FITOPATOLOGÍA
Publicación oficial de la Sociedad Española de Fitopatología

SEF
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA

Año 2022 Número 8

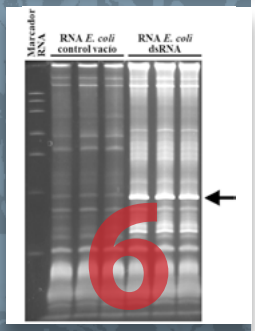
VIRUS Y VIROIDES COMO HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

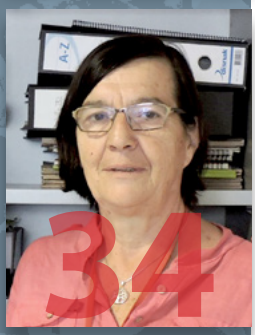
XX Congreso Nacional de la SEF

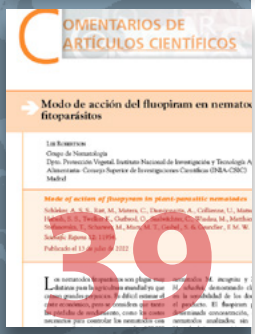
Entrevista a la Dra. Aurora Fraile

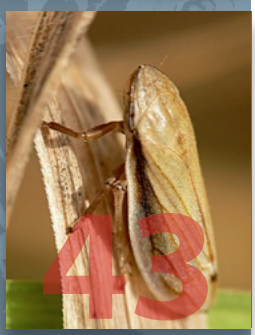
Premios SEF Fito-Relatos y Fotografía

Contenido









PRESENTACIÓN por el Presidente de la SEF ---- 4
(Vicente Pallás)

ARTÍCULOS DE REVISIÓN ---- 6

- Vectores de expresión derivados de virus de plantas y viroides ---- 6
  (Por José Antonio Daròs)
- Aplicaciones biotecnológicas de las nanopartículas del virus del mosaico del nabo --- 13
  (Por Daniel A. Truchado, Sara Rincón, Lucía Zurita y Fernando Ponz)
- Uso de elementos derivados de virus de plantas en aplicaciones biotecnológicas ---- 20
  (Por Adrià Bugeda y Juan José López-Moya)
- VIGS y tecnologías relacionadas en el análisis funcional de la interacción planta-patógeno ---- 27
  (Por Francisco Tenllado)

ENTREVISTA ---- 34

... a la Dra. Aurora Fraile ---- 34
(Por Soledad Sacristán)

COMENTARIOS DE ARTÍCULOS ---- 39

- Modo de acción del fluopiram en nematodos fitoparásitos ---- 39
  (Por Lee Robertson)
- Dos proteínas específicas de los apresorios de *Magnaporthe* (MAS), MoMas3 y MoMas5, son necesarias para suprimir la inmunidad innata del huésped y promover el crecimiento biotrófico en las células de arroz ---- 40
  (Por Jorge Poveda)
- Volverse viral: Agentes de control biológico basados en virus para la protección vegetal ---- 41
  (Por Inmaculada Ferriol)

FUE NOTICIA EN 2021 ---- 43
(Por Soledad Sacristán y Nieves Capote)

- Identificado un nuevo vector de *Xylella fastidiosa* ---- 43
- Investigadores del IVIA y de la Universitat de València identifican bacterias antagonistas para el control del fuego bacteriano ---- 43
- La SEF ya tiene canal YouTube ---- 44

- Celebrado el encuentro internacional Phytoma: "Nuevo escenario de la sanidad en el olivar" ---- 44
- Sanidad Vegetal nombra a Valgenetics laboratorio designado para análisis fitosanitarios ---- 45
- Celebrado con éxito el XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología ---- 45

TESIS DOCTORALES ---- 46

RESEÑAS DE CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS ---- 48

- XVI Congreso de la Unión Mediterránea de Fitopatología (MPU2022) ---- 48
  (Por Manuel Anguita y Blanca B. Landa)
- III Reunión Nacional RENAVIPLANT ---- 49
  (Por Pedro Gómez)
- 15º Congreso Internacional de Epidemiología de Virus de Plantas (ISPVE) ---- 50
  (Por Aránzazu Moreno)
- III Reunión FITORES ---- 52
  (Por José Díaz y Dolores Fernández-Ortuño)
- VI Jornadas Científicas de Estudiantes de la Sociedad Española de Bioestadística ---- 53
  (Por Martina Cendoya)
- XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología ---- 55
  (Por Vicente Pallás)

NUEVOS PATÓGENOS EN ESPAÑA octubre 2021 - septiembre 2022 ---- 58
(Por Juan A. Navas-Cortés)

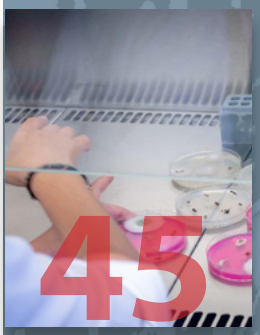
FITO-RELATOS: El libro de Abu ---- 62
(Por David Ruano)

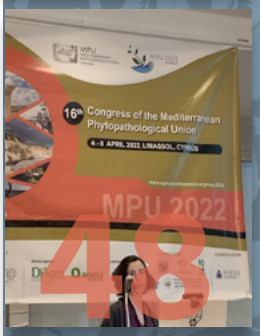
PREMIO SEF DE FOTOGRAFÍA CIENTÍFICA EN FITOPATOLOGÍA "MIGUEL CAMBRA" ---- 66
(A Rafael Villar Moreno)

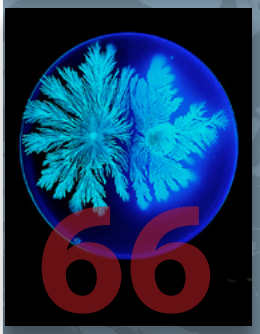
IN MEMORIAM ---- 67

- Antonio López Barcina
  (Por Pablo Castillo)

CRÉDITOS ---- 69







Presentación

Vicente Pallás
(Presidente de la SEF)

Apreciados socios y amigos de la SEF,

Después de dos años duros en los que la pandemia del SARS-CoV-2 nos ha limitado en gran medida nuestras vidas, por fin pudimos juntarnos con ocasión del XX Congreso de nuestra Sociedad y pudimos finalmente intercambiar *in situ*, en lugar de *in silico*, conocimiento, ideas y proyectos de colaboración. Los congresos constituyen una espectacular tormenta de ideas y son una de las principales actividades, si no la que más, de cualquier sociedad científica. En este recién terminado congreso celebrado en Valencia pudisteis disfrutar físicamente por primera vez de un ejemplar de la revista de la SEF y percataros de la calidad y el mimo con que se diseña y edita, gracias a la magnífica coordinación de Nieves Capote y Carmen Hernández y a la labor editorial de Alicia Irurzun. Podéis comprobar, de nuevo, que nuestros artículos están a la altura de los que se publican en cualquier revista internacional de prestigio y que nuestros socios están a la vanguardia del conocimiento fitopatológico actual.

