y tecnología de los alimentos, y organizado por el *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments* (CERPTA) y el Departamento de Ciencia animal y de los alimentos de la UAB. Celebrado anualmente, el *workshop* MRAMA, de un contenido aplicado y de futuro, amplía y difunde los conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos innovadores para detectar, contar, aislar y caracterizar rápidamente los microorganismos habituales en los alimentos y el agua.

Como cada año, el ponente principal fue el profesor Dr. Daniel Y. C. Fung, de la *Kansas State University* (KSU; Manhattan, Kansas, EUA). El Dr. Fung es catedrático de Ciencia de los alimentos del *Department of Animal Sciences and Industry*; su especialidad es la microbiología de los alimentos y, dentro de este campo, es un científico de prestigio internacional en el ámbito de los métodos rápidos y miniaturizados y la automatización. Además, es director del *workshop* internacional sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología, que también tiene lugar anualmente en Manhattan, KS y que cumplió su 28ª edición el pasado junio. Ganador del Premio Internacional del *Institute of Food Technologists* (IFT) en 1997, por la organización de esta serie única de *workshops* internacionales; el Premio al Mejor Educador Waksman de la *Society for Industrial Microbiology* en 2001; el Premio a la Excelencia en la Docencia Universitaria del *College of Agriculture* de la KSU en 2005; el Premio *Carl R. Fellers* del IFT en 2006, por

su excepcional trayectoria en Ciencia y tecnología de los alimentos; y el Premio Inaugural al Mejor Educador en Seguridad Alimentaria de la revista *Food Safety* y *ConAgra Foods Inc* en 2007, por su carrera docente: más de 18.000 alumnos y director de 104 estudiantes graduados (33 doctorados y 71 másters). Editor asociado sénior de *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Miembro de honor de la *American Academy of Microbiology*, el IFT y la *International Academy of Food Science and Technology*. En 1995, fue invitado a dar una conferencia en el Instituto Pasteur de París (Francia) con motivo de la conmemoración del 100º aniversario de la muerte de Louis Pasteur. El Dr. Fung tiene, pues, una larga experiencia en el tema del *workshop*, lo que permitió ofrecer ponencias de gran calidad, de contenidos muy ricos y completos sobre las diversas disciplinas de la microbiología alimentaria. De hecho, al Dr. Fung, también se le conoce como el “padre” de los métodos microbiológicos miniaturizados, porque en este campo fue pionero y actualmente es uno de los investigadores más expertos y especializados del mundo, y ha ensayado con resultados positivos y ha aportado un alto número de técnicas innovadoras. Indudablemente, su presencia fue muy provechosa, y contribuyó a un buen aprendizaje de los métodos microbiológicos más recientes y eficaces.

El *workshop* contó con otros conferenciantes de renombre. Se encargó de la ponencia inaugural la Dra. Cécile Lahellec, directora honoraria de investigación de la *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA), en Alfort (Francia), que informó exhaustivamente sobre la implementación de la Seguridad alimentaria mediante los métodos aplicados en Microbiología alimentaria. El Dr. Armand Sánchez Bonastre, director del

Servicio veterinario de genética molecular de la UAB y profesor de nuestro Departamento, habló sobre la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método genético puntero para la detección y la identificación microbiológicas. El Dr. Daniel Ramón Vidal, profesor de investigación en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en Burjassot, transmitió a los asistentes sus amplios conocimientos sobre el desarrollo, el uso y la detección de alimentos transgénicos, y la nutrigenética y la nutrigenómica en alimentación. La Sra. Cristina Romero Gonzalo, responsable de la línea de Análisis de alimentos de INGENASA, empresa de Biotecnología en Madrid, habló sobre la aplicación de anticuerpos monoclonales para analizar los alérgenos y las micotoxinas. El Sr. Josep-Julà Antón García, responsable del Departamento de Control de calidad de Grupo Gallina Blanca – Star, en Sant Joan Despí, explicó su experiencia en la aplicación del sistema TEMPO (número más probable miniaturizado y automatizado) en el laboratorio de su Departamento. Y el Sr. David Tomás Fornés, responsable del laboratorio de Microbiología y biología molecular de ainia.centro tecnológico, en Paterna, y la Sra. Zerlinde Balverde Johnson, directora del programa técnico del AOAC Research Institute, en Gaithersburg, Maryland (EUA), participaron con interesantes ponencias sobre la normalización y la validación de métodos microbiológicos alternativos.

Además, asistieron importantes empresas de microbiología, que proyectaron diversas presentaciones multimedia y mostraron sus productos, para explicar su funcionamiento, sus ventajas y limitaciones, y las técnicas en que se basan. Estas empresas, que patrocinaron el VII *workshop* MRAMA, fueron: 3M España SA, AES Chemunex España SA, Applied Biosystems SA, Becton Dickinson SA, bioMérieux España SA, Bio-Rad Laboratories SA (y Bio-Rad Laboratories SA-NV –Bélgica–), Bioser SA (que invitó a participar a Strategic Diagnostics Inc –Reino Unido– y VistaLab Technologies Inc –EUA–), Biótica SL, Fluka Analytical (Sigma-Aldrich Química SA), IDEXX Laboratorios SL, IUL SA, LABAQUA SA, Oxoid SA (parte de Thermo Fisher Scientific Inc), Roche Diagnostics SL, y Vitaltech Ibérica SL. También asistieron Transgenomic Ltd (Reino Unido), Orion Diagnostica Oy (Finlandia) y DNATech Lda (Portugal).

El *workshop* ha sido una actividad exitosa, tanto por los ponentes y sus ponencias, como por la asistencia de público y la participación de las empresas de microbiología. Asistieron 202 personas, de diversos colectivos nacionales e internacionales:

Numerosos laboratorios e industrias agroalimentarios: entre otros, de los sectores cárnico y avícola, lácteo, panificación y bollería, comidas preparadas, congelados, bebidas analcohólicas (aguas, zumos de frutas, bebidas refrescantes) y alcohólicas (cervecero, vitivinícola, cava), ingredientes y aditivos; y algunos de ámbito no alimentario: biotecnológico, veterinario, cosmético, productos de limpieza y desinfección, e instrumentos para industrias y laboratorios.

Personal técnico, profesores y estudiantes de la UAB (licenciaturas de Ciencia y tecnología de los alimentos, Veterinaria, Biología, Ciencias ambientales, y Traducción e interpretación; tercer ciclo; y Departamentos de *Ciència animal i dels aliments*, de *Química*, y de *Genètica i de Microbiologia*) y otras instituciones, como la Universidad de Zaragoza, la Universidad Pública de Navarra (Pamplona), la Universidad Politécnica de Valencia, la Universidad Politécnica de Cartagena, la *University of Food Technologies* (Plovdiv, Bulgaria), la *Moscow State University of Food Production* (Rusia), la *Universidade Técnica de Lisboa* (Portugal), y la Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela).

Otros centros de investigación: la *Unitat de Remugants* – UAB y el *Àrea de Postcollita* – *Universitat de Lleida*, ambos del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (IRTA); el *Centre de Recerca en Agrigenòmica* (CRAG; Barcelona), del *Consorci CSIC-IRTA-UAB*; el *Veterinary Research Institute* (Brno, Chequia); el *Institute for Food Microbiology* (Nesher, Israel); y la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA; Baruta, Venezuela).

Administración: el *Central Institute of the Bundeswehr Medical Service* (Instituto Central del Servicio Médico del Ejército; Kronshagen, Alemania).

También estuvieron presentes la *Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació* (ACCA), entidad colaboradora con el *workshop* MRAMA, y EyPASA – Revista Alimentaria, que es la publicación oficial del *workshop*.

Durante tres días, se realizaron unas sesiones prácticas en el laboratorio, en las que se trabajó con algunos aparatos y los productos más innovadores dentro del campo de los métodos rápidos y la automatización. Y se organizaron otras actividades: talleres sobre Uso de los recursos para microbiología predictiva disponibles en internet, a cargo de la Sra. Montse Vila Brugalla (*SAICA Entitat de Control SL*, Barcelona), y sobre Separación inmunomagnética de *Escherichia coli* O157:H7; y visitas a una empresa de biología molecular, para Aplicaciones de la PCR en tiempo real.

Hubo una mesa redonda, con el Dr. Fung, otros ponentes, profesionales de empresas de microbiología y laboratorios de análisis, moderada por el Dr. José Juan Rodríguez Jerez, director del Observatorio de la seguridad alimentaria de la UAB y profesor de nuestro Departamento. Con la mesa redonda, sobre la instrumentación en microbiología de los alimentos, las tendencias del mercado mundial y otros temas de actualidad del sector, y las diversas ponencias del *workshop*, se constató que el número de ensayos microbiológicos aumenta año tras año, con grandes progresos en el desarrollo de métodos fáciles de usar y que garantizan rapidez, precisión, sensibilidad y especificidad en la obtención de los resultados, a un coste moderado. Los métodos microbiológicos rápidos y automatizados permiten a las industrias ofrecer sus productos más rápidamente al mercado, garantizando su seguridad y su conservación.

El VIII *workshop* MRAMA se celebrará del 24 al 27 de noviembre de 2009.

El Grupo especializado de Microbiología de Plantas

Jesús Murillo¹ y Antonio de Vicente²

¹Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, Pamplona; jesus.murillo@unavarra.es;

²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga; adevicente@uma.es

El Director de *Actualidad SEM*, Federico Navarro, ha tenido la iniciativa de preparar números monográficos de esta publicación para la presentación de los distintos grupos especializados de la SEM, y pensó que sería apropiado que el grupo especializado más joven fuera el elegido para comenzar esta serie. En el grupo de Microbiología de plantas (MiP) hemos acogido con mucho entusiasmo esta idea, pensando que sería una buena oportunidad para que otros socios de la SEM conocieran un poco más en detalle cuáles son los intereses y las líneas de investigación de los integrantes del grupo. Para ello, hemos decidido organizar el número con un artículo general descriptivo sobre el MiP junto con otros cuatro artículos que presentan la investigación de cuatro de los grupos de investigación que participaron directamente en la gestación del MiP. Desafortunadamente, no podemos incluir aquí las biografías del resto de grupos del MiP por razones de espacio, pero desde aquí les animamos a que realicen sus contribuciones a sucesivos números de *Actualidad SEM*, bien contactando directamente con el Director o a través del MiP.

EL ORIGEN DEL MiP

Las razones para la fundación del MiP como grupo especializado fueron de muy diversa índole, aunque desde el punto de vista científico, fue determinante la demostración de la gran similitud genética y funcional de los mecanismos moleculares y estrategias de las interacciones entre bacterias patógenas o simbióticas y sus huéspedes animales o vegetales (Verhaert *et al.*, 2005; Haldar *et al.*, 2006; van Baarlen *et al.*, 2007; Coombes, 2009). En la década de los 90 se puso de manifiesto la existencia de sistemas de secreción de Tipo III tanto en bacterias beneficiosas como en bacterias patógenas de animales y de plantas, que eran además funcionalmente intercambiables (He *et al.*, 2004; Galán y Wolf-Watz, 2006). En estos años se produjo, además, la adopción de modelos de interacción planta-patógeno por numerosos investigadores procedentes

de áreas muy diversas fuera de la Fitopatología (p. ej., Prithiviraj *et al.*, 2005) y la investigación de estas interacciones desde muy diversas disciplinas. Nosotros percibíamos, sin embargo, que existía un escaso contacto entre los investigadores que trabajamos en estos distintos campos, posiblemente debida a que pertenecíamos a áreas diversas y a que presentábamos nuestros resultados en congresos nacionales de sociedades científicas distintas. Un objetivo principal del MiP fue el de impulsar el desarrollo del área de las interacciones entre plantas y microorganismos en España, tanto beneficiosas como patogénicas, así como el de servir de foro para el intercambio de ideas y la colaboración científica entre los diversos investigadores en este campo. Igualmente, un propósito fundamental de este grupo es el de contribuir a la formación de jóvenes investigadores exponiéndoles a la multidisciplinariedad de esta área.

La idea de crear un grupo para fomentar las reuniones de investigadores que trabajan en diversos aspectos de estas interacciones microorganismo-planta (patología, ecología, bioquímica, genética, genómica, etc.) nació en Málaga gracias a la colaboración que desde principios de los 90 mantenemos los autores de este artículo. Juan José Borrego fue un elemento clave en la génesis del grupo al proponernos su desarrollo como un grupo especializado de la Sociedad Española de Microbiología. Nuestro primer paso fue valorar el apoyo que podría tener esta iniciativa y, al mismo tiempo, el contar con suficiente masa crítica para iniciarlo. Para ello, pusimos nuestra idea en común con un grupo de colegas con los que tradicionalmente nos han unido lazos de amistad y con los que manteníamos colaboraciones científicas. Los grupos dirigidos por María M. López, (IVIA, Valencia), Emilio Montesinos (Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA, Universidad de Gerona), Pablo Rodríguez-Palenzuela (ETS de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid) y Cayo Ramos (Área de Genética, Universidad de Málaga) recibieron la idea con mucho entusiasmo y decidimos ponerla en

Jesús Murillo Martínez (Cáceres, 1962) es licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla (1985) y Doctor por la Universidad Politécnica de Madrid (1990). Realizó una estancia postdoctoral de dos años y medio en el *Department of Plant Pathology, University of California at Riverside*, EE.UU. Desde 1992 trabaja en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra, en la que es Catedrático de Protección de Cultivos desde 2002. Durante los últimos 17 años ha dirigido el grupo "Patología vegetal y fitobacteriología", que ha trabajado sobre la biología, genética y epidemiología de *Pseudomonas syringae*, fundamentalmente en la caracterización de factores de virulencia y en la biología de plásmidos nativos. En 2000 recibió el Premio Joven de Investigación BBVA-Universidad. Desde 2005 es Presidente del Grupo Especializado Microbiología de Plantas y, desde 2006, vocal electo de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Fitopatología.



Antonio de Vicente Moreno se licenció en Ciencias Biológicas en la Universidad de Granada (1979) y es Doctor por la Universidad de Málaga (1986). Es Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la UMA, donde realizó su Tesis Doctoral sobre *Pseudomonas aeruginosa* en aguas. En una primera etapa postdoctoral trabajó en métodos microbiológicos para detectar toxicidad química. Desde 1992 dirige el grupo de investigación "Microbiología y Patología Vegetal", que se dedica al estudio de diferentes aspectos de bacterias (*Pseudomonas syringae*) y hongos (*Podosphaera fusca* y *Rosellinia necatrix*) patógenos de plantas, así como al análisis de los mecanismos bacterianos (*Pseudomonas* y *Bacillus*) implicados en el control biológico de enfermedades de plantas. Ha sido Director del Departamento de Microbiología de la UMA (1997-2008) y Vicepresidente del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas de la SEM hasta hace unos meses.



marcha entre todos. Finalmente, Juan José Borrego presentó nuestra propuesta de creación de este grupo en la reunión de la Junta Directiva de la SEM del 1 de marzo de 2002. La constitución formal del grupo, que requería que contase con al menos 30 socios, se produjo en noviembre de 2002 con una junta gestora compuesta por Jesús Murillo (Presidente), Antonio de Vicente (Vicepresidente), Alejandro Pérez-García (Secretario) y Elena Biosca, Ramón Peñalver, Anna Bonaterra y Cayo Ramos, como Vocales. La primera Junta Directiva del MiP fue elegida durante la primera reunión del grupo (MiP'05), en Cercedilla en junio de 2005, y estaba constituida por Jesús Murillo (Presidente, Universidad Pública de Navarra), Antonio de Vicente (Vicepresidente, Universidad de Málaga), Alejandro Pérez-García (Secretario, Universidad de Málaga), Emilia López-Solanilla (Tesorera, Universidad Politécnica de Madrid), Anna Bonaterra (Vocal, Universidad de Gerona) y Ramón Peñalver (Vocal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Esta Junta sigue actuando a día de hoy, con la única salvedad del relevo en la Vicepresidencia, que desde el pasado mes de Febrero ocupa Pablo Rodríguez-Palenzuela (UPM). Además, Ramón Peñalver fue designado corresponsal del grupo, desde 2007, y se encarga de contribuir a *Actualidad SEM* con minirevisiones sobre temas de actualidad en esta área científica.

LAS REUNIONES DEL MiP

Seguindo la propia idea de su concepción, la actividad del MiP más importante en sus inicios ha sido la de organizar reuniones científicas bienales. La mayoría de

nuestros socios participan en los congresos nacionales de la SEM y de la SEF, que se celebran hacia el mes de septiembre de años impares y pares, respectivamente. Por ello, consideramos la conveniencia de organizar las reuniones del MiP en una fecha intermedia entre ambos congresos, es decir, 6 meses antes o después de cada uno de ellos.

Las reuniones del MiP fueron concebidas originalmente con una estructura y una filosofía dirigidas a cumplir diversos objetivos. Un primer objetivo es el de favorecer la comunicación e intercambio científico, por lo que promovemos que las reuniones aseguren la convivencia de los investigadores en una única sede que, deseablemente, ofrezca todos los servicios necesarios para la reunión. Esta organización, al estilo de los "ejercicios espirituales", permite mantener al grupo unido durante todo el tiempo de la reunión y, en nuestra experiencia, ha intensificado el intercambio científico y la discusión entre los investigadores.

Igualmente, desde el principio nos hemos fijado como un objetivo prioritario el orientar el MiP como una plataforma científica para los jóvenes investigadores, con el propósito de conferirle una mayor proyección de futuro. Para ello, las reuniones se organizan exclusivamente a base de comunicaciones orales cortas impartidas, preferentemente, por doctorandos o jóvenes doctores, de manera que puedan iniciarse en la presentación de sus resultados en un ambiente distendido pero científicamente crítico. Asimismo, se pretende que estas presentaciones no reflejen necesariamente una investigación ya finalizada, sino, preferentemente, sus proyectos y estrategias de investigación, sus resultados más recientes y los proble-

mas técnicos o metodológicos de su trabajo. Como objetivo final, y al que mayor importancia concedemos, es el de promover la amistad entre los jóvenes científicos, y por supuesto, el encuentro de los no tan jóvenes. La experiencia aportada por las tres reuniones que ya ha celebrado el grupo ha mostrado que estas jornadas de convivencia, en la que los jóvenes comparten sus problemas profesionales y en las que disponen de tiempo para socializar, se establece una intensa relación de amistad. Entendemos que estas relaciones de amistad promueven la comunicación, el altruismo y la lealtad, y serán sin duda la mejor base para que nuestros futuros investigadores establezcan colaboraciones científicas fructíferas.

