

Biología y control de enfermedades de plantas

Diego Romero, Francisco M. Cazorla, Dolores Fernández-Ortuño, Alejandro Pérez-García, Cayo Ramos, Juan A. Torés y Antonio de Vicente

Grupo de Biología y Control de Enfermedades de Plantas. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC) «La Mayora», Universidad de Málaga-CSIC

adevicente@uma.es



Foto de grupo. Miembros del grupo de Biología y Control de Enfermedades de Plantas delante de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

El grupo de Biología y Control de Enfermedades de Plantas del IHSM-UMA-CSIC en Málaga, está compuesto por siete investigadores sénior que coordinan los diferentes proyectos y contratos con empresas; en la Universidad de Málaga, Francisco Cazorla, Alejandro Pérez, Diego Romero y Antonio de Vicente (Departamento de Microbiología) y Cayo Ramos (Área de Genética); en la Estación Experimental La Mayora del CSIC, Dolores Fernández-Ortuño y Juan A. Torés. Además forman parte del grupo, a día de hoy, un investigador postdoctoral, catorce investigadores en formación realizando su tesis doctoral y tres técnicos de laboratorio, así como varios estudiantes de Master y TF Grado (Foto de grupo). El interés del grupo se centra en el estudio de la etiología, epidemiología y control de enfermedades de culti-

vos subtropicales y mediterráneos relevantes (mango, aguacate, olivo, cucurbitáceas, fresa), y en la caracterización de la biología, patología, virulencia y ecología de los patógenos (bacterias y hongos) responsables. El uso de una estrategia multidisciplinar que abarca desde la fitopatología convencional a la microscopía, la genética, la química o genómica nos está permitiendo profundizar en el detalle molecular de las interacciones microbio-planta en escenarios como: i) el estudio de cepas bacterianas como agentes de control biológico, ii) la detección y caracterización de la resistencia a fungicidas, iii) el análisis de las interacciones moleculares de patógenos humanos como *Bacillus cereus*, o patógenos de plantas, como *Podosphaera xanthii* y *Pseudomonas savastanoi* con distintos cultivos.

PATOLOGÍAS EMERGENTES DEL CULTIVO DEL MANGO

El mango es uno de los cultivos subtropicales más extendidos y asentados en Andalucía. Nuestro grupo, bajo la coordinación de A. de Vicente y F.M. Cazorla, viene trabajando desde 1992 en aportar soluciones prácticas para el control y la prevención de los dos problemas fitosanitarios más importantes de este cultivo en España, la necrosis apical y la malformación. Actualmente estamos concentrados en el estudio de la biología, ecología, virulencia, epidemiología y control de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, agente causal de la necrosis apical del mango en diferentes áreas subtropicales y mediterráneas (España, Israel, Italia o Australia) (Figura 1A). La reciente secuenciación del genoma de una cepa modelo nos ha mostrado algunas singularidades relacionadas con: i) su virulencia sobre mango, un huésped leñoso, y ii) su estilo de vida, con alternancia de etapas patogénicas, en las que produce los síntomas en el árbol, y etapas de vida epífita asintomáticas. Entre los factores característicos de

las cepas patógenas de mango destacan la producción de mangotoxina, implicada en la virulencia de la bacteria y la producción de celulosa, relacionada con la capacidad de colonizar epifíticamente. En cuanto a la malformación del mango, enfermedad que afecta a los brotes, reduciendo fuertemente a la producción, nuestros trabajos centrados en el estudio de la etiología y la epidemiología de la enfermedad han demostrado la presencia en España de al menos dos especies, *Fusarium mangiferae* y *Fusarium tuiense*, y apuntan a varias entradas diferentes del patógeno en España.