Artículo de revisión I

Vectores de expresión derivados de virus de plantas y viroides

Sección de Revisiones

En este número de la revista de la SEF que ahora os presentamos podéis constatar ambas afirmaciones. Los virus se descubrieron como agentes causales de importantes enfermedades de plantas y animales, pero los científicos hemos sido capaces de darle la vuelta a este escenario y aprovechar sus cualidades infectivas en beneficio propio. Esta es la idea conceptual del presente número y así podéis disfrutar de cuatro magníficas Revisiones sobre el uso de los virus como herramientas en Fitopatología. En la primera revisión, J. A. Daròs (IBMCP, Valencia) nos describe el uso de virus y viroides como vectores para expresar proteínas o RNA recombinantes, metabolitos de interés o los componentes de la reacción de edición genética CRISPR-Cas. En el segundo artículo de revisión se describen las aplicaciones y potencialidades de las nanopartículas derivadas de virus de plantas (D. A. Truchado, S. Rincón, L. Zurita y F. Ponz; CBGP-Madrid). En la tercera revisión, A. Bugeda y J. J. López-Moya (CRAG, Barcelona) revisan el uso de elementos génicos derivados de virus de plantas en aplicaciones biotecnológicas. En la cuarta revisión se describe el uso del silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés) en el análisis funcional de la interacción planta-patógeno (F. Tenllado; CIB, Madrid).

ENTREVISTA...

...a la Dra. Aurora Fraile

Entrevista a la Dra. Aurora Fraile

En la Entrevista a un fitopatólogo de relevancia y socio de la SEF, tenemos el placer de presentaros en este número a una socia fundadora de nuestra Sociedad, la Dra. Aurora Fraile, profesora titular de la Escuela de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) e investigadora principal del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) de la Universidad Politécnica de Madrid, recientemente jubilada. Aurora nos relata su interesante trayectoria investigadora y docente y nos deja mensajes muy certeros que no deben caer en el olvido: "A pesar de que la Fitopatología tiene cada vez menos presencia en los planes de estudio de la mayoría de las carreras de Ingeniero Agrónomo en sus distintas nomenclaturas, creo que es una disciplina imprescindible para manejar de manera racional los cultivos".

COMENTARIOS DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

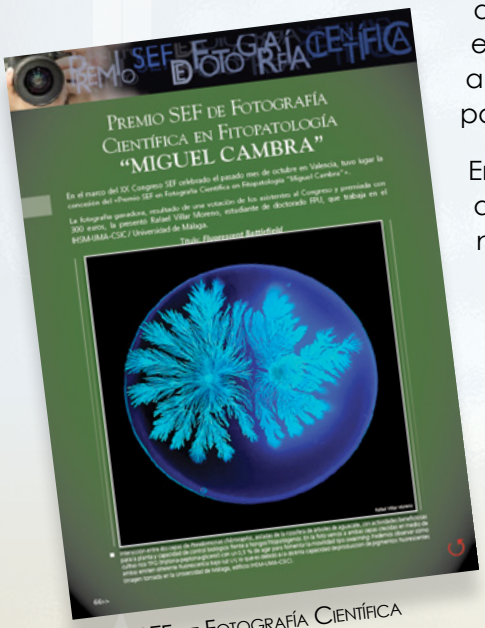
Modo de acción del fluopiram en nematodos fitoparásitos

Sección de Comentarios de Artículos Científicos

En la sección Comentarios de Artículos Científicos, Lee Robertson, Jorge Poveda e Inmaculada Ferriol, a los que agradecemos su colaboración, nos comentan tres interesantísimos artículos sobre nematodos, hongos y virus, respectivamente.

En el apartado Fue noticia en 2022, Soledad Sacristán y Nieves Capote nos repasan las principales noticias fitopatológicas del año, entre las que me gustaría destacar que la SEF ya tiene canal YouTube. Una interesante iniciativa que creemos puede ser de utilidad.

En la sección Reseñas sobre congresos y reuniones científicas podéis comprobar que este año ha sido bastante pródigo en estos acontecimientos y que es evidente que se ha tratado de recuperar el tiempo perdido durante los años pandémicos. Especial mención a nuestro XX Congreso, celebrado el pasado octubre.


PREMIO SEF DE FOTOGRAFÍA CIENTÍFICA

PREMIO SEF DE FOTOGRAFÍA CIENTÍFICA EN FITOPATOLOGÍA "MIGUEL CAMBRA"

Premio SEF de Fotografía Científica

En las Nuevas descripciones de patógenos en España, J. A. Navas-Cortés nos describe, como siempre de manera metódica y precisa, las ocurridas en nuestro país entre octubre de 2021 y septiembre de 2022.

Dado que este número coincide con año de Congreso, tenemos dos secciones que no tuvimos en el número del año pasado: el Premio SEF de fotografía científica en Fitopatología "Miguel Cambra", que recayó en Rafael Villar Moreno; y la sección de Fito-Relatos, en la que se publica el relato ganador del Premio SEF de relatos cortos en Fitopatología y que fue el presentado por David Ruano, "El libro de Abu'.

En la sección *In memoriam*, Pablo Castillo (IAS-Córdoba) nos relata la trayectoria científica y personal de uno de los principales promotores y miembros activos de la SEF, Antonio Gómez Barcina, que ostentó el cargo de vicepresidente (1986-1988) y presidente (1988-1992) de la Sociedad, así como de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología (ALF). Durante su mandato se instauró el Premio SEF-Phytoma y nos dejó siendo Socio de Honor de la SEF. Un cariñoso reconocimiento y un fuerte abrazo a sus familiares.

IN MEMORIAM

ANTONIO GÓMEZ BARCINA (1932-2022)

En recuerdo al Dr. Antonio Gómez Barcina

Dado que este es el último número de la revista en el que estoy como presidente de la SEF, permitidme aprovechar este escenario para despedirme de todos vosotros. Ha sido un verdadero honor, privilegio y placer poder representar a la Sociedad en diversos foros y eventos. Mi inmenso agradecimiento a las dos Juntas con las que he compartido estos seis años de presidencia: primero con Jaime Cubero, Francis Cazorla, Carolina Escobar, Juan A. Navas, Jesús Á. Sánchez, Inmaculada Viñas, Nieves Capote y Antonio Vicent; y, en la segunda etapa, además de Carol, Francis, Nieves y Toni, con los que se incorporaron a mitad de mandato, Aránzazu Moreno, Soledad Sacristán, Carmen Hernández y Diego Olmo. He tenido la inmensa fortuna de disfrutar de un grupo humano especial, por su competencia y compañerismo. Estoy en deuda con todos ellos. Gracias por hacer la SEF un poco mejor.

Vicente Pallás
Presidente de la SEF

Vectores de expresión derivados de virus de plantas y viroides

José Antonio Daròs Arnau
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)
CSIC-Universitat Politècnica de València

José Antonio Daròs Arnau es profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Plantas (IBMCP; centro mixto del CSIC y la Universitat Politècnica de València). Es doctor por la Universitat de València y realizó estancias posdoctorales en la Texas A&M University y la Washington State University en EE. UU. En el IBMCP, dirige el grupo de investigación Biotecnología de Virus de Plantas, cuyos principales objetivos son desarrollar estrategias biotecnológicas de protección de cultivos y desarrollar herramientas de interés biotecnológico derivadas de virus y viroides.

Introducción

Las plantas son excelentes biofactorías capaces de producir de manera eficiente y renovable alimentos, forraje, fibras, materiales de construcción, combustibles e, incluso, compuestos químicos de interés industrial, cosmético o farmacéutico utilizando la luz solar como única fuente de energía. Si la producción vegetal se maneja adecuadamente, el resultado puede considerarse sostenible, e incluso tener un efecto sumidero de dióxido de carbono contribuyendo a mitigar el cambio climático. Sin embargo, para que las plantas se consoliden como una fuente eficiente, segura y diversa de muchos de los productos que la sociedad demanda, es necesario un continuo desarrollo del campo de la biotecnología de plantas. Solo una adecuada y cuidadosa manipulación genética de las especies vegetales de interés agronómico nos permitirá transformarlas en variedades más productivas y nutritivas, más resistentes a plagas y patógenos, y mejor adaptadas a condiciones ambientales limitantes.