Los detalles de las tres reuniones del MiP celebradas hasta el momento se recogen en la **Tabla 1**.

rizosféricas con potencial utilización en el control biológico de *Rosellinia necatrix* en aguacate”, presentada por F.M. Cazorla; D.J. Ruiz-Romero, C. Pliego, M.A. González-Sánchez, A. Pérez-García, G. Bloemberg, B.J.J. Lugtenberg, R. Perez-Jiménez, C. Ramos, y A. de Vicente recibió el premio SEM, mientras que la comunicación “Presencia de la actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa en diversos aislados de *Lotus* y *Dorycnium spectabile*”, presentada por J. Donate Correa, R. Pérez Galdona y M. León Barrios recibió el premio MiP. En el XXI Congreso Nacional de 2007, en Sevilla, recibió el premio MiP la comunicación “Análisis estructural de tumores de olivo inducidos por la infección de *Pseudomonas savastanoi*”, presentada por L. Rodríguez-Moreno, A. J. Jiménez y C. Ramos.

Reunión	Fechas	Sede	Nº Participantes	Comunicaciones	Instituciones
MiP '05	6-8 junio, 2005	Residencia Lucas Olazábal Cercedilla (Madrid)	53	31	7 Universidades 1 Centro CSIC 4 Institutos regionales
MiP '07	7-9 marzo, 2007	Hotel Alay Benalmádena (Málaga)	63	42	9 Universidades 2 Centros CSIC 4 Institutos regionales
MiP '09	18-20 febrero, 2009	Estación Experimental del Zaidín (Granada)	85	49	10 Universidades 2 Centros CSIC 3 Institutos regionales

Tabla 1. Reuniones bienales organizadas por el grupo especializado Microbiología de Plantas. Los resúmenes de cada reunión, así como la lista de participantes y otros datos pueden encontrarse en la página web del grupo (<http://www.semicro.es/>, <http://microplantas.wordpress.com/reuniones/>)

LOS SIMPOSIOS Y PREMIOS DEL MiP

Como el resto de los grupos especializados de la SEM, el MiP también ha organizado simposios especializados durante la celebración de los Congresos Nacionales de la SEM, comenzando en el XX Congreso Nacional celebrado en Cáceres en el año 2005 (**Tabla 2**). La temática de estos simposios ha sido seleccionada con el afán de que cubran temas de mucha actualidad y de interés amplio para el grupo, así como que sean impartidos por ponentes con una destacada trayectoria científica; en particular, tuvimos el honor de contar como primer ponente de estos simposios con Tomás Ruiz-Argüeso, que es un destacado pionero de la investigación en microbiología de plantas en España. El simposio que organizamos este año en Almería estará dedicado a la memoria de nuestro compañero Antonio Palomares, a quien desafortunadamente perdimos hace un año y medio.

En el marco de las distinciones otorgadas por la SEM a las mejores comunicaciones libres en los congresos Nacionales de esta sociedad, se ha concedido hasta el momento un premio en metálico (300 €) y un diploma a tres comunicaciones libres en el grupo Microbiología de Plantas. En el XX Congreso de Microbiología de Cáceres, la comunicación “Aislamiento y caracterización de bacterias

MÁS INFORMACIÓN SOBRE EL MiP

El grupo cuenta con una página web (<http://microplantas.wordpress.com/>) en la que se recoge información detallada del grupo. La página ha sido preparada por nuestro webmaster, Pablo Rodríguez-Palenzuela, y está concebida como un blog en el que se incluyen comentarios de artículos y revisiones sobre temas de actualidad de la microbiología de plantas; igualmente, existe una dirección de correo en la que se puede contactar con el grupo. Dado que la página entró en funcionamiento a mediados de febrero de este año, todavía quedan contenidos por cargar y secciones por construir. En concreto, planeamos dedicar una página a los miembros del grupo con una descripción de sus líneas de investigación y enlaces a sus páginas personales. Desde aquí os animamos a que visitéis nuestra página web, y a que nos enviéis vuestras sugerencias y comentarios.

Por último, las personas interesadas en pertenecer al grupo deben primero pertenecer a la SEM; las solicitudes de ingreso y la información necesaria pueden encontrarse en la página web de la SEM (<http://www.semicro.es/>) o solicitándola por correo en la secretaría de la sociedad (orgra46@orgc.csic.es). En estos momentos el grupo cuenta ya con 42 miembros y desde aquí hacemos un lla-

mamiento a todos los investigadores relacionados con la Microbiología de Plantas para que se incorporen a la SEM y al Grupo.

BIBLIOGRAFÍA

Coombes BK (2009) Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Trends Microbiol* **17**: 89-94.

Galán JE, Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.

Haldar K, Kamoun S, Hiller NL, Bhattacharje S, van Ooij C (2006) Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat*

Rev Microbiol **4**: 922-931.

He SY, Nomura K, Whittam TS (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *BBA-Mol Cell Res* **1694**: 181-206.

Prithiviraj B, Weir T, Bais HP, Schweizer HP, Vivanco JM (2005) Plant models for animal pathogenesis. *Cell Microbiol* **7**: 315-324.

van Baarlen P, van Belkum A, Summerbell RC, Crous PW, Thomma B (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol Rev* **31**: 239-277.

Verhaert J, Vanderleyden J, Michiels J (2005) Bacterial endocytic systems in plants and animals: Ca²⁺ as a common theme? *Crit Rev Plant Sci* **24**: 283-308.

Lugar y fecha	Simposio	Moderadores	Ponente, adscripción y título de la ponencia
XX Congreso Nacional de Microbiología. Cáceres, 2005	Aspectos moleculares de la interacción microbio-planta	María M. López (IVIA) y Emililo Montesinos (Univ. de Gerona)	Tomás Ruiz-Argüeso (Univ. Politécnica de Madrid). <i>Oxidación de hidrógeno por bacterias endosimbióticas de las leguminosas: Factores limitantes y su eliminación por estrategias genético moleculares.</i> Alejandro Pérez-García (Univ. de Málaga). <i>Metabolismo del nitrógeno en interacciones patógeno-planta.</i> Pablo Rodríguez-Palenzuela (Univ. Politécnica de Madrid). <i>Herramientas genómicas y proteómicas al estudio de la podredumbre blanda de los vegetales.</i> Antonio di Pietro (Univ. de Córdoba). <i>Mecanismos de virulencia en Fusarium oxysporum, un patógeno multihospedador de plantas y mamíferos</i>
XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla, 2007	El control biológico, un caso complejo de ecología microbiana	Antonio de Vicente (Univ. de Málaga)	Emililo Montesinos (Universidad de Gerona). <i>Plaguicidas microbianos: entre la ecología y la biotecnología.</i> María M. López (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). <i>Métodos potenciales y actuales del control biológico de bacterias fitopatógenas.</i> Francisco M. Cazorla (Universidad de Málaga). <i>¿Cómo seleccionar bacterias candidatas a agentes de biocontrol?</i> Enrique Monte (Universidad de Salamanca) <i>¿Puede Trichoderma incrementar el poder insecticida de una planta?</i>
XXII Congreso Nacional de Microbiología. Almería, 2009	Mecanismos de detección e incorporación de nutrientes y señales por bacterias asociadas con plantas	José M. Palacios (Univ. Politécnica de Madrid)	Miguel Ángel Caviedes Formento (Univ. de Sevilla) <i>In memoriam Antonio Palomares.</i> Manuel Espinosa Urgel (Estación Experimental del Zaidín, CSIC). <i>Intercambio de señales en la interacción mutualista planta - Pseudomonas putida.</i> Pablo Rodríguez-Palenzuela (Univ. Politécnica de Madrid). <i>Dickeya dadantii y Pseudomonas syringae: dos modelos distintos de patogenicidad en plantas.</i> Joaquina Nogales Díaz (Estación Experimental del Zaidín, CSIC). <i>Posible implicación de los péptidos en la interacción Rhizobium-leguminosa.</i> Jose Manuel Palacios Alberti (Univ. Politécnica de Madrid). <i>Transporte y homeostasis de níquel en Rhizobium leguminosarum.</i>

Tabla 2. Simposios organizados por el MiP en las distintas ediciones del Congreso Nacional de Microbiología.

Pseudomonas syringae pv *tomato* DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas

Emilia López Solanilla y Pablo Rodríguez Palenzuela
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas.
Universidad Politécnica de Madrid-INIA.
Campus de Montegancedo. Pozuelo de Alarcón 28223. Madrid
emilia.lopez@upm.es y pablo.rpalenzuela@upm.es

En condiciones ideales las plantas cultivadas pueden producir altos rendimientos, pero tales condiciones raramente ocurren. En general, los cultivos se ven afectados por estreses bióticos y abióticos que merman la producción. Se estima que las pérdidas mundiales debidas a enfermedades, plagas y malas hierbas oscilan entre el 31 y el 42 % (Agrios, 2005). No obstante, las pérdidas pueden ser dramáticas en algunos casos particulares. Además, las enfermedades producidas por bacterias, virus u hongos pueden afectar a la calidad del producto, producir efectos tóxicos en humanos y animales (como es el caso de las micotoxinas fúngicas) o incluso impedir completamente determinados cultivos en algunas áreas (Agrios, 2005).

Las enfermedades producidas por bacterias son particularmente difíciles de controlar debido fundamentalmente a dos razones:

- 1.- las bacterias se reproducen exponencialmente en condiciones favorables alcanzando grandes poblaciones en el interior o en la superficie de las plantas.
- 2.- al contrario que en el caso de los hongos, hay muy pocas sustancias agroquímicas efectivas contra estas enfermedades. Tradicionalmente el cobre se ha empleado como fitosanitario, aunque las poblaciones de bacterias desarrollan fácilmente resistencia a este elemento. Alternativamente se han empleado algunos antibióticos como la kasugamicina, con el riesgo que esto supone por el desarrollo de cepas resistentes.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 (PSPTO) Y *Dickeya dadantii* 3937 (DD 3937): DOS BACTERIAS MODELO EN FITOPATOLOGÍA.

PsPto y Dd 3937 han sido muy estudiadas a nivel molecular y genómico en los últimos años, y se han desarrollado numerosas herramientas para analizar diferentes aspectos

de su virulencia (ASAP: <https://asap.ahabs.wisc.edu/> y PPI: http://pseudomonas-syringae.org/pst_home.html).

PsPto es el agente causal de la mancha bacteriana del tomate y otras plantas hospedadoras. Este patógeno está incluido en la lista de “organismos dañinos y enfermedades que afectan a la calidad del tomate” (Commission Directive 92/33/EEC of 2 July 1993). La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de síntomas necróticos en hojas, tallos y frutos. La bacteria también puede crecer como epífita y endófita en la parte aérea de las plantas sin causar síntomas. Una vez en el interior de la planta, PsPto es capaz de multiplicarse en el espacio apoplástico explotando las células vivas circundantes e infectando tejidos adyacentes, por lo que esta bacteria suele considerarse un patógeno hemibiotrofo.

Aunque se han descrito diversos mecanismos implicados en la virulencia de PsPto tales como la producción de toxinas, hormonas o enzimas degradadoras de la pared celular, el componente esencial de la virulencia de esta bacteria es el sistema de secreción tipo III (T3SS). Dicho sistema, codificado por los genes *hrp* y *hrc* es necesario para la elicitación de la HR (respuesta hipersensible) en plantas no hospedadoras, así como para la patogénesis en plantas hospedadoras (Alfano y Collmer, 1996). El repertorio de los efectores proteicos inyectados en las células vegetales a través de este sistema ha recibido una considerable atención en los últimos años, poniendo de manifiesto el papel esencial de estas proteínas en la patogénesis. Los efectores contribuyen a la virulencia combatiendo las defensas de la planta y controlando la muerte celular asociada con los síntomas característicos de esta enfermedad. Investigaciones a nivel genómico han identificado más de 30 genes efectores. Alguno de estos efectores son capaces de suprimir la defensa innata de las plantas; no obstante el modo de acción de dichas proteínas sigue siendo poco conocido.

El otro modelo de bacteria fitopatógena en el que estamos interesados es *D. dadantii*, uno de los agentes causales de la podredumbre blanda de los vegetales. Esta enfermedad ocurre comúnmente en tejidos no lignificados de hortalizas y plantas ornamentales. La podredumbre blanda se produce en todo el mundo y ocasiona unas pérdidas totales superiores a cualquier otra enfermedad bacteriana (Agrios, 2005). Existe una directiva de la Comisión Europea (93/17/EEC of 30 March 1993) acerca de la calidad de la patata de siembra que establece que el tubérculo madre debe estar libre de diversos organismos perjudiciales, entre los que se encuentra *Dd 3937*.

Los síntomas de la podredumbre blanda comienzan como lesiones acuosas cuyo diámetro engrosa rápidamente. El tejido afectado se macera (color pardo, blando, viscoso y con mal olor). La maceración es fundamentalmente el resultado de enzimas hidrolíticas secretadas por la bacteria que destruyen la integridad de las paredes celulares de las plantas. *D. dadantii* es especialmente perniciosa debido a su capacidad de causar infecciones latentes, las cuales se activan en postcosecha. Además, *Dd 3937* puede sobrevivir como saprofito, epifito o endofito, siendo un habitante frecuente de las hojas, aguas continentales y suelos. Recientemente *Dickeya* sp. ha sido identificada como un problema emergente en Europa, incluida España.

La patogenicidad de *Dd 3937* ha sido intensamente estudiada a nivel molecular durante las últimas décadas. La aproximación tradicional hacía énfasis en el papel de las múltiples enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de las plantas liberando nutrientes que permiten el crecimiento bacteriano (Toth et al., 2003).

A pesar de que *PsPto* y *Dd 3037* suelen considerarse como especies modelo de “estilos de patogenicidad” muy diferentes, también comparten determinantes de virulencia, aunque el papel relativo en el proceso patogénico es diferente en cada caso. Por ejemplo T3SS es el factor de virulencia más importante en *PsPto* pero tiene un papel secundario en *Dd 3937*. Por tanto, el conocimiento adquirido en alguno de estos sistemas puede complementar al conocimiento del otro.

CONTEXTO TEMPORAL EN EL PROCESO PATOGENICO

Independientemente de cual sea su estilo de patogenicidad, un patógeno exitoso tiene que ser capaz de:

- 1.- Entrar en el tejido vegetal a través de aperturas naturales como los estomas o las heridas.
- 2.- Sobrevivir en las condiciones desfavorables prevalentes en el apoplasto.
- 3.- Utilizar y manipular los recursos de la planta para promover su propio crecimiento.

Por ello, para lograr una imagen completa de este proceso es esencial profundizar sobre la progresión de la infección en un contexto espacio-temporal. Este conocimiento puede facilitar el desarrollo de nuevas herramientas para el control de la enfermedad.

La entrada de la bacteria es una cuestión esencial en fitopatología dado que las bacterias, al contrario que los hongos, carecen de estructuras específicas para lograr el ingreso en la planta. Se acepta generalmente que las bacterias penetran a través de aperturas naturales (estomas, lenticelas) o heridas. No obstante quedan varias preguntas sin contestar: ¿Se mueven las bacterias en la superficie de las plantas? en caso afirmativo ¿se mueven mediante *swimming* o por otro tipo de movimiento? La quimiotaxis permite a las células bacterianas acercarse a determinados estímulos y alejarse de otros. Hasta el momento ha habido pocos estudios que aborden la cuestión del papel de la motilidad y quimiotaxis en bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, mutantes móviles pero no quimiotácticos de *Ralstonia solanacearum* están significativamente reducidos en virulencia en plantas de tomate, lo que indica que la motilidad dirigida y no el movimiento al azar es necesario para la virulencia completa.

La disponibilidad del genoma completo de *Dd 3937* nos ha permitido identificar algunos genes candidatos en esta bacteria posiblemente implicados en quimiotaxis (*cheB*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*, *motA*). La funcionalidad de estos genes ha sido analizada mediante mutagénesis dirigida, seguida por el análisis de la capacidad de las cepas mutantes de nadar en agar blando. Nuestros análisis de la virulencia en diferentes plantas hospedadoras han demostrado que la motilidad y quimiotaxis juega un papel importante en la patogenicidad de esta bacteria (Antunez-Lamas et al., 2009) (Figura 1).

Estos resultados nos llevaron a formular la hipótesis de que esta bacteria es capaz de percibir señales y moverse hacia los posibles sitios de entrada. El jasmonato es un compuesto clave en la señalización de la defensa vegetal y es sintetizado en tejidos con heridas. Así mismo hemos encontrado que esta molécula constituye un quimiotrayente fuerte para la bacteria fitopatógena *Dd 3937*. Empleando la técnica de hibridación de micromatrices de ADN hemos observado que un tratamiento con jasmona-



Figura 1. Virulencia de cepas mutantes en *SaintPaulia lonantha*. Se inocularon dos hojas opuestas de cinco plantas con 5×10^6 células de cada cepa (Wt, *cheB*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*, *motA*). Se realizaron experimentos duplicados en cámara de cultivo a 28°C y los síntomas fueron registrados tres semanas después de la inoculación. La figura muestra síntomas típicos.

Emilia López Solanilla

(Puertollano, 1970) es Bióloga por la Universidad Complutense de Madrid; su tesis doctoral, bajo la dirección del Profesor Pablo Rodríguez Palenzuela, versó sobre la resistencia a péptidos antimicrobianos en bacterias fitopatógenas. En 2001-2002 Realizó una estancia post-doctoral en el *Plant Pathology Department* de la Universidad de Cornell (NY, USA) y posteriormente se incorporó al Departamento de Biotecnología de la E.T.S.I. Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid como Profesor Contratado Doctor. En la actualidad dirige junto al Profesor Pablo Rodríguez Palenzuela un grupo de investigación de fitobacteriología Molecular en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. UPM-INIA.



Pablo Rodríguez Palenzuela

(Madrid, 1959) es Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Madrid y Máster en Bioinformática y Biología Computacional por la Universidad Complutense de Madrid; su tesis doctoral, bajo la dirección del Profesor Francisco García-Olmedo, versó sobre péptidos antimicrobianos en plantas. Realizó una estancia post-doctoral en el *Plant Pathology Department* de la Universidad de Cornell (NY, USA) y desde entonces lleva trabajando en distintos aspectos de la patogenicidad de bacterias en plantas. Es Profesor Titular de Universidad desde 1992 en el Departamento de Biotecnología de la E.T.S. Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid.



to induce la expresión de un subconjunto de genes bacterianos posiblemente implicados en la virulencia/supervivencia en el apoplasto vegetal. En línea con este hecho, observamos que células bacterianas pretratadas con jasmonato incrementaban su virulencia en hojas de endibia y Saint Paulia. También hemos encontrado que las heridas en los tejidos incrementan el movimiento bacteriano en la superficie vegetal en dirección a dichas heridas. Más aun, el mutante de *Arabidopsis* deficiente en la síntesis de jasmonato (*aos-1*) resulta ser más resistente a la entrada de *Dd 3937* que la planta silvestre (**Figura 2**). Estos resultados son congruentes con la hipótesis de que la percepción del jasmonato por la bacteria ayuda al patógeno a ingresar en el tejido vegetal (Antúñez-Lamas, 2008 Tesis doctoral).