GENÓMICA Y EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED EN *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

Línea de investigación iniciada en 2002 y coordinada por C. Ramos, inicialmente dirigida al análisis genómico de la bacteria patógena del olivo *Pseudomonas savastanoi*

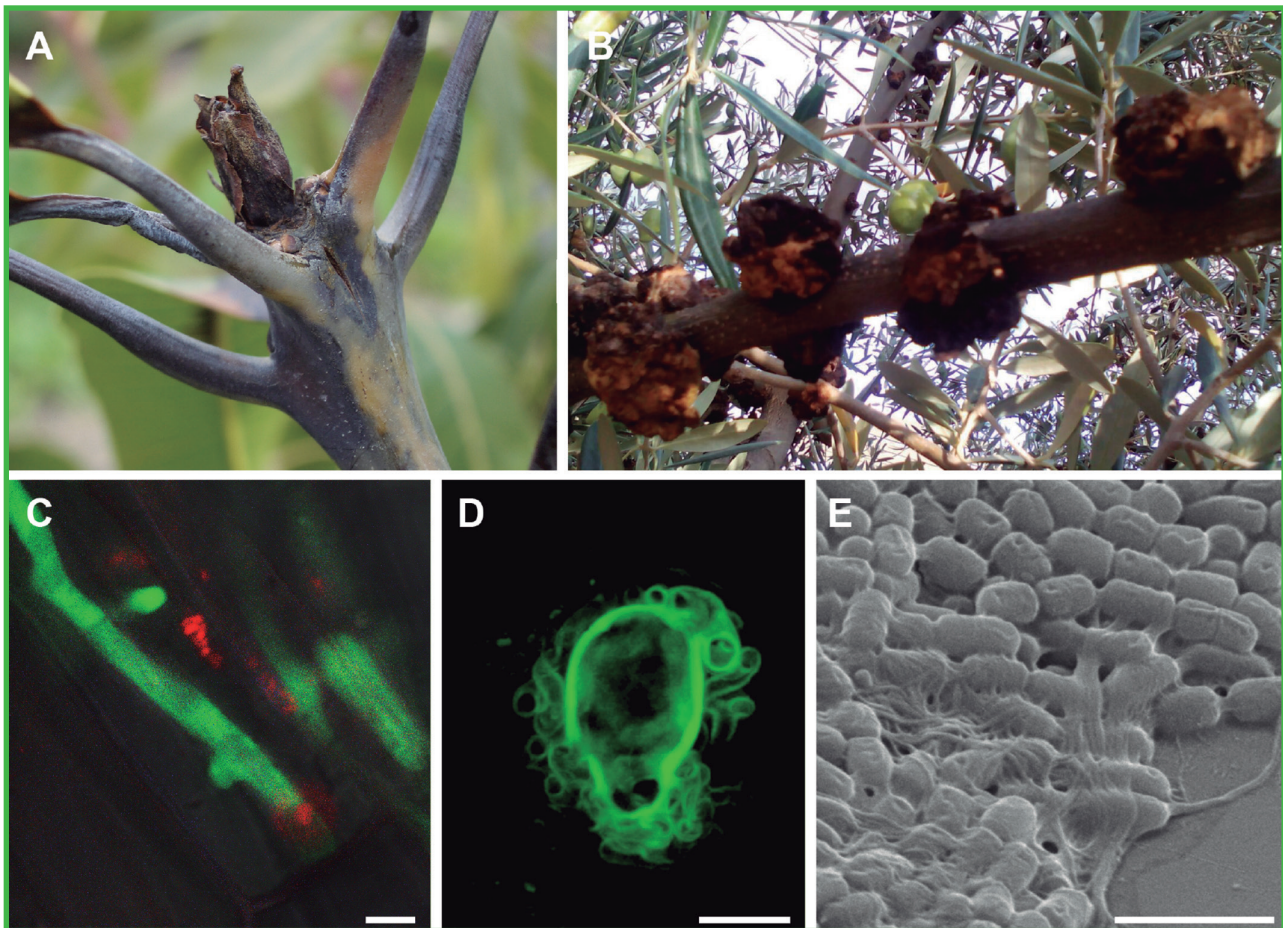


Figura 1. A) Síntomas característicos de la necrosis apical del mango causada por *Pseudomonas syringae*. B) Olivo mostrando un fuerte ataque de tuberculosis causada por *Pseudomonas savastanoi*. C) Micrografía confocal de las interacciones multitróficas entre la raíz de aguacate, las hifas de *Rosellinia necatrix* (expresando gfp) y *Pseudomonas chlororaphis* (expresando rfp). D) Micrografía confocal de un haustorio aislado de *Podosphaera xanthii* marcado con WGA-Alexa Fluor 488. E) Micrografía electrónica de barrido de un biofilm de *Bacillus cereus*, donde las células están embebidas en una matriz extracelular adhesiva. (Barras, 5 μ m).