En la práctica, los desarrollos en biotecnología de plantas suelen pasar por la necesidad de alterar la expresión génica. En ocasiones es necesario expresar nuevos genes, pero en otras se desea inhibir o modular la expresión de genes endógenos de la planta. Esta aparentemente sencilla tarea, en el caso de las plantas, habitualmente conlleva una formidable dificultad técnica consistente en la necesidad de realizar transformaciones genéticas estables. Salvo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y algunas especies relacionadas, la transformación genética estable es un proceso muy laborioso que conlleva largos periodos de tiempo en los que se utilizan delicadas técnicas de cultivo de tejidos. Más aún, numerosas especies de interés agronómico son consideradas recalcitrantes y su transformación genética es muy difícil o prácticamente imposible. Este escenario contrasta con la aparente facilidad con la que virus y viroides son capaces de invadir sus huéspedes vegetales para replicar su genoma, moverse eficientemente por la planta y tomar el control de los sistemas de expresión génica del huésped. Por este motivo surge la pregunta: ¿podríamos utilizar virus y viroides como vectores de expresión en plantas en nuestros desarrollos biotecnológicos?

Vectores derivados de virus de plantas que expresan proteínas recombinantes

Esta pregunta no es nueva y, de hecho, los primeros éxitos en el uso de virus de plantas como vectores de expresión se retrotraen a los años 80 del siglo pasado, tan pronto como se consiguió construir los primeros clones infecciosos de algunos virus. Los primeros vectores de expresión se construyeron a partir de virus de DNA, como son el virus del mosaico de la coliflor (CaMV, de *Cauliflower mosaic virus*) o el virus del moteado dorado del tomate

Conocer la localización y el funcionamiento de los promotores subgenómicos, así como identificar los elementos del genoma que dirigen la replicación, encapsidación y movimiento de las partículas virales, ha sido fundamental en el desarrollo de estos vectores virales

(TGMV, de *Tomato golden mosaic virus*) desarrollados por los grupos de Thomas Hohn y Kenneth W. Buck, en el Friedrich Miescher-Institute de Suiza y el Imperial College of Science, Technology and Medicine del Reino Unido, respectivamente. En realidad, estos proyectos tenían más un objetivo básico de investigación en virología que un objetivo biotecnológico, puesto que se expresaban enzimas como la dihidrofolato reductasa o la neomicina fosfotransferasa como marcadores de la infección de la planta. Virus de RNA, como el del mosaico del bromo (BMV, de *Brome mosaic virus*) también se transformaron en vectores de expresión durante esos años en el laboratorio de Paul Ahlquist, de la University of Wisconsin en EE. UU. Un caso paradigmático de vector de expresión derivado de un virus de plantas es el del mosaico del tabaco (TMV, de *Tobacco mosaic virus*). Cuando infecta huéspedes como *Nicotiana benthamiana*, este virus tiene la capacidad de dirigir la producción de enormes cantidades de su proteína de cubierta (CP) en unos pocos días tras la infección. Algunos de los vectores virales más exitosos utilizados actualmente en biotecnología de plantas, como los del sistema magnICON desarrollado por el grupo de Yuri Gleba –en las compañías alemanas Icon Genetics y Nomad Bioscience–, están basados en este virus. No obstante, el desarrollo de estos vectores ha sido un proceso meticuloso y laborioso, consecuencia de los conocimientos que se han ido adquiriendo a lo largo de décadas de investigación en virología básica[1]. Conocer la localización y el funcionamiento de los promotores subgenómicos, así como identificar los elementos del genoma que dirigen la replicación, encapsidación y movimiento de las partículas virales, ha sido fundamental en el desarrollo de estos vectores. Otro ejemplo remarcable de vector viral, dentro de los virus de RNA de plantas, es el virus del mosaico del caupí (CPMV, de *Cowpea mosaic* virus), un virus bipartito con partículas de geometría esférica en lugar de varilla, que ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, en el grupo de George Lomonossoff, del John Innes Centre en Reino Unido. Otro de los virus de plantas más utilizados en biotecnología es el virus X de la patata (PVX, de *Potato virus* X), que puede ejemplificar la enorme variedad de estrategias diferentes que permiten transformar un clon infeccioso de un virus de plantas en diferentes vectores de expresión, en los que la proteína de interés se expresa fusionada a una proteína viral, como la CP, o como un producto adicional a partir de un RNA mensajero (mRNA) subgenómico adicional, para el que simplemente se duplica un promotor subgenómico o se inserta un nuevo promotor heterólogo. Igualmente, vectores derivados del PVX pueden estar constituidos por una única unidad genética o estar deconstruidos en dos o más unidades que pueden, o no, reconstituirse en las células infectadas[2].

En nuestro grupo de investigación del IBMCP (CSIC-Universitat Politècnica de València), hemos desarrollado recientemente un vector de expresión derivado de un clon infeccioso del TMV en el que las secuencias heterólogas de interés se clonan fácilmente mediante la reacción de ensamblaje Gibson, reemplazando la mayor parte de la región que codifica la CP del virus. Es de destacar que el extremo 5' de esta región codificante incluye secuencias del promotor subgenómico, y que el extremo 3' contiene parte de los motivos de tipo pseudonudo implicados en la replicación del genoma viral. Por esta razón, el gen de interés no debe reemplazar totalmente la secuencia que codifica la CP. Aun así, la introducción de una mutación en el codón ATG de inicio de la CP y el adecuado uso de un codón de parada tras la pauta abierta de lectura (ORF) del gen de interés, permiten producir la proteína recombinante libre de secuencias virales. La ausencia de la CP viral provoca, no obstante, la incapacidad del vector viral

Remarcablemente, el líquido apoplástico que contenía el péptido antifúngico AfpB mostró un notable efecto contra el hongo polífago *Botrytis cinérea* en hojas de tomate

de moverse sistémicamente por la planta de una manera eficiente. El vector conserva, sin embargo, la capacidad de movimiento célula a célula a través de los plasmodesmos, que es dependiente de la proteína de movimiento (MP) viral. El cDNA de este vector viral se encuentra clonado en un pequeño plásmido de un sistema binario capaz de replicarse en *Agrobacterium tumefaciens*, lo que permite infectar las plantas biofactoría de una manera muy sencilla mediante la técnica de agroinoculación. Utilizando este vector viral derivado del TMV, hemos producido un péptido antifúngico (AfpB) de *Penicillium digitatum* en plantas de *N. benthamiana*[3]. La producción de este péptido no resulta sencilla debido a su efecto tóxico sobre las propias células vegetales. Sin embargo, la incorporación de un péptido aminoterminal de exportación al apoplasto, permitió aminorar este efecto tóxico sobre el tejido vegetal, al tiempo que facilitó enormemente la purificación del producto recombinante. El péptido se obtuvo prácticamente puro a partir del fluido apoplástico de las hojas infectadas mediante un sencillo proceso mecánico. Los análisis también mostraron que era posible almacenar las hojas infectadas de *N. benthamiana* para extraer el péptido antifúngico AfpB en el momento más conveniente. Remarcablemente, el líquido apoplástico que contenía el AfpB mostró un notable efecto contra el hongo polífago *Botrytis cinerea* en hojas de tomate. Este hongo causa la podredumbre gris en un buen número de especies vegetales.