La supervivencia de la bacteria en el apoplasto es uno de los factores clave para el establecimiento de una población bacteriana capaz de colonizar el tejido vegetal. Este nicho, el apoplasto de la planta, constituye un medio inhóspito para la bacteria, ya que es rico en sustancias antimicrobianas (preformadas e inducibles) capaces de inhibir el crecimiento del patógeno. De hecho, las plantas producen diversos metabolitos secundarios, tales como fitoalexinas, péptidos y alcaloides, y está generalmente aceptado que juegan un papel relevante en la protección de las plantas contra los patógenos (Dixon, 2001). A su vez, los patógenos han desarrollado sistemas para contrarrestar el efecto de las sustancias antimicrobianas, como por ejemplo, las bombas de extrusión (MDRs: *multidrug resistance*), así como mecanismos específicos de resistencia.

Los sistemas MDRs pueden reconocer y expeler diversos compuestos orgánicos (a menudo estructuralmente dispares), confiriendo resistencia a los mismos. Los genes que codifican MDRs son abundantes y ubicuos entre las bacterias Gram negativas, suponiendo más del 10% de los transportadores totales en un organismo. Palumbo y colaboradores encontraron que una bomba de extrusión de isoflavonoides en *Agrobacterium tumefaciens* estaba implicada en el proceso de colonización de raíces de alfalfa (Palumbo et al., 1998). Otros descubrimientos recientes

están en línea con esta idea: por ejemplo, Barabote y colaboradores describieron que la inactivación de TolC en *Dd 3937* tiene un efecto dramático en la patogénesis. TolC es un componente de la membrana externa de varios sistemas MDRs de la familia RND, por tanto esta mutación está afectando a la función de un gran número de transportadores al mismo tiempo (Barabote et al., 2003). También, Burse y colaboradores encontraron que la mutación en el transportador AcrAB de *Erwinia amylovora* producía una reducción de la virulencia en manzanos (Burse et al., 2004).

Nuestro grupo ha llevado a cabo el análisis de la relación entre diferentes sistemas MDR y la virulencia de *Dd 3937* a través de la identificación y mutagénesis de dichos sistemas seguido del análisis experimental de la virulencia (Maggiarani Valecillos et al., 2006). La conclusión más destacable de este trabajo es que, a pesar de disponer de un número alto de sistemas MDR, la mutación en uno concreto puede tener un efecto dramático en la virulencia. En contraste, la mutación que afecta a la producción de una isoenzima de pectato liasa no tiene efectos aparentes en la mayoría de los casos y es necesario mutar más de un gen para observar un efecto significativo en virulencia.

En *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, se han identificado genes homólogos de la bomba MexAB-OprM. La determinación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) frente a un amplio rango de sustancias antimicrobianas pone de manifiesto que la mutación en esta bomba reduce notablemente la tolerancia a los mismos. Además, la capacidad de este mutante para multiplicarse en planta está severamente reducida.

Uno de los componentes de la denominada inmunidad de las plantas es la producción de péptidos antimicrobianos. Se han identificado diversas familias de péptidos de este tipo, como son las tioninas, defensinas y *snakins* (García-Olmedo et al., 1998). Para todas ellas se ha descrito actividad antimicrobiana *in vitro*. Una evidencia adicio-

nal sobre la implicación de estos péptidos en los mecanismos de defensa de la planta surge del aislamiento y caracterización de mutantes bacterianos hipersensibles a estos péptidos, y que además muestran una menor virulencia en planta (López-Solanilla et al., 1998; López-Solanilla et al., 2001; Titarenko et al., 1997).

Nuestro laboratorio ha contribuido al estudio de estos y otros aspectos de la patogénesis de *Dd* 3937, tales como la resistencia a estrés oxidativo (Miguel et al., 2000) y al pH ácido del apoplasto (Llama-Palacios et al., 2003; Llama-Palacios et al., 2005).

La manipulación de algunos procesos vegetales por parte de la bacteria es un paso necesario para la patogenicidad; en particular, la modulación de los mecanismos de defensa ha sido objeto de un gran interés en los últimos años.

Los mecanismos de defensa frente a *PsPto* pueden ser divididos en dos grandes vías. Una es activada por el reconocimiento de moléculas esenciales conservadas en la mayoría de los microbios, denominadas en inglés PAMPs o MAMPs (*Pathogen-associated or Microbe-associated molecular patterns*). Esta respuesta, conocida como respuesta basal, se denomina actualmente PTI (*PAMP-triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006). En plantas susceptibles, *P. syringae* puede suprimir las defensas basales a través de la acción de efectores que inactivan los mecanismos de vigilancia y de transducción de señal relacionados con la defensa. La otra vía de defensa que tiene lugar en plantas resistentes es activada por el reconocimiento de efectores específicos (conocidos como proteínas Avr) o por sus efectos en las células vegetales. Este reconocimiento llevado a cabo por proteínas de resistencia (R) de la planta es conocido como ETI (*Effector-triggered Immunity*) (Jones y Dangl, 2006). Esta respuesta inmune incluye la inducción de una muerte celular localizada conocida como HR. ETI y PTI comparten vías de señalización aunque la primera de las respuestas es más rápida e intensa.

Existen evidencias acerca de la supresión de PTI en plantas llevada a cabo por diversos efectores de *PsPto* como AvrPto1, AvrE, HopM1 (HopPtoM). Algunos otros han sido implicados en la supresión de la HR: HopAB2 (AvrPtoB), HopD1 (HopPtoD1), HopE1 (HopPtoE), HopF2 (HopPtoF), HopK (HopPtoK), HopN1 (HopPtoN) y HopU1

(Block et al., 2008). El descubrimiento de un número tan alto de efectores implicados en este proceso revela que esta supresión juega un papel fundamental en la patogénesis de esta bacteria. Se ha propuesto que la muerte celular programada asociada con la respuesta HR es el resultado de un nivel determinado de señales inductoras de la planta. Los efectores T3SS podrían actuar como una herramienta para suprimir el nivel de señalización necesaria para inducir una muerte celular derivada de una respuesta tipo PTI o ETI. Datos preliminares sugieren que los procesos que conducen a una muerte celular programada o a una muerte asociada con la enfermedad comparten etapas comunes y que las principales diferencias entre ambos procesos podrían radicar simplemente en el número de células que inducen la respuesta, junto al periodo de tiempo en el

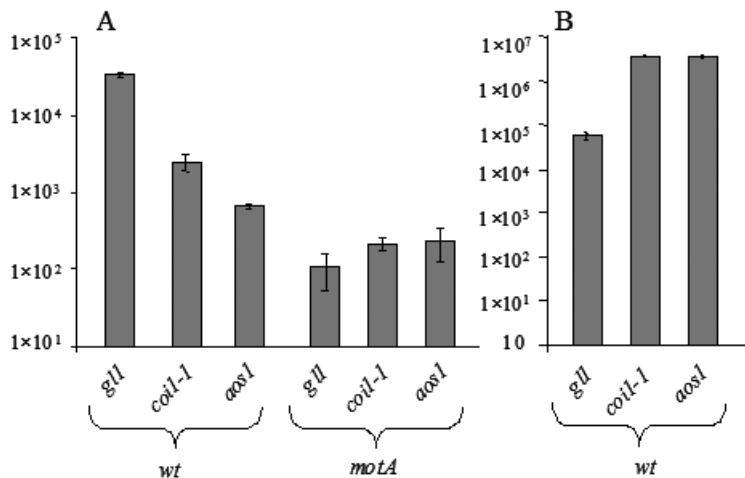


Figura 2. Población bacteriana de *D. dadantii* en hojas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*gll*) y mutantes defectivos en *jasmónico* (*coi1-1* y *aos1*). 10⁵ células de *Dd* 3937 se inocularon en 5 plantas de cada tipo. **A. Las poblaciones bacterianas se estimaron después de 1 hora. Las diferencias entre la planta silvestre y los mutantes fueron significativas de acuerdo con un test F de Snedecor ($P \leq 0.05$). **B.** Las poblaciones bacterianas se estimaron después de 24 horas. Las diferencias entre la planta silvestre y los mutantes fueron significativas de acuerdo con un test F de Snedecor ($P \leq 0.05$). El mutante de *Dd* 3937 *motA* se empleó como control negativo de la entrada en el tejido vegetal.**

cual esta respuesta es producida.

La actividad bioquímica de los efectores con capacidad supresora de la muerte celular no es conocida en la mayoría de los casos, pero sus dianas en la planta deben estar implicadas en la regulación del proceso de la muerte celular. Por tanto, un conocimiento detallado de este proceso puede permitir el diseño de herramientas útiles para el control de la enfermedad.

HopN1 ha sido descrito como una cisteín-proteasa capaz de suprimir la muerte celular asociada tanto con la HR como con la enfermedad (López-Solanilla et al., 2004). Uno de los proyectos en desarrollo en nuestro grupo está enfocado hacia la caracterización funcional de este efector.

El papel específico del T3SS en la patogenicidad de *Dd* 3937 no es bien conocido, pero podría estar también implicado en la modulación de la respuesta de defensa de la planta en los primeros estadios de la infección.

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado anteriormente, los mecanismos de patogenicidad asociados a determinadas etapas de la infección son bien conocidos en algunas especies de bacterias fitopatógenas. La posibilidad de analizar la patogenicidad como un proceso secuencial hace más probable la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de estrategias eficientes en el control de enfermedades.

Nuestro objetivo general es el estudio de aspectos particulares del proceso patogénico en *PsPto* y *Dd 3937* aprovechando el conocimiento y experiencia previa del grupo en uno u otro sistema. Esta aproximación complementaria puede conducir a nuevos descubrimientos en ambos sistemas.

Las preguntas más importantes que nos planteamos son:

- ¿Cuáles son los receptores moleculares (MCPs) implicados en el movimiento/entrada de estos patógenos en las plantas?
- ¿Cuál es la función de los determinantes moleculares de la resistencia bacteriana a compuestos tóxicos y cuál es la regulación de la misma?
- ¿Cuál es el papel de la modulación bacteriana de la muerte celular de la planta durante los estadios iniciales de la infección?

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G. (2005) *Plant Pathology*. New York: Elsevier Academic press.
- Alfano JR y Collmer A. (1996) Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**: 1683-1698.
- Antunez-Lamas M, Cabrera-Ordóñez E, López-Solanilla E, Raposo R, Trelles-Salazar O, Rodríguez-Moreno A y Rodríguez-Palenzuela P. (2009) Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology* **155**: 434-442.
- Barabote RD, Johnson OL, Zetina E, San Francisco SK, Fralick JA, y San Francisco MJD. (2003) *Erwinia chrysanthemi* tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J. Bacteriol.* **185**: 5772-5778.
- Block A, Li G, Fu ZQ y Alfano JR. (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396-403.
- Burse A, Weingart H y Ullrich MS. (2004) NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 693-703.
- Dixon RA. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM y Rodríguez-Palenzuela P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**: 479-491.
- Jones JD y Dangl JL. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- López-Solanilla E, Bronstein PA, Schneider AR y Collmer A. (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol* **54**: 353-365.
- López-Solanilla E, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (1998) Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**: 917-924.
- López-Solanilla E, Llama-Palacios A, Collmer A, García-Olmedo F, y Rodríguez-Palenzuela P. (2001) Relative effects on virulence of mutations in the *sap*, *pel*, and *hrp* loci of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 386-393.
- Llama-Palacios A, López-Solanilla E, Poza-Carrión C, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (2003) The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Mol. Microbiol.* **49**: 347-357.
- Llama-Palacios A, López-Solanilla E y Rodríguez-Palenzuela P. (2005) Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. *J Bacteriol* **187**: 2157-2162.
- Maggiorani Valecillos A, Rodríguez Palenzuela P y López-Solanilla E. (2006) The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 607-613.
- Miguel E, Poza-Carrión C, López-Solanilla E, Aguilar I, Llama-Palacios A, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (2000) Evidence against a direct antimicrobial role of H₂O₂ in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 421-429.
- Palumbo JD, Kado CI y Phillips DA. (1998) An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* **180**: 3107-3113.
- Titarenko E, López-Solanilla E, García-Olmedo F y Rodríguez-Palenzuela P. (1997) Mutants of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *J. Bacteriol.* **179**: 6699-6704.
- Toth I, Bell KS, Holeva MC y Birch P. (2003) Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathology* **4**: 17-30.

Nuevos socios de la SEM

Altas del 15/11/08 al 29/04/09

Alonso Ezcurra, M^a Henar
Amblar Esteban, Mónica
Belda Ferre, Pedro
Belenguer Ferrando, Alvaro
Bernal Guzmán, Patricia
Broto Hernández, Alicia
Cabrera Rubio, Raúl
Cid Sánchez, Cristina
Christie de Oleza, Joseph Alexander
Delgado Palacio, Susana
Delgado Santander, Ricardo
Espinoza Jiménez, Adriana Carolina
Fernández Juárez, Javier

Fernandez-Murga Chavanne, M. Leonor
Floriano Pardal, Belén
García Descalzo, Laura
Guitart Bas, Raimon
Hernández Mariné, Mariona
Juárez Jiménez, Belén
López Cabo, Marta
López Diéguez, Ana Belén
López Siles, Mireia
Lucena Reyes, Teresa
Luque Caballero, María Isabel
Lluch Senar, María
Maldonado Ortiz, Juan
Martínez Pérez, Remigio
Martínez-Abarca Pastor, Francisco

Merroun, Mohamed Larbi
Palomo Guijarro, Gonzalo
Peñarrubia Lozano, Luis
Polo Montero, David
Puyen Guerra, Zully Margoth
Rodríguez Herrera, Juan José
Rodríguez Jiménez, Alicia
Rojo Moreno, Marta
Rubio López, Virginia
Sacristán Beneyas, M^a Soledad
Scotti, Mariela
Solera Segura, Elena
Uhía Castro, Iria
Valderrama Traslaviña, Andrés
Vilellas Arilla, M^a Cristina

CECT, año 2008

Esperanza Garay
Colección Española de Cultivos Tipo



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

Como continuación de la certificación obtenida en 2004 según la norma ISO 9001:2000 para "la preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos y levaduras)", la CECT ha superado satisfactoriamente en noviembre la primera auditoría de renovación tras hacer lo propio en las auditorías de seguimiento de 2005 y 2006 (seguimiento) y 2007 (renovación).

INVESTIGACIÓN

a) **Proyectos:** La CECT ha participado en 4 proyectos de investigación a nivel nacional y ha continuado perteneciendo a la Red Valenciana de Investigación Vinculada (REVIV). Con fecha 1 de diciembre de 2008 ha comenzado el proyecto titulado *Demonstration Project for a GLOBAL BIOLOGICAL RESOURCE CENTRE NETWORK (GBRCN)*, auspiciado e impulsado por la OCDE. En él participan 17 entidades de Europa, Asia y Sudamérica. Por parte de España la representante es la CECT. La Investigadora Principal por la CECT es Esperanza Garay.

b) **Publicaciones y comunicaciones en congresos y reuniones científicas:** El personal de la CECT ha publicado 5 artículos en revistas. También se ha defendido la Tesis Doctoral de Juan Francisco Martínez Blanch (más información en el nº 46 de *Actualidad SEM*), y su personal ha participado en 9 reuniones o congresos científicos nacionales e internacionales.

FORMACIÓN

El personal de la CECT ha continuado impartiendo el curso: "Conservación y control de cepas microbianas" (Certificado de post-grado teórico-práctico, Univ. de Valencia, X edición), cuya XI edición tendrá lugar en enero de 2010, y ha asistido a diversos cursos de formación.

MEJORAS EN EL PERSONAL

a) **Personal de plantilla.** Laura López Ocaña ha superado con éxito la prueba de acceso al grupo A, por el turno libre sector de administración especial, escala técnica superior de conservadores de colecciones científicas (perfil colección española de cultivos tipo) de la *Universitat de València*.

b) **Contratos.** Se han renovado los contratos vigentes y se han contratado dos técnicos (Ana Igual Wöllstein y Rosa M^a Giménez Cifuentes) y otra Oficial de Laboratorio, M^a José Ros Fernández.

c) **Becas.** Se ha renovado la beca de M^a Rosa Suntaxi Escobar, técnico de FP y se ha incorporado a una nueva becaria de investigación, Teresa Lucena Reyes.

CONVENIOS VIGENTES CON ORGANISMOS OFICIALES O EMPRESAS

La CECT tiene suscritos dos convenios con empresas y uno con el KRIBB (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology), que incluye a la KCTC (Korean Collection for Type Cultures).

SERVICIOS PRESTADOS

Depósitos con fines de patente como Autoridad Internacional:	56
Nuevas cepas en depósito público:	89
Nuevas cepas en depósito restringido:	2
Identificaciones:	172
Cepas liofilizadas por encargo:	6
Cepas suministradas:	3857

LA CECT CONSOLIDA SU CONDICIÓN DE CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS A NIVEL INTERNACIONAL

Además del proyecto de demostración ya reseñado en el apartado de investigación, hay que destacar la participación de la CECT en el proyecto titulado: "European Consortium of Microbial Resource Centres -EmbaRC" (FP7-228310), financiado por el 7º Programa Marco de la Comunidad Europea (INFRA-2008-1.1.2.9: *Biological Resources Centres (BRCs) for microorganisms*).

En él participa la CECT junto a otras siete colecciones europeas (CIRM-INRA, Francia; CRBIP, Francia; BCCM, Bélgica; CBS, Holanda; CABI, Reino Unido; MUM, Portugal; DSMZ, Alemania). La duración es de tres años (febrero 2009- febrero 2011), y la coordinadora es Sylvie Lortal (INRA, *Institut National de la Recherche Agronomique*, Francia).

El Investigador Principal por la CECT-UVEG es David Ruiz Arahál, Profesor Contratado Doctor del Departamento de *Microbiología i Ecología* de la *Universitat de València*.

Visítenos en www.cect.org

BACTERIAS

FITOPATÓGENAS:

¿ES POSIBLE SU PREVENCIÓN?



Figura 1. Síntomas de tumores en olivo causados por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. (Foto A. García)

**Ramón Peñalver,
Pablo Llop,
Ester Marco-Noales
y María Milagros López.**
Equipo de Bacteriología,
Centro de Protección Vegetal y
Biotecnología,
Instituto Valenciano de Investigaciones
Agrarias (IVIA).

Las bacterias fitopatógenas causan enfermedades en plantas cultivadas y producen anualmente cuantiosas pérdidas en todos los países de la Unión Europea (UE), incluida España. Sin embargo, los estudios sobre estas bacterias y las enfermedades que producen se iniciaron en España más tarde que en otros países europeos. En 1920, E.F. Smith, considerado como el padre de las bacterias fitopatógenas, en su libro “*Bacterial diseases of plants*”, describió las enfermedades conocidas en distintos países y en referencia al nuestro indicaba “Spain is a *terra incognita*”. Esta ausencia de información sobre las bacteriosis en España continuó hasta finales de la década de los 60, ya que fueron escasos los trabajos publicados sobre estas enfermedades.