pv. savastanoi (Psv), perteneciente al complejo *Pseudomonas syringae*. *P. savastanoi* produce tumores aéreos en el huésped, provocando la tuberculosis, una de las enfermedades más importantes del olivo (Figura 1B). Además es patógeno de otras especies de plantas, como la adelfa, el fresno, el granado, el jazmín o la retama, y recientemente se ha revelado como un patógeno emergente en la especie ornamental *Mandevilla sanderi* (dipladenia), arbusto de tendencia trepadora y cuyo cultivo en Andalucía genera más de siete millones de ejemplares anuales destinados principalmente al Centro y Norte de Europa. La secuenciación en 2010 del genoma de la cepa Psv NCPPB 3335 en combinación con estrategias de análisis genómico funcional, nos han permitido identificar nuevos genes de virulencia y establecer a *P. savastanoi* como un modelo para el análisis molecular de la interacción entre bacterias patógenas y plantas leñosas. Durante los últimos cinco años, nuestra investigación centrada en el análisis de la patogenidad y virulencia en *P. savastanoi* ha permitido: i) identificar dos nuevas familias de proteínas (efectores) inyectadas por la bacteria en las células del huésped a través del sistema de secreción tipo III (familias HopBK y HopBL) ii) determinar la implicación de dos enzimas relacionadas con el metabolismo del segundo mensajero diguanilato cíclico (di-GMPc), en la supervivencia y virulencia de la bacteria en olivo. En paralelo, nuestro interés está dirigido al análisis genómico comparativo y funcional de la especificidad de huésped en los diversos patovares de *P. savastanoi*.

INTERACCIONES MULTITRÓFICAS EN LA RIZOSFERA

En esta línea de investigación, dirigida por F.M. Cazorla, estamos interesados en el estudio de las interacciones que tienen lugar entre distintos microbios con la rizosfera de las plantas, especialmente durante los eventos de control biológico. Para ello trabajamos principalmente con el modelo aguacate / *Rosellinia* (Figura 1C), en paralelo con los modelos trigo / *Rosellinia* y tomate / *Fusarium*. El aguacate es un cultivo de máximo interés en nuestra área, y *R. necatrix* es un patógeno fúngico emergente que causa la podredumbre blanca radicular, una enfermedad devastadora de este cultivo. En un primer abordaje nos hemos centrado en el estudio de las bases moleculares mediante las cuales rizobacterias (principalmente los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*) desarrollan su actividad de biocontrol frente a distintos patógenos fúngicos de suelo, incluido *R. necatrix*. Nuestros trabajos han demostrado la relevancia de la producción de antibióticos antifúngicos, la eficiente colonización de raíces, la formación de biofilm o la interacción directa con el hongo patógeno, en la biología de los microbios en la rizosfera así como en los procesos que tienen lugar en la misma. Un segundo abordaje, consistente en el estudio del efecto de aplicaciones de enmiendas orgánicas a suelos agrícolas, se produce: i) la mejora tanto del estado fisiológico como del estado fitosanitario de las plantas y ii) el fomento en el desarrollo de supresividad frente

a patógenos fúngicos. El uso de diferentes herramientas como la genómica funcional, nos están permitiendo profundizar en el efecto de las enmiendas orgánicas en la diversidad microbiana de los suelos agrícolas y en la rizosfera de las plantas, y revelar su papel en dicha supresividad.