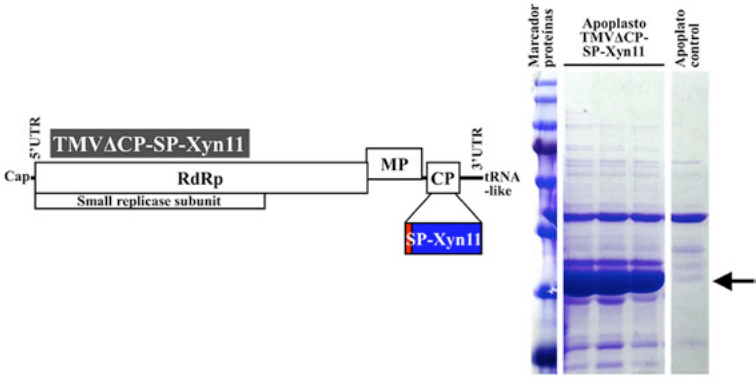


Figura 1. Producción de grandes cantidades de una xilanasa proveniente de una bacteria extremófila en hojas de *N. benthamiana* utilizando un vector derivado del TMV. *Izquierda*: esquema del vector TMVΔ–CP-SP-Xyn11 que produce la xilanasa Xyn11 con un péptido señal (SP) de localización apoplástica. *Derecha*: electroforesis de proteínas apoplásticas extraídas de tejidos de *N. benthamiana* inoculados con el vector TMVΔCP-SP-Xyn11. La flecha indica la posición de Xyn11 en el gel teñido con azul Coomassie (*Figura* elaborada por el autor).

En un nuevo ejemplo sobre la utilidad de este vector derivado del TMV en la producción de proteínas recombinantes, recientemente hemos producido una xilanasa termófila de origen bacteriano en *N. benthamiana*[4]. Esta xilanasa, que se produce en cantidades enormes en el tejido vegetal mediante el vector TMV [Figura 1], muestra excelentes propiedades catalíticas de actividad a alta temperatura y condiciones de pH extremos para su uso industrial en la degradación de xilosa y producción de xilooligosacaridos. De nuevo, la acumulación en el apoplasto facilita su purificación cuando se compara con sistemas de producción clásicos como son la fermentación de *Escherichia coli*. Además de distintos usos industriales como en la producción de papel, la xilanasa puede tener interés alimentario, puesto que los xilooligosacaridos se consideran prebióticos. En este sentido, la producción de la enzima en plantas puede considerarse una alternativa *verde*, más sostenible que los tradicionales fermentadores bacterianos.

La producción de la xilanasa en plantas puede considerarse una alternativa verde, más sostenible que los tradicionales fermentadores bacterianos

Producción de metabolitos de interés en plantas

En algunos desarrollos de biotecnología vegetal, la proteína recombinante no es el producto final deseado sino un medio para producir un metabolito de interés. Esto se puede conseguir, por ejemplo, expresando o inhibiendo la expresión de factores de transcripción y otros reguladores de la ex-

Este tomate es la primera planta comercial obtenida mediante técnicas de edición genética derivadas de los sistemas CRISPR y proteínas asociadas a CRISPR de bacterias y arqueas

Tres factores de transcripción heterólogos colectivamente estimulan la expresión de los genes que codifican las enzimas que biosintetizan las antocianinas y los transportadores que las transfieren a las vacuolas

presión génica o enzimas biosintéticas que contribuyen a la producción de determinados metabolitos. Un ejemplo muy actual en este sentido es el de los tomates ricos en ácido γ-aminobutírico (GABA) que contienen una versión mutada de un gen que codifica un dominio de unión a calmodulina. La ausencia de esta proteína conlleva una mayor actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico que produce GABA a partir de glutamato. De hecho, este tomate es la primera planta comercial –la vende la compañía de biotecnología japonesa Sanatech Seed– obtenida mediante técnicas de edición genética derivadas de los sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas) de bacterias y arqueas. Un nuevo ejemplo son los tomates morados ricos en antocianinas, compuestos flavonoides antioxidantes cuya ingestión se considera muy saludable, aprobados por la USDA para su comercialización en 2023. Estos tomates transgénicos, obtenidos en el laboratorio de Cathie Martin –John Innes Centre en Reino Unido–, expresan tres factores de transcripción heterólogos: Rosea1 y Delila, provenientes de la planta *Antirrhinum majus*; y MYB12, de *A. thaliana*. Todos ellos colectivamente estimulan la expresión de los genes que codifican las enzimas que biosintetizan las antocianinas y los transportadores que las transfieren a las vacuolas.

Los vectores virales también pueden contribuir a este tipo de desarrollos biotecnológicos. Nuestro propio trabajo mostró que la expresión de los dos factores de transcripción antes mencionados, Rosea1 y Delila, en plantas utilizando vectores derivados de potyvirus, como el virus del grabado del tabaco (TEV, de *Tobacco etch virus*) o el virus Y de la patata (PVY, de *Potato virus* Y), inducen la acumulación de grandes cantidades de antocianinas en hojas de tabaco. En estos proyectos de ingeniería metabólica suele ser relevante la necesidad de expresar más de una proteína al mismo tiempo o dirigirla específicamente a un determinado compartimento subcelular. Por ese motivo, los vectores virales deben ser capaces de admitir secuencias exógenas de tamaño substancial. Este es, de hecho, el caso de los potyvirus, una clase de virus de RNA con cápside alargada y flexuosa para los que el grupo de Jari P. T. Valkonen –Universidad de Helsinki, en Finlandia– demostró la capacidad de encapsidar un genoma artificialmente extendido en, aproximadamente, un 40 %. Con un vector potyvirus, concretamente derivado del TEV, nuestro grupo ha demostrado la expresión de una ruta metabólica completa, formada por tres enzimas biosintéticas de origen bacteriano, que inducen la biosíntesis de licopeno, un carotenoide de interés nutricional, en hojas de tabaco. Este mismo vector, pero haciendo uso de una secuencia de tránsito al cloroplasto, ha permitido la expresión de la enzima dioxigenasa, de corte de carotenoides, en plantas de *N. benthamiana*, y la consiguiente inducción de la ruta de biosíntesis de los apocarotenoides[5]. Estos metabolitos, como las crocinas y la picrocrocina, solo se acumulan en grandes cantidades de

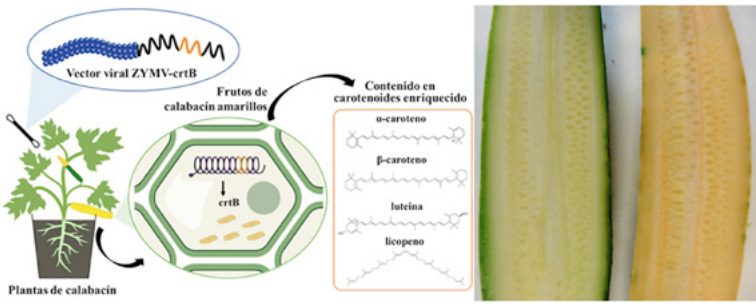


Figura 2. Acumulación de carotenoides en frutos de calabacín a través de la expresión de la enzima bacteriana fitoeno sintasa mediante un vector derivado del ZYMV. *Izquierda*: esquema de la estrategia de producción de carotenoides en frutos de calabacín utilizando el vector viral ZYMV-crtB. *Derecha*: foto de un calabacín verde recolectado de una planta control y de un calabacín amarillo, rico en carotenoides, recolectado de una planta inoculada con ZYMV-crtB (*Figura* elaborada por el autor).