El Laboratorio de Bacteriología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias fue creado en 1977 y desde entonces ha abordado proyectos relacionados con el diagnóstico, la epidemiología y el control biológico de distintas bacterias fitopatógenas. Estos proyectos han ido siempre encaminados a conocer la situación real de las enfermedades bacterianas presentes en España y a prevenir su introducción, o si estaban ya introducidas, su diseminación, mediante distintos métodos. Además, es desde 1993 el Laboratorio de Referencia para Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino.

Correspondencia: **María Milagros López.**
IVIA-Laboratorio de Bacteriología. Carretera de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.
Tel. 963424000. Fax 963424001. e-mail: mlopez@ivia.es

La prevención es el mejor remedio para el control de las bacterias fitopatógenas, ya que los tratamientos químicos disponibles y autorizados se reducen en la práctica sólo a los productos cúpricos, cuya eficacia es generalmente mediana, ya que actualmente la legislación de la Unión Europea (UE) prohíbe la utilización de antibióticos en agricultura, a pesar de su demostrada eficacia, debido a los posibles riesgos de transferencia horizontal de genes de resistencia.

Los métodos de lucha preventiva frente a las bacterias fitopatógenas son múltiples, pero se basan esencialmente en: a) la aplicación de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas que permitan detectar las bacterias en el material vegetal; b) el análisis de las características de las cepas de cada especie y su comparación molecular con las de otros orígenes; c) el conocimiento de las fuentes de inóculo y los reservorios de cada bacteriosis en nuestras condiciones; d) el estudio de las estrategias de supervivencia de

las bacterias fitopatógenas en distintos hábitats; y e) el uso de tratamientos preventivos, entre los que destaca el control biológico.

En los últimos treinta años se ha incrementado en España el número de bacteriólogos dedicados a bacterias fitopatógenas. Ello ha permitido conocer con mayor exactitud el panorama real de las bacteriosis presentes en España y concentrar esfuerzos en el control de las más importantes. El número de bacterias fitopatógenas descritas en 2006 en España era ya de 50 y entre ellas destacan las consideradas como bacterias de cuarentena según la Directiva 2000/29, por el peligro potencial que suponen para la agricultura española.

Esta presentación del grupo del IVIA de Valencia pretende justificar la labor desarrollada en las distintas etapas del laboratorio, con algunos ejemplos de modelos bacterianos que se detallan a continuación y que se han explorado con cierta profundidad (**Cuadro inferior**).

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BACTERIAS FITOPATÓGENAS DEL INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS.



Ramón Peñalver Navarro es Doctor en Biología por la Universidad de Valencia (1994) y en la actualidad es Colaborador Científico Adjunto Interino en el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), donde desarrolla estudios sobre los mecanismos implicados en el control biológico de la enfermedad de plantas producida por *Agrobacterium tumefaciens* mediante el uso de los agentes de biocontrol K84 y K1026.



María Milagros López es Dr. Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia y Profesor de Investigación del IVIA. Ha realizado estancias en laboratorios del INRA de Angers (Francia) y el USDA de Florida (EEUU). Dirige el Laboratorio de Bacteriología del IVIA, que es también el Laboratorio de Referencia de Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Agricultura (actualmente de Medio Ambiente, Rural y Marino). Es miembro del panel de bacteriólogos de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* y miembro fundador de la *European Association of Phytobacteriologists*, así como actualmente presidenta de la Sociedad Española de Fitopatología.

Ester Marco-Noales es Doctora en Biología por la Universidad de Valencia (2000) y en la actualidad es Colaboradora Científica Adjunta en el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, centrándose su investigación en aspectos epidemiológicos de diferentes bacteriosis, particularmente en las estrategias de supervivencia de algunas de las principales bacterias fitopatógenas, con especial énfasis en su supervivencia frente a condiciones de estrés ambiental.



Pablo Llop Pérez es Dr. en Biología por la Universidad de Valencia (2003) y actualmente es Colaborador Científico Adjunto en el Laboratorio de Bacteriología del IVIA, donde desarrolla investigaciones sobre nuevos métodos de detección molecular de bacterias, estudio de componentes genéticos presentes en plásmidos que controlan los factores de virulencia en *Erwinia amylovora* y estudios de supervivencia en *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por medio de marcadores moleculares y microarrays del genoma de la bacteria.

El grupo de Bacteriología del IVIA posee una dilatada experiencia investigadora reconocida a nivel nacional e internacional. Ha participado en más de 20 proyectos de I+D nacionales y en más de una decena financiados por la UE, así como en diversas Acciones Integradas o Proyectos de Colaboración. Como resultado de su investigación ha publicado más de 160 artículos científicos y de divulgación, y capítulos de libro. También se han impartido numerosas conferencias invitadas en Congresos nacionales e internacionales.

En el cuadro de la derecha se detallan las líneas de investigación que sigue el grupo.

Diagnóstico y caracterización	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Agrobacterium</i> spp. -<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> -<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> -<i>Erwinia amylovora</i> -<i>Ralstonia solanacearum</i> -<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> -<i>Xylophilus ampelinus</i> -<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>
Biología y epidemiología	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Agrobacterium</i> spp. -<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> -<i>Erwinia amylovora</i> -<i>Ralstonia solanacearum</i> -<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
Control	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Agrobacterium</i> spp. -<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>

***Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (O EL RIESGO DE LAS INFECCIONES LATENTES)**

P*seudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* es el agente causal de la tuberculosis del olivo, que produce tumores en ramas y tronco (**Figura 1**), estando considerada como la tercera enfermedad del olivo en España en cuanto a las pérdidas que produce. Por eso, se abordó inicialmente la puesta a punto de varios métodos sensibles y específicos de diagnóstico molecular basados en PCR, incluido un protocolo “multiplex” que permite detectar simultáneamente dicha bacteria y cuatro virus que afectan a este cultivo (Bertolini *et al.*, 2003). Estos protocolos desarrollados pueden ser aplicados a plantas con síntomas y a la detección de esta bacteria como epífita o endófito. Para ello se determinó, además, la metodología de muestreo más apropiada, y la época del año con máximos poblacionales (Quesada *et al.*, 2007). También se demostró la diseminación natural del patógeno en plantaciones jóvenes y el riesgo que representa la introducción de plantas enfermas. Sin embargo, todavía no se aplican métodos de detección en plantas de vivero y se considera, erróneamente, que esta bacteria es ubicua y que por ello es inútil prevenir esta enfermedad.

El estudio de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas españolas de esta especie ha permitido, por un lado, seleccionar marcadores específicos que ayudarán a comprender aspectos epidemiológicos importantes para su prevención, y, por otro, determinar los patrones de diseminación de la tuberculosis del olivo en distintas zonas. Además, se ha demostrado la eficacia preventiva de los tratamientos cúpricos, tanto en la diseminación de las poblaciones epífitas de la bacteria, responsables de nuevas infecciones, como en la disminución de los síntomas.

Por último, la evaluación comparada de la sensibilidad de las distintas variedades principales de interés agrónomo permite aconsejar, para la plantación de olivares en zonas donde la enfermedad está presente, aquellas variedades menos sensibles (Penyalver *et al.*, 2006).



Figura 2. Síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en zona vascular de tallo de tomate. (Foto M.M. López).

***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (O EL RIESGO DE LAS SEMILLAS CONTAMINADAS)**

C agente responsable del chancro bacteriano del tomate, enfermedad sistémica que produce marchitez y muerte de las plantas (**Figura 2**). Es la principal bacteriosis a nivel mundial de este cultivo, y está considerada como un organismo de cuarentena en la UE. Este patógeno había sido identificado esporádicamente en distintas zonas españolas desde 1978, pero desde 2000 han aparecido focos en Tenerife, Almería, Murcia, Valencia y Zaragoza. En varios casos se ha demostrado que la introducción de la enfermedad ha sido debida a semilla comercial contaminada, producida en países no comunitarios. La puesta a punto de nuevos métodos de diagnóstico y detección, como el inmuno-aislamiento, ha permitido aumentar la sensibilidad de los protocolos de detección de esta bacteria en las semillas, sin pérdida de fiabilidad. Esto es estrictamente necesario, ya que la baja tasa de contaminación de las semillas comerciales da lugar, con frecuencia, a falsos negativos. Los análisis mediante técnicas moleculares (ERIC-PCR, RAPD, BOX y AFLP) con cepas aisladas en distintos años en Canarias confirman la hipótesis de una única introducción (de León *et al.*, 2009).

También se han evaluado distintos compuestos químicos comerciales, y combinaciones de varios de ellos, para el posible tratamiento preventivo, ya que, una vez desencadenada la infección sistémica, resulta prácticamente imposible su control.

***Xanthomonas citri* subsp. *citri* (O CÓMO LOS FRUTOS TRANSPORTAN BACTERIAS)**

X*anthomonas citri* subsp. *citri* causa la canchrosis de los cítricos, que es una de las enfermedades más graves que puede afectarlos, dado que produce manchas eruptivas foliares y en fruto, defoliación, caída de frutos, pérdida de vigor y, por tanto, de producción (**Figura 3**). Por todo ello está también considerada como bacteria de cuarentena según la legislación europea y, afortunadamente, todavía no está presente en ningún país del Mediterráneo. Por ello, el objetivo básico es impedir su introducción en España y en los otros países de la UE que cultivan cítricos. Como está prohibida la importación de cualquier material vegetal de propagación, excepto semillas, pero autorizada la importación de frutos sin síntomas, procedente de países donde la canchrosis es endémica, los esfuerzos se concentran en impedir su introducción mediante frutos contaminados. Para ello se ha colaborado con otros países en la puesta a punto de un protocolo integrado de diagnóstico basado en técnicas de PCR de alta especificidad (Golmohammadi *et al.*, 2007) y en métodos serológicos y de aislamiento, que ha sido adoptado como oficial por la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO). Su aplicación ha permitido identificar esta bacteria en frutos importados de distintos países sudamericanos, y proceder a su destrucción, o impedir su entrada en los mercados de la UE.

La supervivencia de la bacteria en lesiones de frutos también ha sido estudiada mediante la selección del gen *gumD* como marcador de viabilidad, y la puesta a punto de protocolos de detección del RNA mensajero mediante PCR a tiempo real y NASBA, que permitan estudiar el efecto de distintos tratamientos químicos o físicos de los frutos sobre la viabilidad de este patógeno.

Ralstonia solanacearum (O CÓMO SOBREVIVIR FUERA DEL HUÉSPED)

Ralstonia solanacearum causa podredumbre y marchitez en las solanáceas cultivadas, pero también en plantas de más de cincuenta familias (Figura 4). Por la gravedad de sus síntomas y las pérdidas que ocasiona es asimismo un organismo de cuarentena, según la legislación de la UE. Se trata de una de las bacterias más adaptadas para sobrevivir en distintos hábitats, ya que, además de en las plantas, es capaz de mantenerse en variados tipos de suelo durante largos períodos, así como en cursos de agua, siendo una de las bacterias más peligrosas para la agricultura. Este organismo no había sido citado en España hasta 1995, pero desde entonces se han identificado distintos focos, especialmente en patatas importadas y de producción nacional, y también se ha identificado en tomate y aguas de Castilla-León y Andalucía.

Para prevenir su introducción en España, se han puesto a punto métodos serológicos de detección de elevada sensibilidad, basados en anticuerpos monoclonales específicos, y métodos moleculares basados en PCR. Pueden ser aplicados tanto a la detección de la bacteria en material vegetal sin síntomas, como tubérculos de patata o esquejes de geranio (Marco-Noales et al., 2008), como a su detección en agua, y son aplicados por laboratorios de distintas comunidades autónomas (CC.AA.).

El estudio de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas españolas ha permitido determinar que se trata de cepas de la raza 3, biovar 2, filotipo 2, y que han sido varias las introducciones identificadas en nuestro país. En la mayoría de los casos, el origen del inóculo pare-

ce estar constituido por tubérculos de patata de procedencia sudamericana o europea.

Se ha estudiado la supervivencia de cepas españolas de *R. solanacearum* en agua de riego, y la influencia de la microbiota nativa, especialmente de fagos específicos, en su supervivencia, así como el efecto de bajas temperaturas (Álvarez et al., 2007). Se ha demostrado que en agua de río, a temperaturas inferiores a 15°C, la bacteria adopta el “estado viable no cultivable” (VNC), y que dicho estado es reversible cuando aumenta

la temperatura. Además, se ha observado correlación entre cultivabilidad y patogenicidad.

La prevención de la introducción y diseminación de *R. solanacearum* está regulada mediante la Directiva 2006/63 de la UE, que obliga a realizar análisis y en caso positivo a erradicar. Entonces, no es posible cultivar plantas sensibles en los cuatro años siguientes y, por eso, se ha estudiado la migración de una cepa marcada de *R. solanacearum* en distintas plantas cultivadas y para determinar su sensibilidad (Álvarez et al., 2008). Los resultados de la erradicación en España hasta ahora han sido satisfactorios, pero los riesgos de nuevas introducciones, y especialmente los focos de los ríos y arroyos, suponen un peligro constante.

Erwinia amylovora (O LAS BASES DE UNA ERRADICACIÓN EFICAZ)

Erwinia amylovora, también patógeno de cuarentena en la UE, es responsable de la enfermedad denominada fuego bacteriano, que afecta especialmente a peral, manzano, níspero, membrillero y rosáceas ornamentales (Figura 5). En España fue identificada por primera vez en 1995 en Guipúzcoa. La necesidad de realizar prospecciones intensivas en todas las zonas de cultivo de especies sensi-



Figura 4. Síntoma de marchitez causada por *Ralstonia solanacearum* en patata. (Foto M.M. López).



Figura 3. Síntomas de lesiones causadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en naranja. (Foto P. Llop).

bles obligó a diseñar técnicas serológicas basadas en anticuerpos monoclonales específicos, y técnicas moleculares basadas en nested-PCR en un solo tubo (Llop et al., 2000), que fueron transferidas a los Servicios de Sanidad Vegetal. También forman parte del protocolo oficial de la EPPO y del de la *International Plant Protection Convention* de la FAO, que está en revisión.

Desde entonces se han detectado distintos focos en



Figura 5. Síntomas de *Erwinia amylovora* en brote (arriba) y fruto de peral (debajo). (Fotos E. Marco-Noales).

nueve CC.AA. del norte y centro de España y se han llevado a cabo medidas de erradicación. Se ha considerado que la erradicación era la solución preferible dado el pequeño tamaño de los focos y la abundancia de variedades sensibles en las zonas afectadas.

Para conseguir una erradicación eficaz, aunque a largo plazo, es necesario conocer las fuentes de inóculo y los reservorios de la bacteria problema, sus estrategias de supervivencia y sus medios de diseminación. Por ello se han estudiado las características de las cepas españolas de distintos orígenes en un análisis polifásico utilizando varias técnicas moleculares (RAPD, MSP-PCR, PFGE, AFLP), que han permitido concluir que ha habido varias introducciones de *E. amylovora* en España, estando algunas de ellas directamente relacionadas con la importación de plantas de países de la UE, pero se desconoce el origen exacto de otros focos (Donat et al., 2007). En estos trabajos también se han encontrado cepas con características especiales, carentes del plásmido pEA29, considerado universal, pero con otro plásmido no previamente descrito, denominado pEl70, así como una nueva especie de *Erwinia*, denominada *Erwinia piriflorinigrans*. Además se ha demostrado la capacidad de *E. amylovora* de sobrevivir en agua y en brotes, y manzanas maduras (Ordax et al., 2009). También se ha visto que la bacteria entra en estado VNC en condiciones de estrés por cobre y por falta de nutrientes (Ordax et al., 2006), recuperando la cultivabilidad y también la patogenicidad cuando desaparece el estrés.

Hasta ahora se ha demostrado la eficacia de la erradicación en varias zonas, probablemente debido a la detección temprana de la bacteria. Ello es especialmente relevante ya que se trata de la primera vez que se ha conseguido la erradicación de esta grave enfermedad en un área determinada.

***Agrobacterium tumefaciens* (O CÓMO EL CONTROL BIOLÓGICO PUEDE SER EFICAZ)**

El primer ejemplo práctico de métodos de lucha preventiva se aplicó al patosistema *Agrobacterium tumefaciens*-plantas de vivero, que aún se sigue estudiando en nuestro grupo. *A. tumefaciens* es la bacteria causante de tumores en cuello, raíces y con menor frecuencia en tallo (Figura 6), teniendo un amplio espectro potencial de huéspedes, ya que puede abarcar a más de 700 especies de plantas. En España, esta enfermedad es conocida desde principios del siglo XX, y ha sido citada en gran cantidad de frutales y ornamentales. Aparte de los daños directos a la planta, las pérdidas en viveros de frutales, vid y rosales son especialmente graves, ya que no se pueden comercializar lotes que contengan plantas con tumores.

Los estudios realizados han permitido la puesta a punto de protocolos sensibles y específicos de diagnóstico en plantas con tumores para la detección de infecciones latentes, basados inicialmente en PCR convencional con control interno (Cubero et al., 1999) y recientemente en PCR a tiempo real. Además se han diseñado técnicas de tipado específico mediante RAPD (Llop et al., 2003), y se

ha profundizado en el conocimiento de la biología de la bacteria en distintos huéspedes, como la vid, y su capacidad de migración en frutales y rosal.

Pero los avances más significativos han tenido lugar en el control biológico de esta enfermedad, demostrándose la eficacia de dicho método y estudiándose los mecanismos implicados en el mismo, tanto en la cepa original de *Agrobacterium* sp. K84, como su sucesora modificada genéticamente, la cepa K1026. Ambas han resultado eficaces frente a distintas cepas patógenas españolas, en distintos huéspedes y condiciones (Penyalver *et al.*, 2000). Además se ha demostrado la importancia de la transferencia de plásmidos entre el agente de biocontrol y el patógeno en este sistema de control biológico (Vicedo *et al.*, 1996), y se ha estudiado el comportamiento de cepas transconjugantes (López-López *et al.*, 1999).

A pesar de su eficacia práctica, no se ha conseguido todavía el registro de la cepa K1026 en la UE, con lo que se da la paradoja de que existiendo una cepa eficaz, conocimiento científico y técnico que lo avala, y carencia práctica de riesgo, no se ha conseguido todavía su registro en la UE, por lo que dicha cepa no está todavía a disposición de los viveristas españoles ni europeos.



Figura 6. Síntomas de tumores en cuello y raíces causados por *Agrobacterium tumefaciens* en rosal. (Foto M.M. López).

CONCLUSIONES (O LAS DIFICULTADES PRÁCTICAS DE LA PREVENCIÓN)

Todos estos ejemplos nos ilustran sobre la absoluta necesidad de utilizar los métodos de control preventivo de bacteriosis de plantas para reducir la importancia económica de las pérdidas que causan en España. Sin embargo, los estudios realizados sobre estas enfermedades, tanto aquí, como en otros países, nos demuestran que la puesta a punto de métodos sensibles y específicos de detección (López *et al.*, 2008) parece ser más sencilla que el diseño de métodos eficientes de muestreo. La identificación de nuevos reservorios o estrategias de supervivencia no previamente descritas tiene un elevado interés científico, pero nos hace sospechar que la gran capacidad de adaptación de las bacterias les permitirá sobrevivir en condiciones muy adversas por largos períodos de tiempo, haciendo más difícil su control preventivo. Y que el mejor método de diagnóstico o detección no será eficaz si no se aplica a una muestra representativa y tomada adecuadamente.