EL OÍDIO DE LAS CUCURBITÁCEAS

A pesar de los grandes esfuerzos invertidos tanto por compañías de semillas como de agroquímicos, los oídios (*Erysiphales*) continúan siendo uno de los principales factores limitantes para muchos cultivos. El oídio de las cucurbitáceas (*Podosphaera xanthii*) es una de las pesadillas a las que se enfrenta el cultivo de cucurbitáceas en todo el mundo (Figura 1D). La previsión en la aparición de resistencias a los fungicidas usados en el control de la enfermedad, y la diversidad de razas del patógeno que dificultan la aplicación de programas de mejora genética, fuerzan a identificar nuevas dianas para el desarrollo de nuevas herramientas para el control de la enfermedad. La expansión de la genómica y el avance de las tecnologías para explotar esta información, proporcionan una plataforma novedosa desde la cual se pueden desarrollar el futuro arsenal de herramientas de fitoprotección. En esta línea de investigación, coordinada por A. Pérez-García, usamos la información genómica de *P. xanthii* y otras especies de oídios para abordar los objetivos siguientes: i) definir el secretoma de *P. xanthii* mediante la combinación de datos de secuencia de los transcriptomas epifítico y haustorial, ii) identificar proteínas secretadas del hongo claves para el proceso patogénico mediante el análisis funcional de efectores candidatos y de proteínas secretadas conservadas, y iii) identificar las dianas moleculares de estos efectores en melón, preferiblemente aquellos implicados en la manipulación de las defensas del hospedador. Los resultados esperados deberían permitir la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de fungicidas o de nuevas variedades de melón resistentes, y así contribuir al desarrollo de una agricultura más sostenible y productiva.

RESISTENCIA A FUNGICIDAS

Esta línea de investigación liderada por J.A. Torés empezó a trabajar en resistencia a fungicidas del oídio de cucurbitáceas (*Podosphaera xanthii*, sin.: *Podosphaera fusca*) a partir del año 1998. Los trabajos iniciales permitieron desarrollar las técnicas y métodos que permitieron superar las dificultades inherentes a su naturaleza como patógeno estricto, que no puede crecer en medios de cultivo. En sucesivos proyectos se abordó el estudio de la resistencia del oídio a fungicidas como las estrobilurinas, los inhibidores de la enzima C-14 demetilasa (biosíntesis del ergosterol) y otras materias activas como bupirimato, metil-tiofanato y quinoxifen. Con los resultados obtenidos se han completado mapas de distribución de resistencia a las diferentes materias activas y/o mecanismos de acción en los cultivos de cucurbitáceas en la mitad sur de España, permitiéndonos hacer recomendaciones acerca del empleo

de diferentes antioídios en función de la provincia y del cultivo. Más tarde dirigimos nuestro interés a la búsqueda de proteínas clave en la patogénesis (v.g. efectores) para tratar de hallar nuevas dianas para el control de la enfermedad. A partir de 2014 hemos iniciado una nueva línea de investigación centrada en el control químico del hongo *Botrytis* en fresa y coordinada por D. Fernández-Ortuño, que se reincorporó a nuestro grupo con un contrato Marie Curie COFUND «Umobility» (Universidad de Málaga). En este proyecto se pretende monitorizar la resistencia a fungicidas en patógenos de fresa, de forma que se contribuya al desarrollo de una agricultura más sostenible y productiva.

LA VIDA EN SOCIEDAD DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS EN LA SUPERFICIE DE PLANTAS

Bacillus es un género bacteriano apasionante, donde tienen cabida especies patógenas de humanos y otras que puedan ser beneficiosas para la salud de las plantas. Como otras especies bacterianas, *Bacillus* es capaz de vivir en comunidad (biofilms), donde las células quedan embebidas y protegidas dentro de una matriz extracelular hecha de diferentes polímeros (Figura 1E). En esta línea de investigación coordinada por D. Romero, estamos interesados en el estudio de la regulación de la formación de biofilms de diferentes especies de *Bacillus* y su contribución a la ecología e interacción con la superficie aérea de las plantas. Para ello trabajamos con *B. cereus*, sobre todo cepas patógenas de humanos, o *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, eficaces agentes de control biológico de enfermedades de plantas. Desde un prisma multidisciplinar abordamos un estudio integral del nicho planta-microbio que permita dar respuesta a cuestiones mecanísticas relacionadas con: i) el ensamblaje de la matriz extracelular, prestando especial atención al papel de las proteínas tipo amiloide, ii) el impacto de los biofilms en la interacción *Bacillus*-planta, ecología de la bacteria y fisiología de la planta, y iii) el papel de los biofilms en la interacción entre diferentes especies bacterianas en la superficie vegetal. Nuestra línea de investigación se alimenta de los principios que definen la producción sostenible de alimentos, donde: i) se potencia el efecto beneficioso de los agentes de biocontrol en la salud de la planta, y ii) se reduzca la presencia de patógenos de humanos en los cultivos, siempre minimizando el daño al ambiente.