Los virus de plantas, además de habituales diana de las estrategias biotecnológicas basadas en CRISPR-Cas para conseguir plantas resistentes, también se han convertido en una herramienta que puede facilitar y acelerar los proyectos de edición genética, incluso haciéndolos accesibles a plantas cuya transformación genética ha sido, por el momento, imposible

manera natural en los estigmas de las flores de azafrán y despiertan un gran interés no solo alimentario sino también farmacéutico. Este tipo de estudios nos ha permitido aumentar el contenido de carotenoides en frutos de calabacín, que, por otro lado, es un alimento pobre en este tipo de metabolitos saludable[s][6]. Mediante la inoculación de las plantas con otro vector potyvirus, esta vez derivado del virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, de *Zucchini yellow mosaic virus*), se consiguió la expresión de la enzima biosintética bacteriana fitoeno sintasa, que induce la transformación de los cloroplastos en cromoplastos con consiguiente acumulación de carotenoides [Figura 2].

Expresión de los componentes de la reacción de edición genética CRISPR-Cas en plantas mediante vectores virales

Una aplicación biotecnológica en la que los vectores derivados de virus de plantas están despertando un particular interés es la expresión de los componentes de las reacciones CRISPR-Cas de manipulación de genomas. Mientras la posibilidad de edición genética de las plantas cultivadas abre oportunidades sin precedentes en biotecnología vegetal, la principal limitación de esta tecnología, en el caso de las plantas, radica en la necesidad de expresar los componentes de la reacción, en la reacción más sencilla y habitual, una nucleasa Cas que corta el DNA genómico y un RNA guía que dirige el corte a la posición deseada, mediante transformación genética estable. Esto, como ya se ha comentado más arriba, entraña dificultades técnicas en la mayoría de especies cultivadas. El trabajo pionero del grupo de Magdy Mahfouz –King Abdullah University of Science and Technology, en Arabia Saudí– mostró que el RNA guía, el componente que cambia principalmente de una reacción de edición a otra, podía expresarse de manera muy eficiente utilizando un vector viral derivado del virus del cascabeleo del tabaco (TRV, de *Tobacco rattle virus*), consiguiéndose la edición de plantas que expresaban la nucleasa Cas9 de manera estable. Más recientemente, el grupo de Daniel F. Voytas –Universidad de Minnesota, en EE. UU.– mostró que las propiedades de los RNA guía expresados con el vector TRV podían aumentarse mediante la fusión de un dominio de RNA móvil, derivado del RNA mensajero del florígeno *Flowering locus* T (FT), de *A. thaliana*. Esta modificación dota a los RNA guía de la capacidad de alcanzar las células de la línea germinal en *N. benthamiana*, consiguiéndose de esta manera la edición genética de la progenie, evitando la necesidad de regenerar plantas editadas mediante complejas técnicas de cultivo de tejidos.

La posibilidad de lanzar los RNA guía a las células de la línea germinal mediante la expresión con un vector viral para obtener la progenie editada evitando el cultivo de tejidos, no solo se ha demostrado en especies modelo como *N. benthamiana* o *A. thaliana*. Los grupos de Yongliang Zhang y Yanpeng Wang –de la China Agricultural University y la Chinese Academy of Science– han demostrado que esto también es posible en una especie de gran interés agronómico como el trigo, utilizando un vector derivado del virus del mosaico rayado de la cebada (BSMV, de *Barley stripe mosaic virus*). Más recientemente, el grupo de Guihua Bai –Kansas State University, en EE. UU.– ha utilizado este mismo vector viral mediante una estrategia heredable con RNA guía móviles para obtener líneas de trigo editadas resistentes a fusarium, evitando de esta manera las técnicas de cultivo de tejido.

Las posibilidades que ofrecen los vectores derivados de virus de plantas en edición genética CRISPR-Cas no han dejado de aumentar con la reciente publicación por parte del grupo de Zhenghe Li –Zhejiang University, en China– de que también la nucleasa Cas9 puede expresarse a partir de

La expresión de fragmentos de RNA homólogos a genes endógenos de la planta en orientación sentido, antisentido o en forma bicatenaria, induce el silenciamiento del correspondiente gen en la planta huésped. Basada en estas observaciones, se desarrolló la técnica del silenciamiento génico inducido por virus, de amplia aplicación para estudios de genética inversa en plantas

un vector derivado de un rabdovirus, concretamente el virus del reticulado amarillo de la cerraja (SYNV, de *Sonchus yellow net virus*). En nuestro propio trabajo, hemos mostrado la posibilidad de coexpresar el RNA guía con un vector derivado del virus X de la patata (PVX, de *Potato virus X*) y la nucleasa Cas12a con un vector derivado del TEV, consiguiendo la edición de los tejidos de plantas de *N. benthamiana* silvestres que no estaban previamente transformadas con la nucleasa. En definitiva, todos estos avances han mostrado que los virus de plantas, además de habituales diana de las estrategias biotecnológicas basadas en CRISPR-Cas para conseguir plantas resistentes, también se han convertido en una herramienta que puede facilitar y acelerar los proyectos de edición genética, incluso haciéndolos accesibles a plantas cuya transformación genética ha sido, por el momento, imposible[7].

Producción de RNA recombinante utilizando vectores derivados de virus y viroides

Además de proteínas, los vectores virales también se han utilizado para producir RNA recombinantes en plantas, aunque el objetivo en estos desarrollos suele ser que estos RNA realicen su función en las propias plantas, generalmente regulando la expresión génica. En los años 90 del siglo pasado empezó a observarse que la expresión de fragmentos de RNA homólogos a genes endógenos de la planta en orientación sentido, antisentido o en forma bicatenaria, induce el silenciamiento del correspondiente gen en la planta huésped. Basada en estas observaciones, se desarrolló la técnica del silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, de *virus-induced gene silencing*), de amplia aplicación para estudios de genética inversa en plantas. Hasta la fecha se han descrito vectores derivados de muchos virus de plantas con los que se puede aplicar esta técnica –que, de nuevo, evita la transformación genética estable– a multitud de especies vegetales[8].

Como alternativa a la expresión de un fragmento más o menos grande del gen de interés, también está la posibilidad de expresar el precursor de un microRNA artificial que, de forma más precisa, se une a una secuencia específica e induce la degradación del RNA mensajero. Los microRNA artificiales reguladores de la expresión génica en plantas también se han expresado mediante vectores virales tanto de RNA como de DNA, como demostró el grupo de Yule Liu –Tsinghua University, China– utilizando un vector derivado del virus de la hoja enrollada de la col (CaLCuV, de *Cabbage leaf curl virus*), un geminivirus. Más recientemente, el grupo de Gustavo Gómez –I^{2}SysBio, CSIC-Universitat de València– ha expresado pequeños RNA artificiales en berenjena, capaces de silenciar la fitoeno desaturasa y una subunidad de la magnesio quelatasa, utilizando como vector un viroide, concretamente el viroide latente de la berenjena (ELVd, de *Eggplant latent viroid*). Hace unos años, nuestro grupo de investigación desarrolló un sistema para producir grandes cantidades de RNA recombinante, que se basó, precisamente, en el uso de este viroide (ELVd) como armazón. Sin embargo, la producción de RNA recombinante no se produce en plantas, sino en la bacteria *E. coli*. Este sistema deriva de la observación experimental de que la coexpresión de un precursor del ELVd y de la tRNA ligasa de berenjena –la enzima que circulariza este viroide en la planta huésped– en *E. coli* conlleva la acumulación de una enorme cantidad del RNA viroidal en forma circular, a pesar de que no hay replicación. El viroide simplemente se procesa a través de sus ribozimas de cabeza de martillo y es circularizado por la tRNA ligasa de berenjena que se coexpresa en el sistema. Como no hay replicación, el RNA circular del viroide se puede utilizar como armazón para expresar RNA de interés como aptámeros y otros RNA recombinantes en