La información sobre la diversidad genética de las cepas españolas de distintas especies de bacterias fitopatógenas ha resultado del máximo interés, ya que las técnicas moleculares utilizadas han permitido distinguir si se trataba de una o varias introducciones y establecer, en función de ello, las estrategias de control o erradicación más apropiadas. El mayor problema es que, mientras se consigue una colección representativa de aislados y se seleccionan las técnicas de análisis más convenientes en cada modelo, ese tiempo puede resultar crucial para controlar la diseminación de la bacteria, lo que es especialmente grave en el caso de organismos de cuarentena.

Además, el control biológico no parece ser de momento la panacea universal para el control de bacteriosis de plantas y, desgraciadamente, los brillantes resultados conseguidos con las cepas K84 y K1026 son más bien la excepción que la regla, ya que no existen muchos más casos de bacteriosis en las que el control biológico se haya mostrado eficaz en su utilización práctica, desplazando al control químico.

Estas conclusiones sólo pretenden ser realistas, y señalar el largo camino que todavía queda por recorrer para que la prevención efectiva de las bacteriosis de plantas sea un hecho y permita evitar las pérdidas causadas por las mismas. Ahora, en 2009, ya sabemos qué problemas nos plantean las bacterias fitopatógenas y pretendemos aportar información científica que permita avanzar, quizás lentos, pero seguros, hacia su prevención, control y erradicación.

REFERENCIAS

- Álvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, Trigalet-Démery D, López MM y Trigalet A. (2008) Comparative behaviour of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* **98**: 59-68.
- Álvarez B, López MM y Biosca EG. (2007) Influence of native microbiota on survival of *Ralstonia solanacearum* phylotype II in river water microcosms. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7210-7217.
- Bertolini E, Olmos A, López MM y Cambra M. 2003. Multiplex nested RT-PCR in a single closed tube for sensitive and simultane-

ous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* **93**: 286-292.

Cubero J, Martínez MC, Llop P y López MM. (1999) A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *J Appl Microbiol* **86**: 591-602

de León L, Rodríguez A, Llop P, López MM y Siverio F. (2009) Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* sbsp. *michiganensis* isolates from Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathology* (en prensa).

Donat V, Biosca EG, Peñalver J y López MM. (2007) Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *J Appl Microbiol* **103**: 1639-1649.

Golmohammadi M, Cubero J, Peñalver J, Quesada JM, López MM y Llop P. (2007) Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. *J Appl Microbiol* **103**: 2309-2315.

López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M y Bertolini E. (2008) Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Curr Iss Mol Biol.* **13**: 46.

López-López MJ, Vicedo B, Orellana N, Piquer J y López MM. (1999) Behavior of a virulent strain derived from *Agrobacterium radiobacter* strain K84 after spontaneous Ti plasmid acquisition. *Phytopathology* **89**: 286-292.

Llop P, Bonaterra A, Peñalver J y López MM. (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2071-2078.

Llop P, Lastra B, Marsal H, Murillo J y López MM. (2003) Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single

colonies from plant tumours. *Eur J Plant Path* **109**: 381-389.

Marco-Noales E, Bertolini E, Morente C y López MM. (2008) Integrated approach for detection of non culturable cells of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic *Pelargonium* spp. cuttings. *Phytopathology* **98**: 949-955.

Ordax M, Biosca EG, Wimalajeewa SC, López MM y Marco-Noales E. (2009) Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *J Appl Microbiol.* (en prensa).


Ordax M, Marco-Noales E, López MM y Biosca EG. (2006) Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3482-3488.

Penyalver R, García A, Ferrer A, Bertolini E, Quesada JM, Salcedo CI, Piquer J, Pérez-Penadés J, Carbonell EA, del Río C, Caballero JM y López MM. (2006) Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology* **96**: 313-319.

Penyalver R, Vicedo B y López MM. (2000) Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *Eur J Plant Pat* **106**: 801-810.

Quesada JM, García A, Bertolini E, López MM y Penyalver R. (2007) Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *Int Microbiol* **10**: 77-84.

Vicedo B, Lopez MJ, Asins MJ y Lopez MM. (1996) Spontaneous transfer of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the nopaline catabolism plasmid of *A. radiobacter* strain K84 in crown gall tissue. *Phytopathology* **86**: 528-534.



XXII Congreso Nacional SEM'09
Almería, 21-24 septiembre 2009

Dirección Postal
Departamento de Biología Aplicada
Área de Microbiología
Universidad de Almería
La Cañada de San Urbano
04120 Almería

Teléfonos de contacto
950 015 027
950 015 890
950 015 891
950 015 892

Fax:
950 015 476

e-mail
CongresoSEM2009@ual.es

Web
<http://www.ual.es/Congresos/SEM2009>

	Antes de 31/05/09	Después de 31/05/09
Socio de la SEM	280 €	350 €
No socio de la SEM	360 €	450 €
Joven investigador socio de la SEM	230 €	288 €
Joven investigador no socio de la SEM	310 €	388 €
Acompañante	180 €	225 €

Plazo de Inscripción (con cuota reducida): 31 de mayo de 2009. Después de esta fecha, se admitirán inscripciones hasta el 10 de septiembre de 2009.

Plazo para la remisión de Resúmenes: 15 de junio de 2009. No se admitirán resúmenes después de esta fecha.

La agencia de viajes oficial del congreso es "Viajes El Corte Inglés". Para cualquier solicitud de información relacionada con el alojamiento, se puede contactar con:

DP. Susana Morales
sevillacongreso1@viajeseci.es

VIAJES
El Corte Inglés

Puedes descargar el Formulario de Alojamiento que se encuentra en la página web del congreso: <http://www.ual.es/Congresos/SEM2009>

FEMS Advanced Fellowship 2009



Bruno González-Zorn y Stéphanie Matrat

La beca posdoctoral FEMS de este año ha sido otorgada a la Dra. Stéphanie Matrat que trabajará durante 24 meses en el laboratorio del Dr. Bruno González-Zorn del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Su trabajo versará sobre las redes genéticas de *Enterococcus faecalis* que controlan la transición entre sus estados de comensal y el virulento.

Aunque estas becas se instituyeron en el año 2007, esta es la primera vez que se conceden y España ha tenido el honor de recibirla en su primera convocatoria efectiva. La SEM se congratula de que sea el laboratorio dirigido por un miembro de esta Sociedad el primer receptor de esta beca.

Se puede encontrar más información en: <http://www.fems-microbiology.org/website/nl/page56.asp>

FEMS Research Fellowship 2009

Te recordamos que el plazo para la solicitud de las becas FEMS se abre dos veces al año. Están destinadas a jóvenes científicos (menores de 36 años) que sean miembros de sociedades pertenecientes a FEMS, para estancias de hasta 3 meses en países europeos. Las fechas límite de recepción de la documentación en nuestra secretaría son el **15 de mayo de 2009** o el **1 de noviembre de 2009**. Los impresos y las bases de la convocatoria están disponibles en la dirección: <http://www.fems-microbiology.org/website/NL/page54.asp>



II Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana - CMIBM - Barcelona 2008

y la conferencia de clausura “La búsqueda de nuevos fármacos a partir de microorganismos: ¿qué hemos aprendido después de 80 años?” fue impartida por el Dr. Fernando Peláez (Merck, Sharp & Dohme de España, S.A.).

El programa científico contó con 76 presentaciones entre ponencias, comunicaciones orales y pósters, organizados en 6 mesas redondas:

1. *Biotecnología de la Biomasa*
(Moderadora: María Jesús Martínez).
2. *Microbiología Industrial de Alimentos*
(Moderador: Evaristo Suárez).
3. *Metabolitos Secundarios en Biotecnología*
(Moderadora: Paloma Liras).
4. *Biotecnología Enzimática*
(Moderadora: Pilar Díaz).
5. *Biotecnología de Microorganismos Extremófilos*
(Moderador: Antonio Ventosa).
6. *Microbiología Molecular Industrial*
(Moderador: Antonio Juárez).

Podéis consultar toda la información sobre las presentaciones orales y pósters en la página web <http://www.ub.edu/CMIBM2008/>

Las sesiones científicas y actos sociales del Congreso tuvieron lugar en la sede del *Institut d'Estudis Catalans*, edificio histórico situado en el centro de Barcelona, que constituyó un marco idóneo y creó un clima muy apropiado para el desarrollo del Congreso.

Es de destacar la asistencia y participación activa de jóvenes investigadores, que impartieron un buen número de las ponencias y comunicaciones orales. El Congreso hizo patente el excelente nivel científico del Grupo Especializado de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM, así como su actualidad temática. La participación de científicos especialistas en distintas ramas de Microbiología Industrial, Ingeniería y otras áreas afines, así como de profesionales de empresas biotecnológicas convirtió al Congreso en un foro de debate de los aspectos más relevantes e innovadores de la Biotecnología de Microorganismos.

Francisco Javier Pastor
Presidente del Comité Organizador

El II Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana -CMIBM2008-, VI Reunión Científica del Grupo Especializado de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la Sociedad Española de Microbiología, se celebró en Barcelona del 12 al 14 de noviembre de 2008 organizado por los profesores Francisco Javier Pastor y Pilar Díaz, de la Universidad de Barcelona.

El Congreso contó más de 120 participantes entre profesores e investigadores del ámbito universitario y de centros de investigación, y con la participación activa de especialistas del sector empresarial e industrial.

La conferencia inaugural “Sustainable Enzyme Technologies for Lignocellulosic Biorefineries” corrió a cargo de la profesora Liisa Viikari (Universidad de Helsinki)



El oídio de las cucurbitáceas, *Podosphaera fusca*

Alejandro Pérez García

Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, Málaga
aperez@uma.es

La agricultura representa una de las principales actividades de la economía española. Dentro del sector hortícola destaca el cultivo de las cucurbitáceas, con unos beneficios anuales cercanos a los mil millones de euros. Los principales cultivos son los de melón, sandía, pepino, calabacín y calabaza, con gran importancia tanto en dietas locales como en las exportaciones. Entre las enfermedades de origen fúngico que afectan a estos cultivos destaca por su importancia epidemiológica el oídio de las cucurbitáceas. Los oídios son sin duda las más comunes, conspicuas y fácilmente reconocibles de las enfermedades vegetales. En cucurbitáceas la enfermedad se distingue claramente por el desarrollo de unas manchas blanquecinas de aspecto pulverulento en hojas, peciolas, tallos y raramente en frutos (Figura 1A). La enfermedad está causada fundamentalmente por dos especies, *Golovinomyces cichoracearum* o *Podosphaera fusca*, que inducen síntomas idénticos pero que pueden ser fácilmente distinguibles bajo el microscopio. En España como en muchos otros países productores de cucurbitáceas, *P. fusca* es el principal agente causal de la enfermedad que representa un serio problema y es uno de los factores más importantes que incrementan los costes de producción y limitan el rendimiento de estos cultivos (Pérez-García et al., 2009).

Para un control adecuado de una enfermedad es necesario un buen conocimiento de la biología del patógeno responsable de la misma. Los oídios (phylum Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden

Erysiphales) son, probablemente, el grupo de patógenos vegetales más desconocido a pesar de su gran importancia agronómica, todo ello debido a su dificultad de manejo en el laboratorio. Estos hongos son parásitos biotrofos obli-

gados que crecen en la mayoría de los casos sobre la superficie de la planta y obtienen los nutrientes de las células epidérmicas por medio de unas estructuras especiales de parasitismo denominadas haustorios, lo que limita su cultivo en medios nutritivos. La investigación a nivel mole-

cular se ha concentrado prácticamente en una única especie *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, el oídio de la cebada, que se ha convertido en la especie modelo de este grupo de patógenos, y a pesar de las dificultades, en uno de los hongos fitopatógenos mejor conocidos. De hecho, el genoma de *B. graminis* f.sp. *hordei* está prácticamente completado y su próxima publicación representará sin duda uno de los avances más importantes en la biología de los oídios de los últimos años. Del resto de oídios la información disponible es comparativamente muy escasa y en muchísimos casos virtualmente inexistente. *Podosphaera fusca* es un buen ejemplo de la absoluta falta de conocimiento a nivel molecular de la mayoría de los oídios. Una simple búsqueda en bases de datos de secuencias de *P. fusca* sólo revela secuencias de ITS-rDNA utilizadas en estudios taxonómicos y filogenéticos, y unas cuantas secuencias asociadas a patentes y de dianas de fungici-

das. Se hace por tanto necesario el profundizar en la biología básica de estos organismos como estrategia fundamental para el desarrollo de medidas de control más racionales y duraderas.

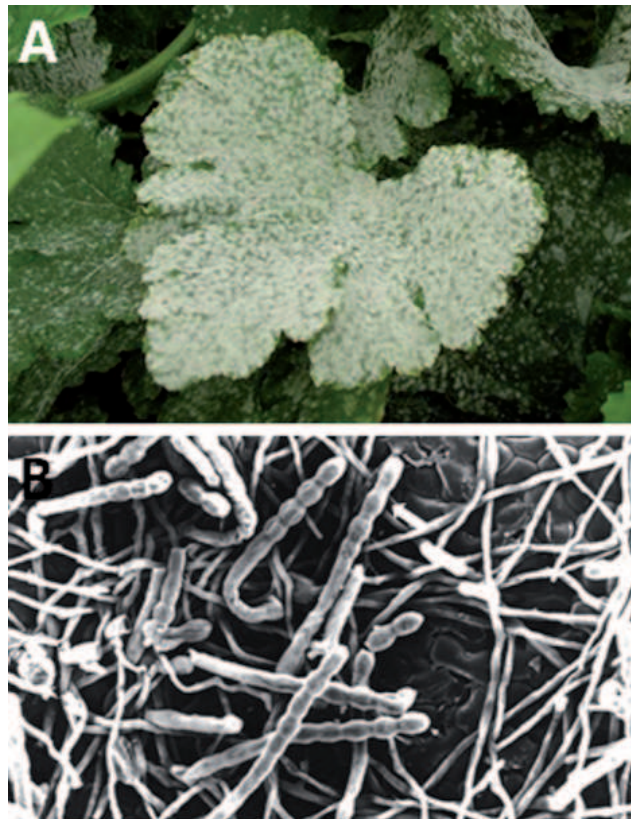


Figura 1. El oídio de cucurbitáceas *Podosphaera fusca*. A. Síntomas típicos de la enfermedad. **B.** Detalle a microscopía electrónica de barrido de una colonia de *P. fusca* donde se observa el entramado de hifas y varios conidióforos (flecha).

PERO, ¿QUÉ SABEMOS DE LA BIOLOGÍA BÁSICA DE *P. fusca*?

El ciclo de vida de *P. fusca* está relativamente bien caracterizado. El ciclo de vida asexual es muy parecido al de otros oídios. El ciclo asexual comienza cuando un conidio alcanza la superficie de un huésped susceptible y germina. La espora produce un tubo germinativo observable 6-8 h después de la inoculación que termina en un apresorio indiferenciado, desde el que se forma un haustorio. Desde este tubo germinativo o desde la espora se forma una hifa primaria que origina un segundo apresorio y haustorio, proceso que ocurre entre las 24-48 h después de la inoculación. Luego las hifas se ramifican para formar hifas secundarias (72 h). Desde algunas hifas secundarias emergen conidióforos erectos en los que se originan 5-10 conidios o esporas asexuales dispuestos en cadena (Figura 1B), completándose así el ciclo asexual en 4-5 días. Tanto el entramado de hifas secundarias como los conidios forman el típico micelio blanquecino sobre la superficie de la planta que constituye el síntoma más característico de la enfermedad. *Podosphaera fusca* es un hongo heterotálico por lo que para se inicie el ciclo sexual se requiere la presencia de hifas de los dos tipos de compatibilidad sexual. Como consecuencia, se forma un cuerpo fructífero redondeado denominado casmotecio que contiene una única asca con 8 ascosporas o esporas sexuales. Los detalles de la formación y fusión de gametos son, sin embargo, todavía desconocidos. Además, el ciclo sexual es muy poco frecuente en campo, por lo que la relevancia epidemiológica de la fase sexual de este patógeno permanece aún por determinar.

En lo que se refiere a las interacciones patógeno-planta se conocen algunos detalles relacionados con la fisiología de la respuesta defensiva del hospedador. Los programas de mejora de la resistencia frente al oídio de cucurbitáceas tienen una larga historia y en la actualidad están disponibles en el mercado muchas variedades de pepino, melón y calabaza con resistencia a *P. fusca*. Se han descrito varios genes de resistencia (denominados *Pm*) especialmente en melón, siendo esta resistencia monogénica y dominante en la mayoría de los casos, aunque se han descrito genes recesivos. No obstante, a pesar de que se dispone de muchas variedades comerciales con resistencia a *P. fusca*, el desarrollo de nuevas razas fisiológicas del patógeno limita de forma considerable el control de la enfermedad mediante esta estrategia de empleo de cultivares resistentes. Se conocen dos mecanismos básicos de resistencia a oídios, la denominada resistencia prehaustorial (asociada a la formación de papilas) y la resistencia post-haustorial (asociada a la reacción de hipersensibilidad o HR), sin embargo, en cucurbitáceas sólo se ha identificado la resistencia de tipo post-haustorial. Aunque se asume que la interacción melón-*P. fusca* cumple con el concepto conocido como interacción gen-a-gen, todavía no se han aislado secuencias de los genes *Pm* ni se han identificado genes de avirulencia en el patógeno. En la resistencia post-haustorial de melón frente a *P. fusca* se conoce parte de los mecanismos de defensa implicados en dicha resistencia (Romero et al.,

2008). En comparación con plantas sensibles, en las plantas resistentes los primeros cambios fisiológicos que se observan están relacionados con la acumulación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (Figura 2A) o el ión superóxido. Estos cambios tienen lugar 4 h después de la inoculación, es decir, antes de la formación de los primeros haustorios (12 h). Tras este estallido respiratorio inicial se observa un fuerte reforzamiento de paredes celulares con la aparición de depósitos de calosa (Figura 2B) y lignina 12-24 h después de la inoculación. Curiosamente y a diferencia de otros sistemas patógeno-planta, los niveles transcripcionales de fenilalanina amonio liasa no parecen cambiar en respuesta a *P. fusca*. Lo que sí se ha puesto de manifiesto es una expresión diferencial de proteínas PR como β -1,3-glucanasa, que se caracteriza por una rápida activación de la transcripción 12 h después de la inoculación seguido de un pico de actividad 48 h después de la inoculación (Rivera et al., 2002). En resumen, la manifestación de los mecanismos de defensa, incluida la muerte celular característica de la HR, es típicamente post-haustorial, aunque el inicio de la respuesta tiene lugar antes de la formación del primer haustorio. Sin embargo, en algunas líneas resistentes de melón se observa un patrón de resistencia post-haustorial ligeramente distinto al anteriormente

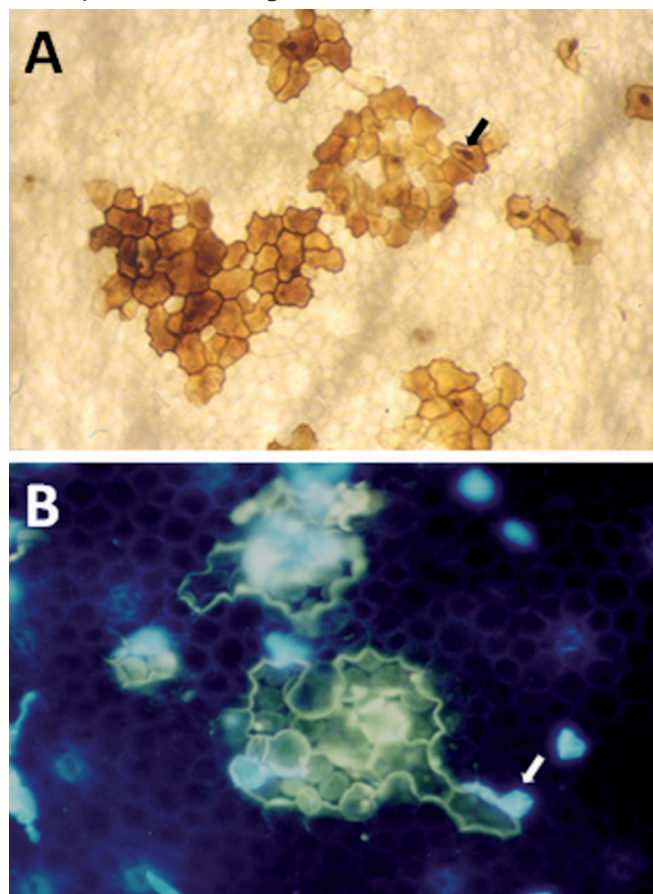


Figura 2. Mecanismos de defensa de melón frente a *P. fusca*. A. Producción de peróxido de hidrógeno (precipitado marrón rojizo). B. Reforzamiento de la pared celular mediante depósitos de calosa (fluorescencia amarilla). Nótese la presencia de conidios germinados del patógeno (flechas).

descrito, en el sentido de que la modificación fisiológica más relevante es la acumulación de calosa, mientras que la reacción de hipersensibilidad parece jugar un papel secundario (Kuzuya *et al.*, 2006).

