

## 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*

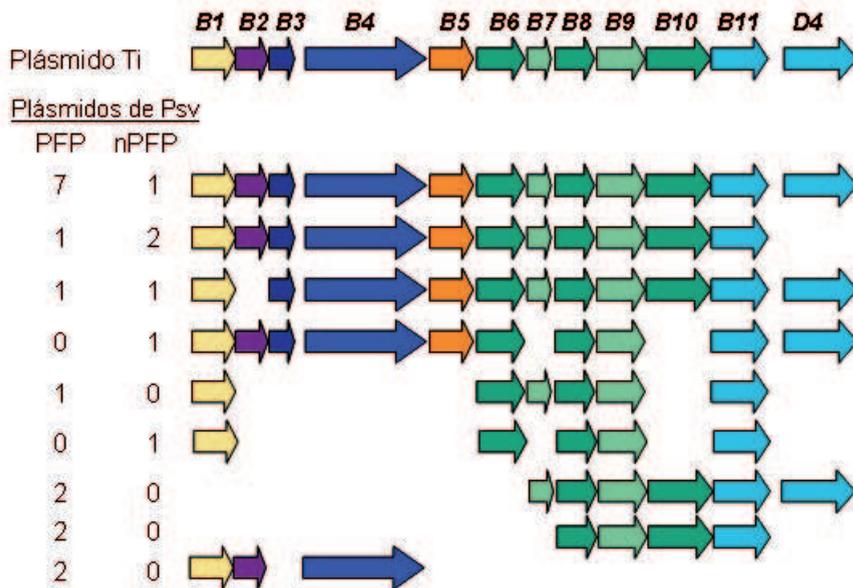
Las cepas pertenecientes al complejo *P. syringae*, contienen frecuentemente al menos un plásmido nativo de entre 10 Kb y 100 Kb en el que se localizan genes relevantes para la patogénesis, virulencia ó adaptación ecológica. La posible movilización de estos plásmidos entre bacterias que interactúan con 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.

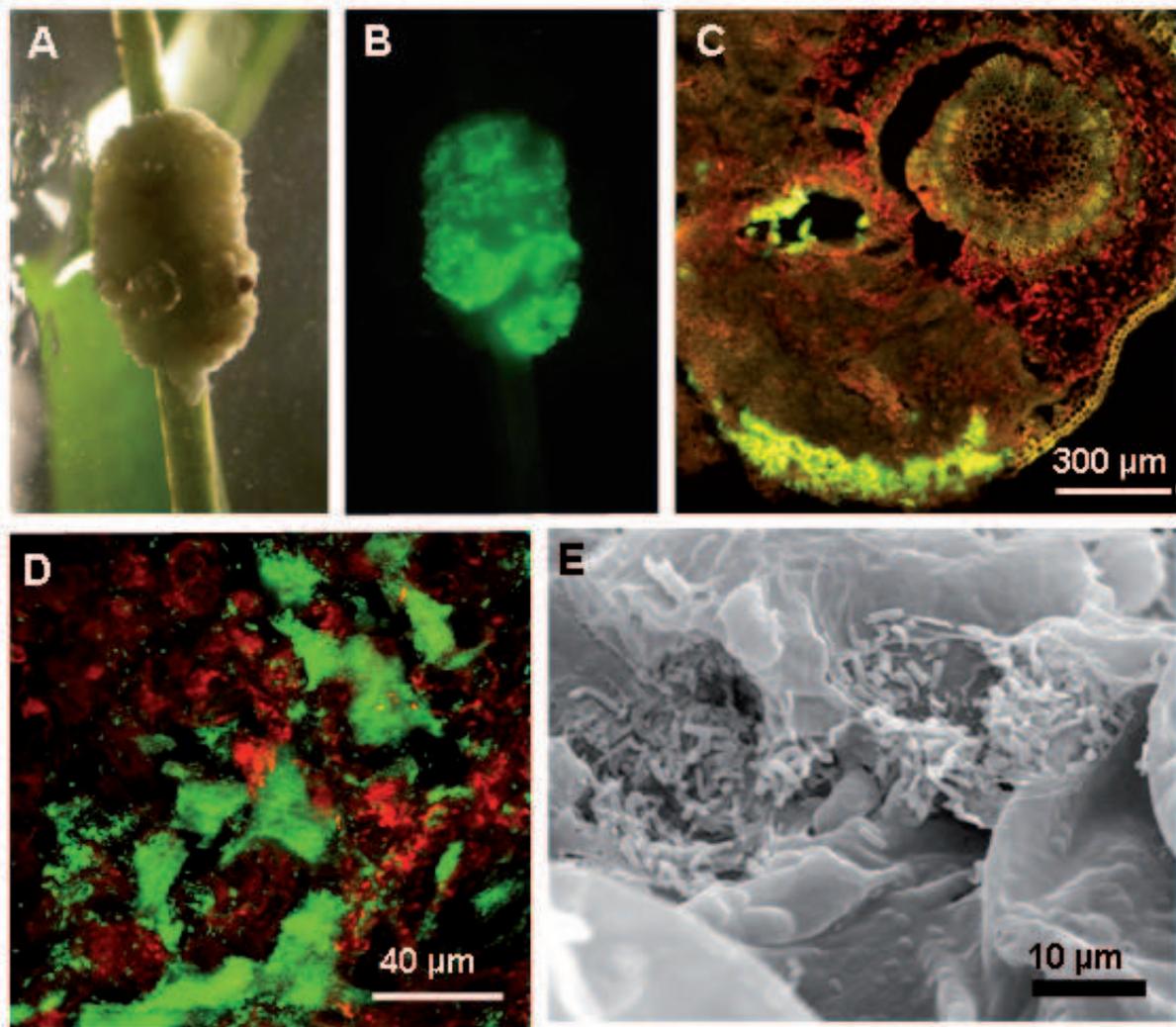


**Figura 2. Presencia de genes pertenecientes al sistema de secreción Tipo IV A en plásmidos de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.** Se analizaron 32 plásmidos aislados de 10 cepas diferentes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), 23 de ellos pertenecientes a la familia del plásmido pPT23A (PFP) y 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)** e **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](mailto:orgra46@orgc.csic.es) o [secretaria.sem@semicro.es](mailto: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)**