El viroide simplemente se procesa a través de sus ribozimas de cabeza de martillo y es circularizado por la tRNA ligasa de berenjena que se coexpresa en el sistema

grandes cantidades[9]. En una segunda versión de este sistema, hemos introducido dos intrones autocatalíticos, el segundo en versión permutada, que nos han permitido producir grandes cantidades de RNA bicatenarios recombinantes que inducen interferencia por RNA (RNAi) en plagas y patógenos[10], y que se postulan como una alternativa prometedora, más específica y respetuosa con el medio ambiente, a los insecticidas químicos clásicos de síntesis química [Figura 3].

Conclusiones

Los virus y los viroides son patógenos de plantas que causan incontables problemas en agricultura y en los ecosistemas naturales. Sin embargo, adecuadamente manipulados, se pueden convertir en herramientas biotecnológicas para la producción de proteínas recombinantes y metabolitos en plantas biofactoría, en vectores para la expresión en plantas de los componentes de la reacción de edición genética CRISPR-Cas, o transformarse en un sistema para la producción de RNA recombinante en *E. coli* que podría contribuir de una manera más específica y sostenible a la lucha contra plagas y patógenos agrícolas.

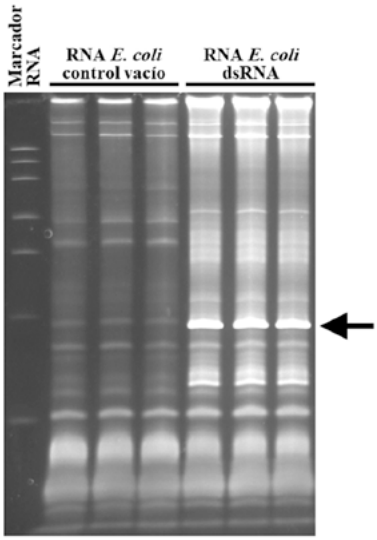


Figura 3. Producción de un RNA bicatenario recombinante circular en *E. coli* empleando un sistema que utiliza un armazón de viroide y dos intrones autocatalíticos, el segundo permutado. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante donde se muestra la acumulación del RNA bicatenario circular (*flecha*) en clones transformados con el vector adecuado en comparación con los transformados con un vector vacío (*Figura* elaborada por el autor).

REFERENCIAS

[1] Dawson, W. O. (2014). "A personal history of virus-based vector construction". En *Plant Viral Vectors*, Palmer, K, Gleba e Y (Eds.), p. 1-18. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **375**. Springer, Berlin, Heidelberg.

[2] Abrahamian, P., Hammond, R. W. y Hammond, J. (2020). "Plant virus-derived vectors: applications in agricultural and medical biotechnology". *Annu. Rev. Virol.* **7**: 513–535.

[3] Shi, X. *et al.* (2019). "Efficient production of antifungal proteins in plants using a new transient expression vector derived from tobacco mosaic virus". *Plant Biotechnol. J.* **17**: 1069-1080.

[4] Talens-Perales, D. *et al.* (2022). "Expression of an extremophilic xylanase in *Nicotiana benthamiana* and its use for the production of prebiotic xylooligosaccharides". *Sci. Rep.* **12**: 15743.

[5] Martí, M. *et al.* (2020). "Efficient production of saffron crocins and picrocrocin in *Nicotiana benthamiana* using a virus-driven system". *Metab. Eng.* **61**: 238-250.

[6] Houhou, F. *et al.* (2022). "Carotenoid fortification of zucchini fruits using a viral RNA vector". *Biotechnol. J.* **17**: e2100328.

[7] Uranga, M. y Daròs, J. (2022). "Tools and targets: The dual role of plant viruses in CRISPR–Cas genome editing". *Plant Genome*: e20220.

[8] Dommes, A. B. *et al.* (2019). "Virus-induced gene silencing: Empowering genetics in non-model organisms". *J. Exp. Bot.* **70**: 817-833.

[9] Daròs, J. A., Aragonés, V. y Cordero, T. (2018). "A viroid-derived system to produce large amounts of recombinant RNA in *Escherichia coli*". *Sci. Rep.* **8**: 1904.

[10] Ortolá, B. *et al.* (2021). "Intron-assisted, viroid-based production of insecticidal circular double-stranded RNA in *Escherichia coli*". *RNA Biol.* **18**:1846-1857.

Aplicaciones biotecnológicas de las nanopartículas del virus del mosaico del nabo

Daniel A. Truchado, Sara Rincón, Lucía Zurita y Fernando Ponz

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC)
Universidad Politécnica de Madrid (UPM)

Daniel A. Truchado es doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Actualmente trabaja en el CBGP como investigador postdoctoral Margarita Salas, en la *funcionalización* de nanopartículas virales del TuMV para el desarrollo de nuevas herramientas nanobiotecnológicas.

Sara Rincón, técnica superior de Laboratorio en Diagnóstico Clínico y Biomédico y en Análisis y Control de Calidad, actualmente trabaja en el CBGP en tareas para el soporte y la colaboración técnica y de investigación en la producción y purificación de nanopartículas virales vegetales funcionalizadas.

Lucía Zurita es técnico especializado de OPIS del INIA-CSIC en el CBGP. Actualmente realiza tareas de apoyo y colaboración técnica, así como de asistencia

Introducción

Las nanopartículas virales (VNP) comprenden un diverso grupo de nanomateriales presentes en la naturaleza, que han ido ganando terreno en el campo de la biotecnología durante los últimos años[1]. Esto se debe, principalmente, a la gran estabilidad y diversidad estructural que presentan, su gran capacidad de resistir presiones ambientales y a la facilidad con la que pueden ser modificadas para darles una función concreta. De todas la VNP existentes, destacan aquellas procedentes de virus vegetales, puesto que no tienen tropismo hacia tejidos de mamífero y, por ello, suponen una alternativa biosegura para el ser humano. Así, se está desarrollando una gran variedad de VNP de virus vegetales como herramientas biotecnológicas en campos como la nanomedicina[1,7] y otros, incluyendo la fitopatología.

Uno de los virus vegetales cuyas VNP han servido como plataforma para desarrollar diversas herramientas biotecnológicas recientemente es el virus del mosaico del nabo (TuMV). El TuMV es un conocido patógeno de plantas perteneciente a la familia *Potyviridae*. Su cápsida, alargada, flexuosa y compuesta por alrededor de 2000 copias de la proteína de la cápsida (CP), es lo que le hace atractivo desde el punto de vista biotecnológico [Figura 1]. Además, se conoce bien cómo se dispone esta CP cuando forma la cápsida viral, quedando su extremo N-terminal expuesto hacia el exterior mientras que el C-terminal queda interno a lo largo del tubo interior de la VNP. Esta disposición de la CP se mantiene en todas las VNP del TuMV, tanto en el virión (con ARN) como en las partículas tipo virus o VLP (sin material genético y, por tanto, no infectivas)[4]. Conocer todo esto facilita, en gran medida, la *funcionalización* de las VNP del TuMV mediante la adición de moléculas de interés que se expondrán en su superficie. Hasta la fecha, las herramientas biotecnológicas desarrolladas a partir de VNP del TuMV se han producido mediante dos métodos principales de funcionalización: la conjugación química y la fusión génica.