HERRAMIENTAS PARA SU ESTUDIO

Como ya se ha comentado, los oídios son hongos difíciles de manejar por su naturaleza de parásitos obligados. El cultivo en el laboratorio de *P. fusca* se hace normalmente sobre cotiledones de especies susceptibles como *Lagenaria*, melón o calabacín que se mantienen *in vitro* sobre medio agarizado (Figura 3A), lo que permite el cultivo de los aislados o cepas del hongo en condiciones controladas (Álvarez y Torés, 1997). Este método de cultivo servía a su vez como método de mantenimiento mediante resiembras periódicas, pero no era el sistema más deseable porque no permitía el mantenimiento de grandes colecciones de aislados, era muy tedioso, propenso a la contaminación y además no prevenía de cambios genéticos o fisiológicos tras numerosos subcultivos. Afortunadamente, el desarrollo de métodos de conservación a -80°C (Pérez-García *et al.*, 2006) o en nitrógeno líquido (Bardin *et al.*, 2007) ha solucionado este problema, permitiendo la conservación de colecciones más numerosas durante periodos de tiempo de hasta varios años, lo que supone un salto cualitativo fundamental para el estudio de este patógeno, ya que permitirá la realización de estudios

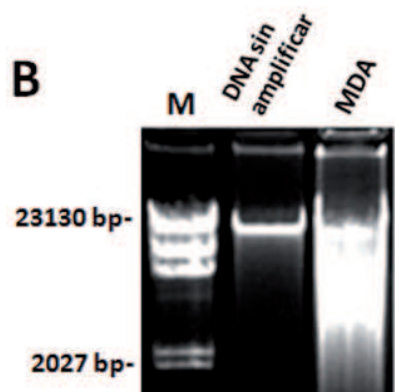
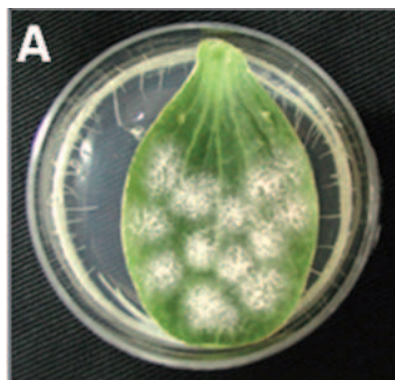


Figura 3. Herramientas básicas para el estudio de *P. fusca*. A. Colonias de *P. fusca* sobre un cotiledón de calabacín. B. Amplificación del genoma mediante MDA.

epidemiológicos y de genética de poblaciones tan limitados hasta el momento. Un aspecto no superado todavía en comparación con otros oídios como *B. graminis*, es el análisis genético de caracteres de *P. fusca* mediante cruzamientos meióticos. Aunque se tienen bien definidos los dos tipos de compatibilidad sexual y la formación de casmotecios se puede inducir en el laboratorio, se desconocen por completo las condiciones más adecuadas para la maduración de los casmotecios y el desarrollo de las ascosporas. No obstante, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares está permitiendo superar muchos de los proble-

mas tradicionalmente asociados a la investigación de los oídios. Los estudios moleculares en estos patógenos están limitados por la dificultad de extraer DNA o RNA de calidad adecuada y en cantidad suficiente para realizar análisis moleculares a gran escala. Sin embargo, las modernas tecnologías de amplificación de genomas y transcriptomas completos tienen el potencial para superar estas limitaciones. De hecho, el método denominado “amplificación por desplazamiento múltiple” (MDA) es un sistema de amplificación de genomas completos que ha sido aplicado con éxito en *P. fusca* (Fernández-Ortuño *et al.*, 2007). Este método permite obtener microgramos de DNA de alto peso molecular, alta fidelidad y representativo del genoma amplificado (Figura 3B), a partir de unos pocos nanogramos de DNA de partida, que puede usarse para distintas aplicaciones, pero que puede ser muy útil en estudios de biología de poblaciones cuando se necesita analizar un gran número de aislados en campos como en epidemiología molecular o genética de poblaciones. Esta técnica ha permitido abordar estudios moleculares como el llevado a cabo para determinar el papel de mutaciones en el gen *CYTB* en la resistencia a estrobilurinas en *P. fusca* (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008). De la misma manera, se han desarrollado sistemas para la amplificación de transcriptomas completos a partir de unos pocos microgramos de RNA (Tomlins *et al.*, 2006), con lo cual en la actualidad se dispone de la tecnología necesaria para el abordaje de estudios genómicos en microorganismos hasta ahora recalcitrantes a este tipo de estudios como los oídios.

EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS

Aunque se han invertido grandes esfuerzos en programas de mejora, los agricultores siguen viendo en el oídio de las cucurbitáceas a una de sus grandes preocupaciones, de manera que la aplicación de fungicidas continúa siendo la principal herramienta de lucha contra esta enfermedad en la mayoría de los cultivos. El impacto del control químico, sin embargo, ha sido mucho más atenuado de lo esperado por la facilidad con la cual *P. fusca* desarrolla resistencia, haciendo ineficaces rápidamente a muchos fungicidas sistémicos. Desde la primera detección de cepas resistentes a benomilo en 1967 en EEUU, *P. fusca* ha exhibido un elevado potencial para desarrollar resistencias a varias clases de fungicidas incluyendo benzimidazoles (MBC), inhibidores de C14- α -demetilasa (DMI), morfolinás, organofosfatos, hidroxipirimidinas, inhibidores Qo (QoI) y quinoxalinas (McGrath, 2001). En España el oídio de las cucurbitáceas se controla principalmente mediante dos clases de fungicidas, estrobilurinas y DMI. Como consecuencia de este uso preferente se han detectado importantes problemas de resistencia a estos productos en las principales zonas de cultivo de cucurbitáceas de la mitad sur de la península (Fernández-Ortuño *et al.*, 2006). El manejo efectivo de la resistencia a fungicidas en un hongo fitopatógeno reside en gran parte en la capacidad para la evaluación y el seguimiento eficaces de la misma en campo. En el caso de hongos biotrofos como los oídios, la

Alejandro Pérez García

(Málaga, 1968) es licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga (1991) y Doctor por la misma Universidad (1996). Realizó una estancia postdoctoral de tres años en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Wageningen (Países Bajos), bajo la dirección de Pierre de Wit. Desde octubre de 1999 trabaja en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, en la que es Profesor Titular de Microbiología desde 2003. Desde 2006 es Secretario del Grupo Especializado Microbiología de Plantas de la SEM y desde finales de 2008 Tesorero de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Fitopatología. Desde hace 10 años dirige la línea de investigación sobre "Oídio de cucurbitáceas" dentro del grupo "Microbiología y Patología Vegetal" que dirige Antonio de Vicente, en estrecha colaboración con Juan A. Torés (Estación Experimental "La Mayora", CSIC). Otras líneas de investigación dentro del grupo "Microbiología y Patología Vegetal" son la que aborda el estudio de la necrosis apical del mango causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y la coordinada por Francisco Cazorla sobre el control biológico de *Rosellinia necatrix* en aguacate.



14- α -metil-3,6-diol. Muchos patógenos, incluidos los oídios, han desarrollado resistencia a los DMI, habiéndose propuesto varios mecanismos moleculares para explicar esta resistencia entre los que se incluyen mutaciones o sobreexpresión del gen *CYP51*. En lo referente a la resistencia a fungicidas DMI en *P. fusca* la sobreexpresión de *CYP51* ha quedado descartada como principal mecanismo de resistencia ya que no existen diferencias de expresión consistentes entre aislados sensibles y resistentes a DMI y además el promotor de *CYP51* es idéntico en ambos tipos de aislados. No obstante, parece existir cierta correlación entre determinadas sustituciones de aminoácidos y los diferentes fenotipos de resistencia observados. Estudios de modelado parecen situar estos cambios de aminoácidos en el canal de acceso del sustrato al sitio catalítico de la enzima, lo que podría explicar su papel en la resistencia. Para confirmar este punto y puesto que a día de hoy no es posible transformar de forma estable ningún oídio, estamos introduciendo tanto alelos sensibles como resistentes a DMI en levadura con objeto de demostrar el papel de estas mutaciones en la resistencia a estos fungicidas.

CONTROL BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD, ¿UNA ALTERNATIVA FACTIBLE?

El preocupante problema de la resistencia a fungicidas y la creciente concienciación de la opinión pública sobre los efectos negativos de muchos productos químicos sobre el medio ambiente, ha propiciado la búsqueda de medidas para el control del oídio de las cucurbitáceas alternativas o complementarias a los productos fitosanitarios convencionales, pero ambientalmente más aceptables. Productos naturales tales como extractos vegetales, detergentes, aceites minerales, soluciones de micronutrientes, sílice e incluso la leche cruda de vaca, han sido propuestos en la literatura como alternativas menos perjudiciales que las prácticas de control tradicionales. Sin embargo, la estrategia de control más investigada de tales alternativas está basada en el empleo de enemigos naturales del patógeno o lo que es lo mismo, el control biológico. En términos generales, las estrategias a priori más interesantes para el control biológico de los oídios se pueden clasificar en dos tipos: 1) el empleo de microorganismos que son enemigos naturales de los oídios que los atacan mediante parasitismo y/o antibiosis y 2) el empleo de microorganismos que protegen a la planta contra los oídios mediante la inducción de los mecanismos de defensa del huésped. En nuestro laboratorio hemos demostrado la eficacia de productos basados en esporas de los hongos micoparásitos *Ampelomyces quisqualis* y *Lecanicillium lecanii*, así como de dos cepas de *Bacillus subtilis* (Figura 4), para controlar el oídio de cucurbitáceas en melón a escala semicomercial (Romero et al., 2007c). Además, las bases moleculares de la actividad de biocontrol de las cepas de *B. subtilis* han sido examinadas en detalle, estableciéndose el papel de los lipopéptidos de las familias de las iturinas y de las fengicinas como los principales responsables de la actividad antagonista contra *P. fusca* (Romero et al., 2007b).

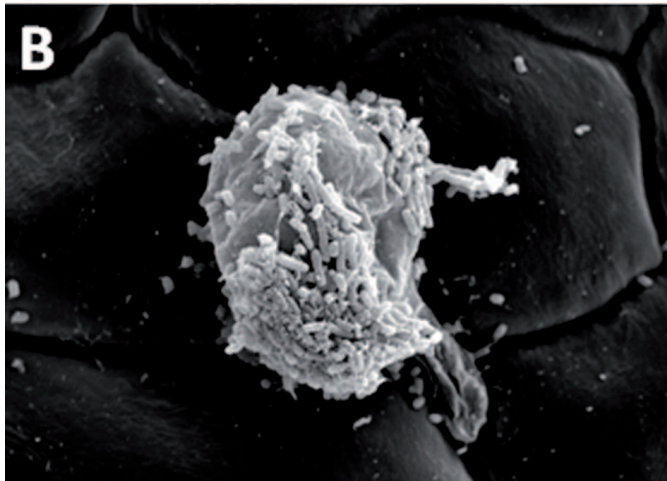
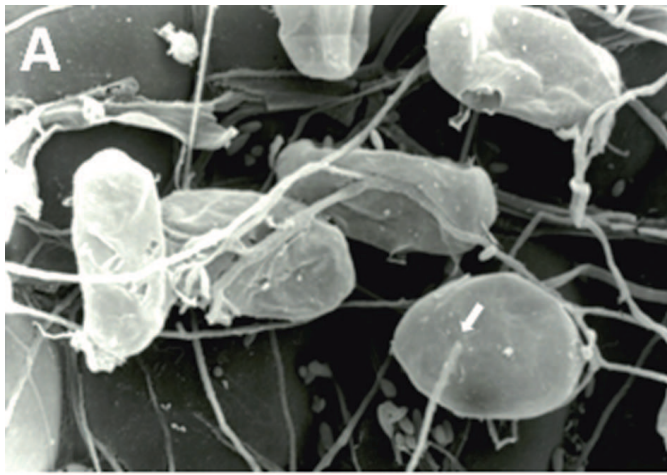


Figura 4. Agentes de control biológico de oídio de cucurbitáceas. A. Hifas de *Lecanicillium lecanii* penetrando (flecha) un conidio de *P. fusca*. **B.** Células de *Bacillus subtilis* sobre un conidio germinado de *P. fusca*.

Además, se constataron los daños ultraestructurales ocasionados por estos lipopéptidos en las membranas celulares de los conidios de *P. fusca* (Romero *et al.*, 2007a). Para cultivos en campo abierto como los de melón, la estrategia de usar hongos micoparásitos o bacterias productoras de antibióticos es inviable, ya que estos organismos son muy dependientes de una humedad relativa elevada para llevar a cabo con éxito la actividad de biocontrol, por lo que el empleo de estos microorganismos quedaría restringido a cultivos protegidos. Por tanto, se hace necesario o bien mejorar la supervivencia de estos agentes para su empleo en campo abierto, o bien considerar otro tipo de estrategias de control biológico que permitan evitar la exposición de los agentes a un ambiente tan difícil y cambiante como es la filosfera de estos cultivos. Una posible estrategia es el empleo de rizobacterias, como son ciertas cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* que colonizan el aparato radicular de la planta sin causar daño aparente y que parecen proteger a la planta de infecciones posteriores mediante la inducción de las defensas de la planta en un fenómeno conocido como resistencia sistémica inducida o ISR (van Loon *et al.*, 1998). En cucurbitáceas el fenómeno de la ISR ha sido demostrado únicamente en pepino y frente a algu-

nas enfermedades pero no frente a oídio. Por tanto, el empleo de rizobacterias inductoras de ISR aparece como una alternativa a explorar en la lucha contra el oídio de las cucurbitáceas. En nuestro laboratorio hemos seleccionado varias cepas de *P. fluorescens*, *B. subtilis* y *B. cereus* como rizobacterias inductoras de ISR en melón que parecen proteger frente al oídio en ensayos en cámara bajo condiciones controladas. En la actualidad estamos analizando las bases moleculares de la ISR en melón inducida por estas bacterias, así como su capacidad de protección frente a otras enfermedades y sobre otras plantas hospedadoras.

CONCLUSIONES

Podosphaera fusca representa una de las amenazas más serias para la producción de cucurbitáceas en todo el mundo. A pesar de los esfuerzos realizados para la obtención de variedades mejoradas y el desarrollo de nuevos fungicidas, el control efectivo y consistente de la enfermedad permanece aún esquivo a los agricultores. El uso de variedades resistentes, combinado con la alternancia de fungicidas y la progresiva introducción de alternativas más seguras que los productos químicos convencionales, incluyendo productos inorgánicos, orgánicos y biológicos, serán las estrategias usadas en el control de la enfermedad en los próximos años. Aunque el análisis genético de caracteres de *P. fusca* está todavía por resolver, las herramientas moleculares emergentes desarrolladas para el patógeno y la inminente secuenciación del genoma de *B. graminis* f. sp. *hordei* y otros oídios serán muy útiles para el planteamiento de investigaciones futuras. En concreto, estos avances facilitarán el análisis de los procesos fisiológicos y moleculares implicados en la patogenicidad y biología de *P. fusca*, y la comprensión del diálogo molecular entre patógeno y hospedador. Todo esto sentará las bases para el diseño de nuevas materias activas efectivas contra este oídio, permitiéndonos encarar la enfermedad y el diseño de programas de control de una manera más racional.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez B y Torés JA (1997) Cultivo in vitro de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.), efecto de diferentes fuentes de carbono sobre su desarrollo. *Bol San Veg Plagas* **23**, 283-288.
- Bardin M, Suliman ME, Sage-Palloix AM, Mohamed YF y Nicot PC (2007) Inoculum production and long-term conservation methods for cucurbits and tomato powdery mildews. *Mycol Res* **111**, 740-747.
- Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, López-Ruiz F, Romero D, de Vicente A y Torés JA (2006) Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *Eur J Plant Pathol* **115**, 215-222.
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A y Pérez-García A (2007) Multiple displacement amplification, a powerful tool for molecular genetic analysis of powdery mildew fungi. *Curr Genet* **51**, 209-219.
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A y Pérez-García A

- (2008) Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Pest Manag Sci* **64**, 694-702.
- Kuzuya M, Yashiro K, Tomita K y Ezura H (2006) Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) resistance in melon is categorized into two types based on inhibition of the infection processes. *J Exp Bot* **57**, 2093-2100.
- McGrath MT (2001) Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. *Plant Dis* **85**, 236-245.
- Pérez-García A, Mingorance E, Rivera ME, del Pino D, Romero D, Torés JA y de Vicente A (2006) Long-term preservation of *Podosphaera fusca* using silica gel. *J Phytopathol* **154**, 190-192.
- Pérez-García A, Romero R, Fernández-Ortuño D, López-Ruiz F, de Vicente A y Torés JA (2009) The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. *Mol Plant Pathol* **10**, 153-160.
- Rivera ME, Codina JC, Olea F, de Vicente A y Pérez-García A (2002) Differential expression of beta-1,3-glucanase in susceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Sphaerotheca fusca*. *Physiol Mol Plant Pathol* **61**, 257-265.
- Romero D, de Vicente A, Olmos JL, Dávila JC y Pérez-García A (2007a) Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J Appl Microbiol* **103**, 969-976.
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M y Pérez-García A (2007b) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**, 430-440.
- Romero D, de Vicente A, Zerriouh H, Cazorla FM, Fernández-Ortuño D, Torés JA y Pérez-García A (2007c) Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse grown melon. *Plant Pathol* **56**, 976-986.
- Romero D, Rivera ME, Cazorla FM, Codina JC, Fernández-Ortuño D, Torés JA, Pérez-García A y de Vicente A (2008) Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell-wall reinforcement incompatible and compatible melon-powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. *J Plant Physiol* **165**, 1895-1905.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Shah RB, Rubin MA, Bruening E, Makarow V y Chinnaiyan AM (2006) Whole transcriptome amplification for gene expression profiling and development of molecular archives. *Neoplasia* **8**, 153-162.
- van Loon LC, Bakker PAHM y Pieterse CM. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**, 453-483.