PUBLICACIONES SELECCIONADAS

- Aragón IM, Pérez-Mendoza D, Gallegos MT, Ramos C. (2015). The c-di-GMP phosphodiesterase BifA is involved in the virulence of bacteria from the *Pseudomonas syringae* complex. *Mol Plant Pathol* 16: 604–15.
- Bellón-Gómez D, Vela-Corcía D, Pérez-García A, Torés JA (2015). Sensitivity of *Podosphaera xanthii* populations to anti-powdery mildew fungicides in Spain. *Pest Manag. Sci.* 71: 1407-1413.
- Bonilla, N, Vida C, Martínez-Alonso M, Landa BB, Gaju N, Cazorla FM, de Vicente A. (2015). Organic amendments to avocado crops induce suppressiveness and influence the composition and activity of soil microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 81: 3405-18.
- Calderón, CE, de Vicente A, Cazorla FM (2014). Role of 2-hexyl, 5-propyl resorcinol production by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 in the multitrophic interactions in the avocado rhizosphere during the biocontrol process. *FEMS Microbiol Ecol* 89: 20-31.
- Caro-Astorga J, Pérez-García A, de Vicente A y Romero D. (2015). A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Front Microbiol* 5: 745.
- Crespo M, Arrebola E, Cazorla FM, Maymon M, Freeman S, Aoki T, O'Donnell K, Torés JA, de Vicente A. (2015). Analysis of genetic diversity of *Fusarium tuiense*, the main causal agent of mango malformation disease in southern Spain. *Plant Disease*: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0153-RE>.
- Fernández-Ortuño D, Grabke A, Li X, Schnabel G (2015). Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 105: 424-32.
- Magno-Pérez-Bryan MC, Martínez-García PM, Hierrezuelo J, Rodríguez-Palenzuela P, Arrebola E, Ramos C, de Vicente A, Pérez-García A, Romero D. (2015). Comparative genomics within the *Bacillus* genus reveal the singularities of two robust *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strains. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 1102-16
- Martínez-Cruz J, Romero D, Dávila JC, Pérez-García A. (2014). The *Podosphaera xanthii* haustorium, the fungal Trojan horse of cucurbit-powdery mildew interactions. *Fungal Genet Biol* 71: 21-31
- Martínez-García P, Rodríguez-Palenzuela P, Arrebola E, Carrión VJ, Gutiérrez-Barranquero, JA, Pérez-García A, Ramos C, Cazorla FM, de Vicente A. (2015). Bioinformatics analysis of the complete sequence of the mango tree pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 reveals traits relevant to virulence and epiphytic lifestyle. *PLoS ONE* 10:e0136101.
- Matas IM, Castañeda-Ojeda MP, Aragón IM, Antúnez-Lamas M, Murillo J, Rodríguez-Palenzuela P, López-Solanilla E, Ramos C. (2014). Translocation and functional analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 type III secretion system effectors reveals two novel effector families of the *Pseudomonas syringae* complex. *Mol Plant Microbe Interact* 27: 424-36.
- Vela-Corcía D, Romero D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A. (2015). Transient transformation of *Podosphaera xanthii* by electroporation of conidia. *BMC Microbiol.* 15: 20-

La sección «nuestra ciencia» publica reseñas de artículos científicos producidos por nuestros socios. La extensión máxima es de 250 palabras. Envía tus reseñas a la Dirección de las revistas o al delegado de Difusión de tu Grupo Especializado.

semaforo@semicrobiologia.org
noticiasem@semicrobiologia.org