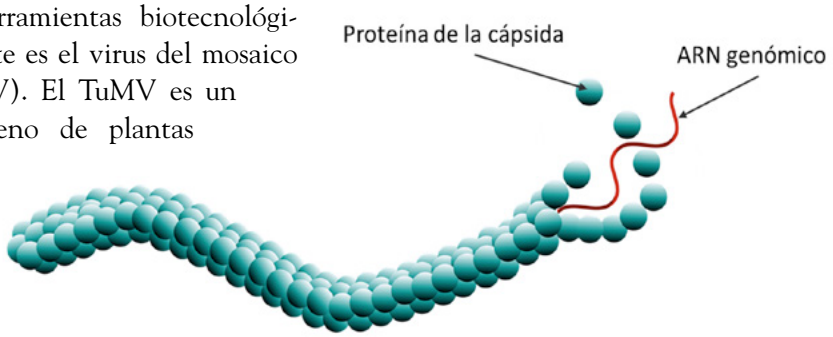


Figura 1. Esquema de la estructura general del virión del virus del mosaico del nabo (TuMV, *Turnip Mosaic Virus*; *Figura* elaborada por los autores).

en el desarrollo nanotecnológico basado en virus de plantas.

Fernando Ponz, profesor de investigación del INIA-CSIC en el CBGP, es director del Grupo de Investigación "Biotecnología de Virus Vegetales". Dr. en Bioquímica por la UCM y miembro de la SEF desde 1988.

Aplicaciones por conjugación química

Como se mencionó anteriormente, el conocimiento de la disposición de las moléculas de CP a lo largo de las VNP del TuMV permite su funcionalización mediante reacciones químicas relativamente sencillas de llevar a cabo. En concreto, la gran abundancia de lisinas en la región N-terminal, que queda expuesta al exterior de las VNP, es un objetivo atractivo para su funcionalización mediante el recubrimiento de su superficie con moléculas de interés. Esto es debido a que las lisinas presentan, generalmente, las aminas más nucleófilas de una proteína, lo que ha hecho de ellas un objetivo común a la hora de modificar proteínas. Para obtener VNP de TuMV funcionalizadas mediante la conjugación de residuos de lisina en la región N-terminal, se eligió en primer lugar el grupo éster NHS porque crea enlaces amida muy estables. A continuación, se detallan las VNP del TuMV y su función biotecnológica, que se obtuvieron mediante conjugación química.

TuMV-EGF, la ingeniería tisular

Una de las nanoherramientas desarrolladas mediante conjugación química fueron las VNP de TuMV funcionalizadas con el factor de crecimiento epitelial (EGF) como una nueva plataforma para la regeneración del tejido muscular. La ingeniería de tejidos surgió en la década de los 70 como alternativa al trasplante de órganos debido a que este último conlleva dos principales problemas: la escasez de órganos y el rechazo por el sistema inmunitario en el receptor. La ingeniería de tejidos promueve la regeneración *in vitro* de los tejidos y órganos del propio paciente empleando para ello tres componentes básicos: células, un andamiaje y factores de crecimiento. A través de ellos, se promueve la creación del ambiente propicio para el crecimiento celular que permita la regeneración del tejido. Además, esta tecnología se está aplicando en la actualidad para crear lo que se ha denominado como "carne limpia", una alternativa de la industria alimentaria a la carne, pero sin la muerte de un animal.

La ingeniería de tejidos promueve la regeneración *in vitro* de los tejidos y órganos del propio paciente empleando para ello tres componentes básicos: células, un andamiaje y factores de crecimiento

En este contexto, se desarrollaron VNP de TuMV conjugadas a EGF debido a su bioseguridad y a su facilidad para ser funcionalizadas a través de las lisinas del extremo N-terminal de sus CP. Las moléculas de EGF se conjugaron químicamente con los grupos amina de las lisinas a través de la reacción de Staudinger utilizando conectores con grupos fosfina y azida. Posteriormente, las VNP de TuMV-EGF se utilizaron como aditivo para diseñar hidrogeles de metacrilato de gelatina (GelMA) para mejorar la adhesión, la proliferación y la alineación de los fibroblastos en fibras musculares artificiales. Se observaron mayores tasas de proliferación y adhesión en los cultivos de fibroblastos sobre TuMV-EGF-GelMa en comparación con los cultivos sobre TuMV-GelMA y EGF-GelMA[3]. Los fibroblastos sobre TuMV-EGF-GelMA continuaron proliferando rápidamente después de la adhesión al gel, lo que indicó que TuMV-EGF funcionaba tanto como un nanotransportador para el EGF como una señal físico-mecánica para las células. Estos resultados demostraron que el TuMV-EGF puede utilizarse como aditivo en bioenlaces basados en GelMA para la ingeniería de tejidos, ya que crea un microambiente que promueve la adhesión y la proliferación de fibroblastos[3].

TuMV-EGCG, la antimicrobiana y antitumoral

El galato de epigalocatequina (EGCG) es un polifenol presente en gran cantidad en el té verde y con propiedades beneficiosas para el ser humano. Los polifenoles son un grupo bien conocido de metabolitos secundarios de las plantas, que se caracterizan por sus anillos fenólicos y se clasifican en un gran número de compuestos heterogéneos basados en los elementos estructura-

Los polifenoles derivados de plantas, como el EGCG, son compuestos atractivos y prometedores en el campo de la biotecnología debido a sus actividades biológicas, entre las que destaca su potencial frente a una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos y virus patógenos

les que los unen. Los polifenoles derivados de plantas, como el EGCG, son compuestos atractivos y prometedores en el campo de la biotecnología debido a sus actividades biológicas, entre las que destaca su potencial antimicrobiano y antibiopelículas frente a una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos y virus patógenos. Además, el interés por los polifenoles ha ido aumentando a lo largo de los años, impulsado por estudios epidemiológicos y metaanálisis asociados que han sugerido que estos compuestos tienen una amplia gama de características que previenen desde enfermedades cardiovasculares hasta el cáncer o la diabetes en humanos.

La clase más grande y estudiada de polifenoles como fuentes potenciales de aplicaciones farmacéuticas y médicas está representada por los flavonoides. De hecho, se piensa que los supuestos beneficios para la salud del té verde (*Camellia sinesis*) se derivan de la alta concentración de polifenoles flavonoides, incluyendo el grupo conocido como catequinas.

La actividad quimiopreventiva de las catequinas del té verde se atribuye, en parte, al número de grupos hidroxilo y a la presencia de grupos estructurales característicos de las catequinas que tienen un impacto importante en la actividad antioxidante de las mismas. El EGCG es el más abundante de todos ellos, constituyendo alrededor del 50 % del conjunto de catequinas presentes en el té verde.