IV Premio de fotografía en Microbiología Federico Uruburu



La cuarta edición de este premio se fallará durante la celebración del XXII Congreso Nacional de Microbiología - SEM 2009.

Bases del concurso:

- Podrán participar todas las personas interesadas en el tema inscritas en el XXII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM (Almería, septiembre de 2009).
- Las fotografías se ajustarán al formato 18x24 cm. La fotografía tendrá que presentarse sobre cartulina que le sobrepase 3 cm alrededor.
- Para entrar en el concurso el tema será inédito y tendrá que estar relacionado con la Microbiología.
- La fotografía se presentará bajo un pseudónimo en un sobre cerrado junto con otro con los datos del autor: nombre, apellidos, número del DNI, domicilio y teléfono de contacto.
- Cada autor podrá concursar con un máximo de 3 fotografías.
- Los originales deberán remitirse a la Secretaría del XXII Congreso Nacional de la SEM:
Secretaría del XXII Congreso de la SEM
Departamento de Biología Aplicada (Área de Microbiología)
Universidad de Almería
La Cañada de San Urbano
04120 Almería
- El plazo para la recepción de fotografías concluirá el día de la

inauguración del XXII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM (21 de septiembre).

- Se otorgará un único premio consistente en una cámara de fotos digital.
- Cada obra deberá llevar un título expreso, marcado en el pie de la fotografía, y una nota breve explicativa de su contenido, que no excederá de cincuenta palabras.
- Las obras presentadas a concurso quedarán expuestas durante el transcurso del XXII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM.
- La elección de la obra galardonada se efectuará por votación popular entre los asistentes al XXII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM. Durante su celebración, se comunicará debidamente a los congresistas el lugar y forma de realizar la votación.
- Las obras presentadas al concurso quedarán en propiedad de la Sociedad Española de Microbiología para su uso con fines divulgativos y siempre citando al autor.
- La organización exime su responsabilidad en cuanto al desperfecto o extravío de originales.
- La organización rechazará las obras que no cumplan los requisitos anteriormente expuestos.
- La participación en este concurso supone la total aceptación de estas bases.

Desatando nudos: la tuberculosis del olivo

DE *Bacterium oleae* A *Pseudomonas savastanoi*
pv. *savastanoi*

La primera de las enfermedades del olivar de la que se tiene referencia histórica es la tuberculosis. El filósofo griego Teofrasto (372 – 287 a.C., Éreso, Isla de Lesbos), discípulo de Platón y posteriormente sucesor de Aristóteles en la escuela peripatética, en *Historia plantarum/De causis plantarum*, tratados que constituyen la más importante contribución a la ciencia botánica de toda la antigüedad hasta el Renacimiento, afirma que “los olivos padecen callos, también llamados hongos o nudos” (Traducción libre del inglés. Scortichini et al., 2004 *Plant Pathology* 53, 491–497). Transcurrieron más de 2100 años hasta que esta enfermedad, conocida entonces como *olive tubercle*, fue atribuida a un microorganismo sin especificar, denominado *Bacterium oleae* por Archangeli (1886) y, posteriormente, *Bacillus oleae-tuberculosis* por Savastano (1887-1889), tras demostrar su etiología bacteriana. Durante los cinco años siguientes, la bacteria causante de los “tubérculos” del olivo generó una intensa polémica, encabezada por microbiólogos italianos entre los que se incluía Petri, sufriendo varios cambios de nombre y atribuyéndose a aislados bacterianos diferentes fenotípicamente, probablemente, todos ellos miembros de la comunidad bacteriana epifítica del olivo. *Bacterium savastanoi* E.F. Smith (1904) se clasificó por vez primera dentro del género *Pseudomonas* en 1913, como *P. savastanoi* (Stevens), sin

Cayo Ramos
Área de Genética,
Universidad de Málaga, Málaga
crr@uma.es

embargo, su reclasificación ha sido constante durante todo el siglo XX, habiéndose incluido en los géneros *Phytomonas* (1923) y *Agrobacterium* (1943), incluida nuevamente en el género *Pseudomonas* como la subespecie *savastanoi* de *P. syringae* (1981) y, clasificándose posteriormente como *P. savastanoi* patovar (pv.) *savastanoi* por Gardan en 1992. Aunque la taxonomía del complejo *P. syringae*, en el que también se incluye *P. savastanoi*, se encuentra actualmente en revisión, considerándose *P. savastanoi* pv. *savastanoi* un sinónimo de *P. syringae* pv. *savastanoi*, aquí nos referimos a la bacteria causante de la tuberculosis del olivo (*olive knot disease*), como *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv). Sería de esperar que la secuenciación de genomas de cepas pertenecientes a los distintos patovares hoy incluidos en el complejo *P. syringae*, justifique en un futuro cercano la reclasificación en varias especies de este complejo de bacterias fitopatógenas.

A día de hoy, Psv es el único patógeno bacteriano del olivar incluido en la Directiva de la UE 92/34 relativa a las enfermedades que afectan a la calidad del aceite de manera significativa. Además, la tuberculosis, también conocida como verruga o roña del olivo, está presente con una incidencia variable en plantas de vivero, lo que limita su comercialización y exportación dado lo visible de su sintomatología (hiperplasia del tejido vegetal en troncos, ramas, tallos y brotes) (Figura 1). Se ha descrito que los olivos enfermos de tuberculosis muestran menor vigor y reducción del crecimiento. Además, datos experimentales recientes procedentes de infecciones controladas llevadas a cabo por J.M. Quesada, M.M. López y R. Peñalver en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, ver artículo de Peñalver et al.,



Figura 1. Síntoma característico de la tuberculosis del olivo. Hiperplasia en el tallo de un olivo infectado de forma natural por *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Fotografía cedida por I.M. Matas (Universidad de Málaga).

Cayo Ramos Rodríguez, nacido en Cádiz, es Licenciado (1985) y Doctor en Biología (1990) por la Universidad de Sevilla. Como investigador postdoctoral, trabajó durante diez años a caballo entre Dinamarca y España, realizando estancias en el *Department of Genetics, Carlsberg Laboratories*, Copenhague, Dinamarca (1990-1993), la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada (1994-1997) y el *Department of Microbiology, Technical University of Denmark*, Lyngby, Dinamarca (1997-2000). Desde Noviembre de 2000, es Profesor Titular del Área de Genética (Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología) de la Universidad de Málaga, donde dirige un equipo de investigación centrado en el estudio de interacciones establecidas entre bacterias y frutales, con especial interés en la tuberculosis del olivo. Ha sido vocal de la junta gestora del Grupo Especializado Microbiología de Plantas de la SEM (2002-2005).



en este mismo número), indican que la producción de olivos enfermos de tuberculosis puede disminuir con respecto a controles sin infectar. De este grupo del IVIA también proceden los datos más relevantes disponibles hasta la fecha sobre la sensibilidad de variedades de olivo españolas a la tuberculosis (Penyalver *et al.*, 2006), el comportamiento epifítico (Quesada *et al.*, 2007) y la dispersión de este patógeno en las mismas, y el desarrollo de métodos moleculares de detección (Penyalver *et al.*, 2000) y tipificación de aislados de Psv.

LA REVOLUCIÓN HORMONAL: ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO Y CITOQUININAS

Durante los años 60 del siglo XX, trabajos publicados por varios autores revelan el papel de las auxinas bacterianas en la formación de tumores por cepas de *P. savastanoi* aisladas de olivo y de adelfa, éstas últimas hoy incluidas en el patovar *nerii* de *P. savastanoi* (Psn). Desde entonces y hasta finales de los años 80, la investigación en esta bacteria fitopatogena se centra casi exclusivamente en el estudio de las fitohormonas de origen bacteriano. En España, R. Beltrá (Instituto Jaime Ferrán de Microbiología, CSIC) publica en *Microbiología Española* (1956-1964) una serie de trabajos relacionados con el metabolismo del triptófano en *P. savastanoi*, precursor del ácido indol-3-acético (IAA). Una excepción a esta tendencia, son los trabajos procedentes de este mismo Instituto y publicados en la misma revista (1977-1983) por M. Santaolalla y L. Cañas, relacionados con los lipopolisacáridos de *P. savastanoi* y su papel como receptores de un bacteriofago.

Las contribuciones más relevantes sobre el papel de las auxinas en la virulencia de *P. savastanoi* provienen de

T. Kosuge y colaboradores (Universidad de California, USA), quienes desentrañan la ruta biosintética del IAA en *P. savastanoi*, llevada a cabo por los productos de los genes *iaaM* e *iaaH*, homólogos a los presentes en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Yamada *et al.*, 1985), y evidencian que el IAA se transforma en el conjugado IAA-lisina, utilizando para ello el gen *iaaL*. La mayoría de los estudios realizados por este grupo se llevan a cabo en aislados de adelfa, portadores de plásmidos denominados pIAA en los que se codifican los genes *iaaM* e *iaaH* formando un operón, así como el gen *iaaL*, localizado corriente abajo del operón *iaaMH* y en dirección opuesta. La curación de plásmidos pIAA en Psn, tiene como consecuencia la incapacidad de inducir tumores en adelfa. Aunque en aislados de olivo la localización del operón *iaaMH* y del gen *iaaL* es mayoritariamente cromosómica, aislados de Psv italianos incapaces de sintetizar IAA tampoco inducen la formación de tumores en olivo (N. S. Iacobellis, A. Sisto y G. Surico). Resultados recientes de nuestro equipo de investigación han revelado que las cepas de Psv contienen dos copias de todos los genes *iaa*, cuya localización es mayoritariamente cromosómica (Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Matas *et al.*, 2009). Además, Psv contiene dos alelos diferentes del gen *iaaL*, siendo la secuencia de uno de ellos (*iaaL*-Psn) 100% idéntica a la del gen ortólogo en Psn. La secuencia del otro alelo (*iaaL*-Psv), es 93 % idéntica a la de su ortólogo en la bacteria patógena de tomate *P. syringae* pv. *tomato* (alelo *iaaL*-Pto), aunque *iaaL*-Psv contiene un número variable de repeticiones en tándem del trinucleótido TAC. Basándonos en el número de repeticiones TAC de este alelo, que varía de una cepa a otra entre 3 y 15 veces, se ha puesto a punto un método de tipificación de cepas de este patógeno mediante electroforesis capilar. La aplicación de este método a cepas de Psv procedentes de orígenes diversos, ha revelado que los números más elevados de repeticiones TAC detectados (entre 8 y 15) corresponden exclusivamente a aislados procedentes de la Península Ibérica (Matas *et al.*, 2009).

La producción de citoquininas por aislados de Psn y Psv es conocida desde los años 70 del siglo XX. Psn produce y libera al medio de cultivo principalmente zeatina y ribosilzeatina, mientras que Psv secreta además ribosil-1''-metilzeatina (MacDonald *et al.*, 1986). De especial relevancia son también los trabajos de A. Evidente y colaboradores (Universidad de Nápoles, Italia), quienes demuestran la producción de 1'-metilzeatina por cepas de *P. savastanoi*, así como la actividad de varias citoquininas producidas por cepas pertenecientes al complejo *P. syringae*. Hasta la fecha, el único gen de *P. savastanoi* cuya implicación en la producción de citoquininas se ha descrito es *ptz* (*Pseudomonas trans zeatin*), de localización plasmídica (plásmidos pCK) o cromosómica, tanto en aislados de olivo como de adelfa. Recientemente, hemos comprobado que algunos aislados virulentos de Psv no contienen este gen (Pérez-Martínez *et al.*, 2008). Tanto en Psv como en Psn, la curación de plásmidos portadores del gen *ptz*, y, por tanto, la pérdida de la capacidad de sintetizar citoquininas, tiene como consecuencia la inducción de tumores

no desarrollados completamente, en los que se inicia un proceso necrótico temprano. Hasta la fecha, no se ha comprobado si la sintomatología inducida por cepas curadas de plásmidos pIAA o pCK se debe exclusivamente a la ausencia de fitohormonas, o bien, existen otros genes de codificación plasmídica que también juegan un papel relevante en la formación de tumores.

PLÁSMIDOS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Las cepas pertenecientes al complejo *P. syringae*, contienen frecuentemente al menos un plásmido nativo de entre 10 Kb y 100 Kb en el que se localizan genes relevantes para la patogénesis, virulencia ó adaptación ecológica. La posible movilización de estos plásmidos entre bacterias que interactúan con plantas, y especialmente entre bacterias fitopatógenas, puede tener graves consecuencias en el control de las enfermedades causadas por las mismas, como por ejemplo ha ocurrido con la aparición y diseminación de genes de resistencia a cobre o antibióticos.

Los plásmidos de Psv despertaron el interés de la comunidad científica tras revelarse la codificación plasmídica de genes relacionados con la biosíntesis de IAA en cepas de *P. savastanoi*. En 1984, con la expectativa de que *P. savastanoi* contuviese plásmidos similares al plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, que pudiesen servir como vectores para la transferencia de genes al olivo y otras

plantas leñosas, el grupo liderado por R. Díaz-Orejas (CIB, CSIC, Madrid) aisló de una cepa virulenta de Psv un plásmido de 10Kb, denominado pPS10. Desde entonces, pPS10 se ha convertido en un modelo de estudio del proceso de iniciación de la replicación en bacterias Gram-negativas, modelo avalado por numerosas publicaciones que constituyen la base de una línea de investigación actualmente en curso en el CIB dirigida por R. Giraldo (Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004).

La mayoría de los plásmidos de *P. syringae* y *P. savastanoi* pertenecen a la familia de plásmidos pPT23A (familia PFP), caracterizada por codificar secuencias homólogas a la del gen *repA* (replicasa) de la cepa *P. syringae* pv. *tomato* PT23 (Murillo y Keen, 1994). Los aislados de Psv contienen entre 2 y 6 plásmidos nativos, la mayoría de ellos pertenecientes a la familia PFP. Para analizar el contenido génico de los plásmidos de Psv, se diseñó un macroarray que contenía 134 fragmentos de ADN pertenecientes a genes codificados en PFPs aislados de diversas *Pseudomonas* fitopatógenas. En colaboración con el Dr. George Sundin (Universidad de Michigan, USA) y el Dr. Jesús Murillo (Universidad Pública de Navarra, Pamplona), hemos llevado a cabo un análisis genómico de 23 plásmidos PFP y 9 plásmidos no pertenecientes a esta familia (nPFPs), procedentes de 10 cepas de Psv aisladas en orígenes diversos. Los resultados de este análisis han revelado que tanto los plásmidos PFPs como los nPFPs contienen secuencias relacionadas con su replicación, estabilidad y

partición, con la biosíntesis de sistemas de secreción tipo IVA (genes *vir*, homólogos a los codificados en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*) (Figura 2) y tipo IVB (genes *tra*, homólogos a los presentes en el plásmido Collb-Pg de *Shigella*), efectores del sistema de secreción tipo III (TTSS), genes implicados en la supervivencia epifítica y adaptación ecológica, así como elementos pertenecientes a secuencias de inserción y secuencias relacionadas con proteínas de función desconocida muy conservadas en *P. syringae*. En la actualidad, y en el contexto de las colaboraciones antes mencionadas, estamos llevando a cabo la secuenciación del los tres plásmidos nativos presentes en nuestra cepa de referencia *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, cepa seleccionada por su accesibilidad a modificación genética y virulencia en olivo. El análisis de la secuencia de nucleótidos de estos 3 plásmidos y la construcción de mutantes de pérdida de función en genes codificados en los mismos, nos permitirá en un futuro próximo abordar el efecto en virulencia de genes específicos de codificación plasmídica, en comparación con cepas de este patógeno curadas de plásmidos completos.

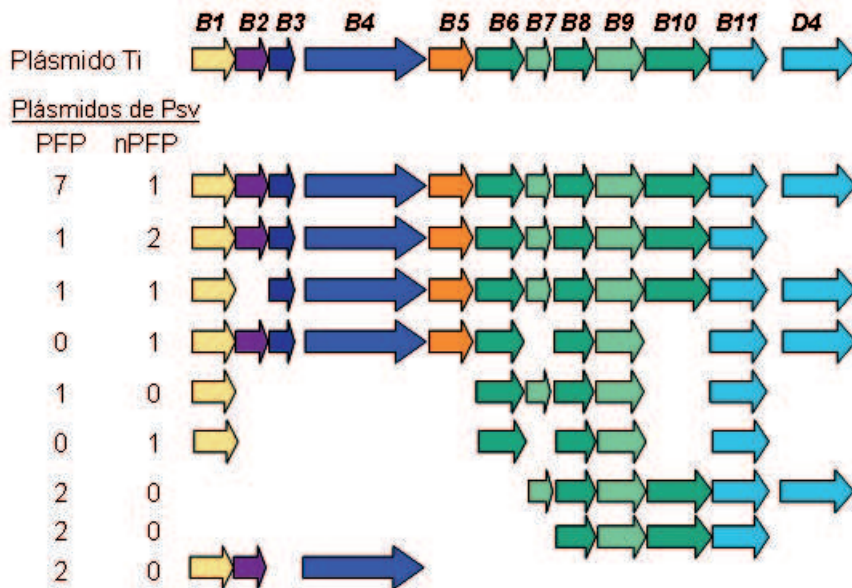


Figura 2. Presencia de genes pertenecientes al sistema de secreción Tipo IV A en plásmidos de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Se analizaron 32 plásmidos aislados de 10 cepas diferentes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), 23 de ellos pertenecientes a la familia del plásmido pPT23A (PFP) y 9 no pertenecientes a esta familia (nPFP). Utilizando un macroarray de ADN, se identificaron 22 plásmidos que contenían secuencias relacionadas con cada uno de los genes pertenecientes al sistema de secreción tipo IV A indicados (genes *virB* y *virD4*), en comparación a los presentes en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Se indica el número de plásmidos PFP y nPFP que comparten los mismos genes (Pérez-Martínez et al., 2008). Genes con funciones relacionadas se indican con diferentes tonalidades del mismo color.

DENTRO DEL OLIVO. VIDA ENDOFÍTICA DE *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

Como se ha mencionado anteriormente, la fase epifítica del ciclo de vida de Psv en olivo se ha descrito en detalle tanto en variedades de olivo españolas, como italianas. Sin embargo, y aunque las primeras observaciones de este patógeno en el interior de tumores de olivo se llevaron a cabo hace cerca de 100 años, los datos actualmente disponibles sobre la fase endofítica de Psv en olivo son escasos, aspecto que hemos abordado recientemente con nuestra cepa de referencia Psv NCPPB 3335. Como modelo de estudio, hemos utilizado plantas de olivo cultivadas *in vitro* de una variedad muy sensible a la tuberculosis, procedente de una semilla variedad Arbequina, cedida por Viveros Sevilla (Brenes, Sevilla) y micropropagada en colaboración con la Dra. Araceli Barceló (IFAPA, Centro de Churriana, Junta de Andalucía, Málaga). Previamente, se

comprobó que Psv NCPPB 3335 induce en esta variedad síntomas muy similares a los observados en olivos infectados de forma natural por este patógeno (Figura 3A). Sin embargo, la aparición de los primeros síntomas visibles (hiperplasia del tallo) es apreciable a partir de los 7-9 días después de la infección, periodo de tiempo al menos un mes inferior al necesario para la visualización de síntomas en plantas adultas. Además, la multiplicación del patógeno dentro de los tejidos de olivo *in vitro*, que alcanza una semana después de la infección densidades celulares de 10^7 - 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/tumor, sigue una cinética muy similar a la descrita previamente en plántulas de olivo de 1-2 años de edad (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). La observación mediante microscopía óptica de secciones tumorales teñidas con azul de metileno y picrofucsina permitió distinguir la presencia de núcleos xilema y floema de nueva formación en el tejido hiperplásico, visualizándose una conexión entre los haces vascular-

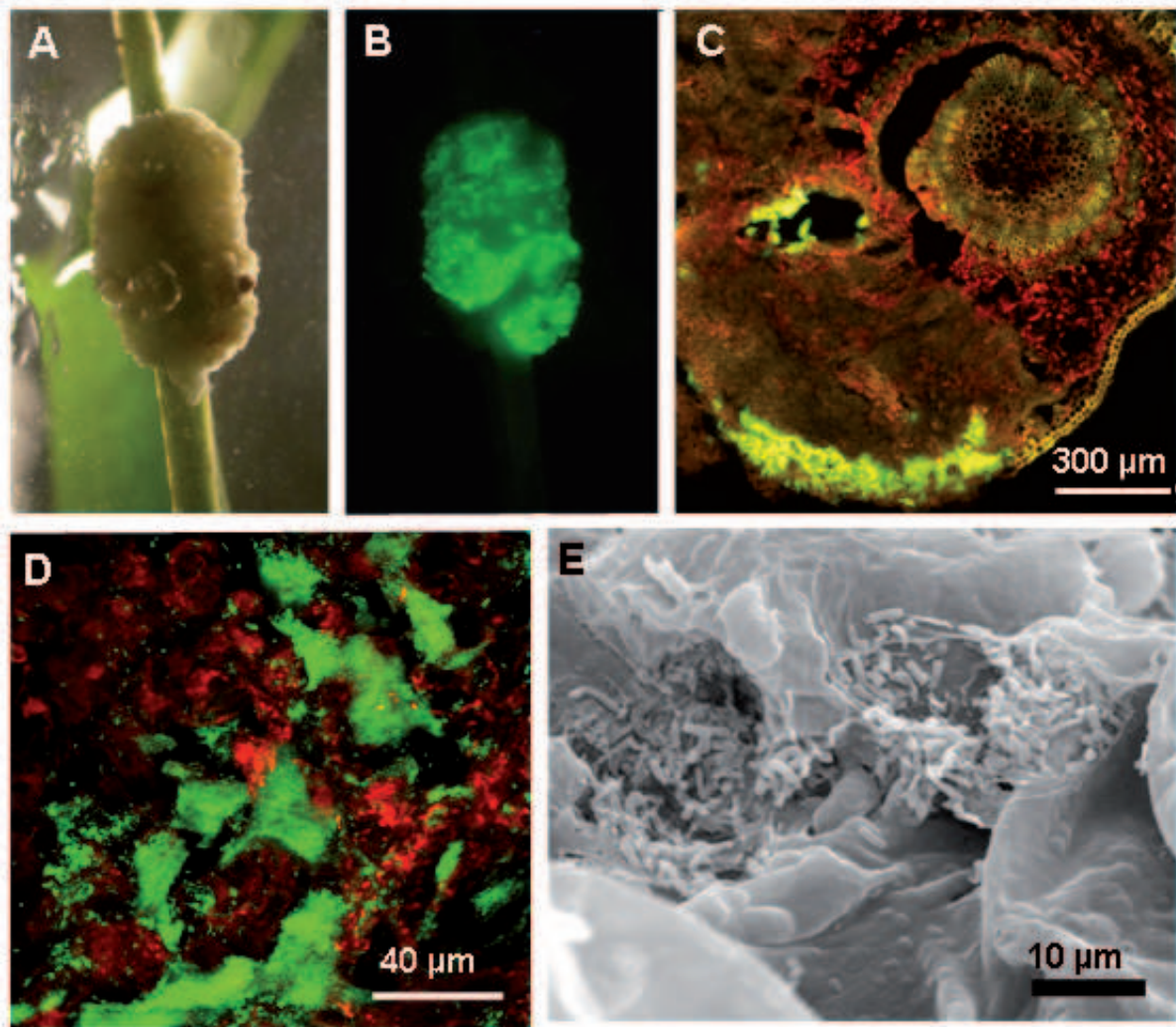


Figura 3. Visualización de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 durante la infección de olivo *in vitro*. Las condiciones de micropropagación, inoculación, cultivo y visualización mediante las distintas técnicas de microscopía utilizadas se describen en Rodríguez-Moreno *et al.*, (2009). **A)** Tumor desarrollado en el tallo de un olivo *in vitro* 28 días después de la inoculación (dpi). **B)** Imagen obtenida mediante microscopía de epifluorescencia del tumor mostrado en A). **C), D)** y **E)** Imágenes de microscopía de epifluorescencia (21 dpi), microscopía láser confocal (21 dpi) y microscopía electrónica de barrido (35 dpi), respectivamente, de secciones transversales de tumores inducidos en olivo *in vitro* tras la inoculación de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335-GFP.

res del tejido tumoral y el haz vascular central (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009).

La facilidad para modificar genéticamente la cepa NCPPB 3335, permitió su marcaje con la proteína verde fluorescente (GFP), utilizando para ello el plásmido pLRM1-GFP, plásmido estable en *Pseudomonas* desde el que se expresa la GFP constitutivamente sin alcanzar niveles tóxicos que afecten significativamente la multiplicación de esta cepa. La detección a tiempo real de la fluorescencia verde emitida por las células del patógeno en los tejidos de olivo (**Figura 3B**), facilitó la localización de las zonas tumorales más adecuadas para su análisis mediante otras técnicas de microscopía más resolutivas. NCPPB 3335-GFP se localizó en cavidades intercelulares formadas tras el colapso de las células vegetales, así como en zonas periféricas cercanas a la epidermis (**Figura 3C, 3D**) o invadiendo los haces de xilema de nueva formación (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009), lo que podría estar relacionado con la dispersión del patógeno y su salida al exterior a través de exudados vegetales. Por el contrario, no se observan este tipo de cavidades en los tumores inducidos en olivo *in vitro* por un mutante de esta cepa portadora de una delección del gen *hrpA*, componente estructural del TTSS, quedando limitada su localización al punto de inoculación (datos no publicados). Estos resultados concuerdan con los publicados previamente por A. Sisto y colaboradores (C.N.R., Bari, Italia), quienes demuestran que la formación de tumores en olivo tras la inoculación de Psv es dependiente del TTSS. Además, la observación de secciones de tumores inducidos por la cepa silvestre mediante microscopía electrónica de barrido, permitió la visualización de estructuras bacterianas organizadas, tanto microcolonias (**Figura 3E**) como tapetes bacterianos (*biofilms*), dentro del tejido tumoral. Por último, la visualización de secciones tumorales mediante microscopía electrónica de transmisión, reveló que Psv emite vesículas de membrana externa (OMVs) durante el proceso de infección de las células de olivo (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2009), fenómeno descrito en bacterias patógenas de animales pero no visualizado hasta la fecha en bacterias fitopatógenas durante la infección de plantas.

GENÓMICA DE *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

La utilización del cultivo de olivo *in vitro*, combinada con la aplicación de herramientas moleculares, abre las puertas al análisis molecular de los mecanismos bacterianos implicados en la interacción de Psv con el olivo. En este sentido, en la actualidad estamos llevando a cabo la identificación de genes de Psv NCPPB 3335 necesarios para su multiplicación e invasión del hospedador. Para ello, utilizamos una estrategia de genómica funcional, *Signature Tagged Mutagenesis* (STM), basada en la construcción de una colección de mutantes de NCPPB 3335 generados mediante transposición. Cada uno de los mutantes aislados contiene un transposón mini-Tn5-STM, portador de una etiqueta diferente (región variable de 40 pb identificable mediante hibridación *Southern*). Esta estrategia, uti-

lizada ampliamente para la identificación de factores de virulencia en bacterias patógenas de animales, combina la fuerza del análisis mutacional con la capacidad de seguir simultáneamente el incremento de la población de un amplio número de mutantes en un único hospedador (Hensel *et al.*, 1995). Hasta la fecha, hemos seleccionado 39 mutantes cuya competitividad se encuentra significativamente reducida *in planta* con respecto a la cepa silvestre. La identificación del punto de inserción del transposón y el análisis de las secuencias flanqueantes al mismo han revelado la identidad del gen interrumpido en todos estos mutantes. Los genes identificados, tres de los cuales se localizan en los plásmidos nativos de Psv NCPPB 3335, pertenecen a las siguientes categorías funcionales: 1) metabolismo central o de los ácidos nucleicos, 2) sistemas de secreción Tipo II, III, IV, 3) biosíntesis de envueltas celulares, 4) respuesta a estrés y adaptación ambiental, 5) quimiotaxis y movilidad, y 6) proteínas de función desconocida.

En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares y genómicas ha propiciado un avance considerable en el conocimiento de los factores responsables de la patogenicidad y virulencia del complejo *P. syringae* en plantas herbáceas. En la actualidad, se dispone de la secuencia completa de los genomas de tres patovares de *P. syringae*: pv. *phaseolicola*, pv. *syringae* (Psy) y pv. *tomato* (Pto) (<http://www.pseudomonas-syringae.org/>), causantes de la grasa de la judía, el moteado de la judía y el moteado del tomate, respectivamente. El análisis comparativo y funcional de la secuencia de estos tres genomas, está permitiendo caracterizar tanto los factores de virulencia conservados en el complejo *P. syringae*, como aquellos presentes únicamente en algunos patovares y que probablemente determinen la especificidad de hospedador. Teniendo en cuenta estos aspectos, nuestro equipo de investigación forma parte de un consorcio que actualmente lleva a cabo la secuenciación y análisis del genoma de Psv NCPPB 3335. Además de la Universidad de Málaga, participan en este proyecto otros tres grupos españoles: Jesús Murillo (Universidad Pública de Navarra, Pamplona), Pablo Rodríguez-Palenzuela y Emilia López-Solanilla, (Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid) y María M. López y Ramón Peñalver (IVIA, Valencia). La secuenciación de este genoma mediante pirosecuenciación (redundancia 15X), así como la determinación de la orientación y posición relativa de los *contigs* generados y ensamblaje de fragmentos en *supercontigs* (*pair-end library analysis*) la ha llevado a cabo MWG-Biotech (Planegg-Martinsried, Alemania). En la actualidad, disponemos de la secuencia de 112 *supercontigs*, así como de la anotación automática de los mismos, realizada por Pablo Rodríguez-Palenzuela en el *Genetics-Biotechnology Center* (Madison, USA). Para ello, se ha utilizado como molde el genoma disponible de la cepa filogenéticamente más cercana a Psv, Pph 14448A. El análisis comparativo y funcional de ambos genomas, que pensamos puede ser un método efectivo y fructífero para la identificación de los mecanismos que definen la especificidad de huésped y que condu-

cen a la producción de síntomas diferenciales por estas dos bacterias fitopatógenas, forma parte del proyecto financiado por el MICINN "PATOSAVASTOMICA", iniciado en enero de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Gran parte de los resultados aquí mencionados son producto de las Tesis Doctorales defendidas en la Universidad de Málaga por Isabel Pérez Martínez (noviembre 2007) y Luis Rodríguez Moreno (noviembre 2008). También se incluyen resultados obtenidos por Lotte Lambertsen durante su estancia en nuestro grupo (2004), financiada por la fundación Carlsberg (Copenhague, Dinamarca), así como de la Tesis Doctoral que Isabel M. Matas Casado lleva a cabo actualmente, financiada por la Fundación Ramón Areces. Gracias a todos por vuestra dedicación, amistad y confianza. Además de los colaboradores mencionados anteriormente, quiero agradecer especialmente su apoyo a este proyecto a Matilde Barón (CSIC, Granada), Stefania Tegli (*Polo Scientifico di Sesto*, Florencia, Italia) y al Grupo de "Microbiología y Patología Vegetal" dirigido por Antonio de Vicente (Universidad de Málaga). Gracias por ayudarnos a "desatar" nudos del olivo. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MCyT AGL2002-02214 y MEC AGL2005-02090, así como por los actualmente en curso MICINN AGL2008-05311-C02 (01 y 02) y Junta de Andalucía Po8-CVI-03475.

BIBLIOGRAFÍA

Giraldo R y Fernández-Tresguerres ME. (2004). Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid* 52: 69-83.

Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E y Holden DW. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269: 400-403.

Matas IM, Pérez-Martínez I, Quesada JM, Rodríguez-Herva JJ, Penyalver R y Ramos C. (2009). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* contains two *iaaL* paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. *Appl Environ Microbiol* 75(4): 1030-1035.

Murillo J y Keen NT. (1994). Two native plasmids of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain PT23 share a large amount of repeated DNA, including replication sequences. *Mol Microbiol* 12: 941-950.

MacDonald EM, Powell GK, Regier DA, Glass NL, Roberto F, Kosuge T y Morris RO. (1986). Secretion of zeatin, ribosylzeatin, and ribosyl-1'-methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*: Plasmid-coded cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* 82(3): 742-747.

Penyalver R, García A, Ferrer A, Bertolini E y López MM. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Appl Environ Microbiol* 66: 2673-2677.

Penyalver R, García A, Ferrer A, Bertolini E, Quesada JM, Salcedo CI, Piquer J, Pérez-Penadés J, Carbonell EA, del Río C, Caballero JM y López MM (2006). Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology* 96(3): 313-319.

Pérez-Martínez I, Zhao Y, Murillo J, Sundin GW y Ramos C. (2008). Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *J Bacteriol* 190 (2): 625-635.

Quesada JM, García A, Bertolini E, López MM y Penyalver R. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *Int Microbiol* 10: 77-84

Rodríguez-Moreno L, Barceló A y Ramos C. (2008) *In vitro* analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology* 98(7): 815-822.

Rodríguez-Moreno L, Jiménez AJ y Ramos C. (2009) Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microb Biotechnol* (en prensa, doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00101.x).

Yamada T, Palm CJ, Brooks B y Kosuge T. (1985) Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(19): 6522-6526.

Sociedad Española de Microbiología

Fundada en 1946



Miembro de:

FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGY SOCIETIES (FEMS)

INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (IUMS)

Representada en numerosos Comités Internacionales relacionados con la especialidad.

Agrupada a los interesados en cualquier faceta científica o profesional relacionada con los microorganismos.

Socios protectores de la SEM:

Francisco Soria Melguizo, S.A.
Merck Sharp & Dohme, S.A.
Pfizer, S.A.

Para solicitar más información,
inscripciones o publicidad,
diríjase a la Secretaría de la

Sociedad Española de Microbiología

Vitruvio, 8 - 28006 Madrid

Tel.: 915 613 381

Fax: 915 613 299

E-mail: orgra46@orgc.csic.es o secretaria.sem@semicro.es

Socios colaboradores de los Grupos Especializados de la SEM:

- **AGBAR, S.A.**
- **BIOETANOL GALICIA**
- **EMASA**
- **EMASESA**
- **Iberdrola, S.A.**
- **Instituto Tecnológico Agroalimentario**
- **Iproma, S.L.**
- **Laboratorio Municipal de Vigo**
- **Millipore Ibérica, S.A.**
- **Proaguas Costablanca, S. A.**
- **THOR Especialidades, S.A.**
- **VWR International Eurolab (grupo Merck)**

BAControl

Material de Referencia Microbiológico

Para facilitar el control de calidad en el laboratorio.

Fácil de usar, rápido, seguro, trazable y cuantitativo. En sólo 3 pasos y 10 minutos.



BAControl

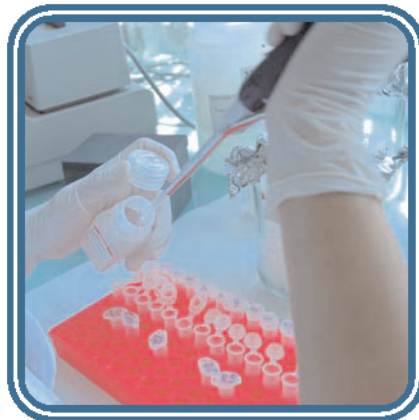
(material de referencia bacteriológico cuantitativo de uso diario).

Cada pastilla contiene un número determinado de células viables y cultivables.

Es el material apropiado para la realización de controles de calidad rutinarios, como controles de proceso, creación de gráficos de control o controles de calidad de medios de cultivo.

CARACTERÍSTICAS

Homogéneo
Estable a largo plazo
Cuantitativo
Fácil conservación
Preparación sencilla



VENTAJAS

Fácil de usar
Rápido
Seguro
Trazable
Cómodo y práctico

Y si lo que buscas es precisión y medida,

BACuanti

el material de referencia bacteriológico cuantitativo
y certificado (cultivo, PCR y DNA)



CONTACTA CON NOSOTROS

LABAQUA, S.A.
C/ Dracma 16-18
Pol. Ind. Las Atalayas
03114 Alicante (España)



Tfno. +34 965 10 60 70
Fax +34 965 10 60 80
info@labaqua.com
www.labaqua.com