Las VNP-EGCG mostraron un efecto bactericida tanto en medios sólidos como en medios líquidos, siendo este efecto mayor que el del EGCG libre

Debido al gran número de aplicaciones del EGCG, se funcionalizaron viriones de TuMV con este polifenol mediante la reacción de Mannich. Una vez obtenidas las nanopartículas funcionalizadas se procedió a evaluar, por un lado, su efecto antimicrobiano, y por otro, su potencial antitumoral. Para su acción antimicrobiana, se evaluó tanto su inhibición del crecimiento bacteriano como su capacidad de formación de biopelículas. Para la inhibición del crecimiento bacteriano, se comparó la acción de las VNP-EGCG en cultivos tanto líquidos como sólidos de *Dickeya dadantii*, *Sarcina lutea* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las VNP-EGCG mostraron un efecto bactericida tanto en medios sólidos como en medios líquidos, siendo este efecto mayor que el del EGCG libre. Los controles a los que se añadió solo TuMV libre no presentaron una disminución del crecimiento bacteriano, por lo que se demuestra que el efecto bactericida proviene del EGCG conjugado a las nanopartículas. En cuanto a la inhibición de la formación de biopelículas, las VNP-EGCG se probaron en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*. Se pudo observar cómo estas nanopartículas produjeron un efecto significativo en la formación de biopelículas. Este efecto fue dependiente de la concentración y fue claramente distinto al producido por la adición de TuMV libre y EGCG libre, los cuales no impidieron la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*[9].

Las VNP-EGCG también se probaron tanto *in vitro* como *in vivo* para analizar su potencial antitumoral y su acumulación en tumores. Los ensayos con ratones mostraron que las VNP-EGCG se dirigían a los tumores que estos presentaban. Además, utilizando las células Cal33 procedentes de carcinoma de células escamosas, se comprobó que las VNP-EGCG exhibían un efecto antitumoral que resultó ser 50 veces más potente que el efecto de EGCG libre[10].

Por tanto, la funcionalización de las VNP con EGCG ha dado lugar a una nanopartícula con potencial interés en dos campos tan diferentes como son la inhibición del crecimiento bacteriano (y la formación de biopelículas bacterianas) y un potencial tratamiento antitumoral nuevo.

TuMV-CAL-B, la nanoinmovilización enzimática

La lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) es una enzima utilizada comúnmente para

La inmovilización de enzimas a un sustrato inerte les confiere mayor resistencia a cambios de temperatura o pH, a la vez que facilita su separación de los productos para poder ser reutilizadas

En el contexto de la funcionalización de VNP, la fusión génica permite la producción de moléculas de CP que contienen una secuencia de aminoácidos recombinante de interés en una región deseada

la producción de compuestos nitrogenados en diferentes industrias como la farmacéutica o la química. Sin embargo, al igual que otras enzimas utilizadas en la producción industrial, presenta inconvenientes como su estabilidad o la susceptibilidad a cambios ambientales cuando se encuentran en su forma libre. Para evitar estos problemas, se lleva a cabo la inmovilización de enzimas, mediante la cual se fijan a un sustrato inerte que les confiere mayor resistencia a cambios de temperatura o pH, a la vez que facilita su separación de los productos para poder ser reutilizadas. No obstante, esta inmovilización puede suponer la pérdida de parte de su actividad enzimática específica. Las nanopartículas proteicas ofrecen una buena opción como sustrato para esta inmovilización, ya que comparten la misma naturaleza con las enzimas y dan una homogeneidad química deseable a los complejos que se forman. Las VNP forman parte de este tipo de nanopartículas, por lo que se utilizaron las VNP del TuMV como plataforma para inmovilizar la enzima CAL-B mediante conjugación química. Para ello, se crearon nanomallas de TuMV a las que se les unieron moléculas de CAL-B utilizando glutaraldehído como agente conjugador de dos cabezas[2]. En este estudio, se pudo demostrar por primera vez cómo las nanomallas del TuMV podían utilizarse como sustrato para inmovilizar CAL-B. Además, no solo se pudieron observar agregados de la enzima en la nanomalla, sino que su actividad específica se vio aumentada respecto a la misma cantidad de CAL-B en forma libre[2]. Por tanto, las nanomallas del TuMV suponen una buena alternativa para inmovilizar CAL-B, en especial cuando se comparan con otros sustratos donde la enzima ya se ha inmovilizado con anterioridad. Estas redes formadas por VNP, por tanto, podrían representar un sustrato interesante desde el punto de vista de la inmovilización de enzimas en la biotecnología industrial, puesto que, además de aumentar la estabilidad de CAL-B y formar complejos químicamente homogéneos, la actividad enzimática específica se vio aumentada tras la conjugación a las nanorredes.

Aplicaciones por fusión génica

La fusión génica es un método que se utiliza en biotecnología desde hace tiempo para la obtención de productos proteicos recombinantes. En el contexto de la funcionalización de VNP, la fusión génica permite la producción de moléculas de CP que contienen una secuencia de aminoácidos recombinante de interés en una región deseada. En el caso del TuMV, la mejor región para insertar esta secuencia es la N-terminal, ya que se proyecta hacia el exterior. La fusión génica, frente a la conjugación química, tiene la ventaja de asegurar una copia de la proteína de interés por molécula de CP. Sin embargo, este método parece afectar al ensamblaje de las VNP en algunas ocasiones, y las construcciones genéticas resultan ser finalmente infructuosas. No obstante, existen un par de construcciones con VNP de TuMV creadas a partir de fusión génica con potencial interés en nanomedicina.

TuMV-VEGFR-3, la inmunización peptídica y la detección de anticuerpos

La fusión génica se utilizó por primera vez con el TuMV para funcionalizar las VNP con un pequeño péptido derivado del receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR-3) para inmunización y detección de anticuerpos mediante péptidos. El uso de péptidos para la inmunización y la detección de anticuerpos tiene varias ventajas en comparación con proteínas complejas. En el caso de la inmunización, los péptidos son más sencillos y los anticuerpos producidos contra ellos son prácticamente monoclonales. Sin embargo, son poco inmunogénicos y su uso conlleva diferentes problemas técnicos. Una solución para sortear estos problemas es el uso de virus como plataformas

El uso de péptidos para la inmunización y la detección de anticuerpos tiene varias ventajas en comparación con el uso de proteínas complejas

Se calcula que, entre el 5 y el 10 % de la población infantil, y entre el 3 y el 4 % de la población adulta, sufre algún tipo de alergia alimentaria

para la presentación de péptidos y, como se ha mencionado anteriormente, el TuMV posee una estructura atractiva para ello. En el caso de la detección de anticuerpos, los péptidos ya han demostrado funcionar con anticuerpos dirigidos a un epítopo determinado en muestras de suero complejas. Sin embargo, el uso de VNP funcionalizadas con péptidos para este propósito no se había abordado hasta que se crearon las VLP TuMV-VEGFR-3[8].

La producción de VLP TuMV-VEGFR-3 comenzó con un fragmento de ADN sintético que contenía la secuencia que codificaba el primer aminoácido de la CP del TuMV, a continuación, la secuencia de VEGFR-3 y, finalmente, la secuencia del resto de la CP de TuMV. Este fragmento se clonó posteriormente en los vectores p35Tunos-vec01 y p35Tunos-vec0-Nat 1, y se inocularon con ellos plantas de las especies *Arabidopsis thaliana* y *Brassica juncea*. Las VNP funcionalizadas se purificaron mediante un protocolo que utiliza un gradiente de cloruro de cesio (CsCl).

Para evaluar el potencial de inmunización de las VNP, se inocularon tres grupos diferentes de cinco ratones BALB/c de 8 semanas de edad, con 10 µg de VNP purificadas de tipo salvaje o quiméricas o con 0,7 µg de VEGFR-3 libre (aproximadamente, la cantidad de péptido que portaban las VNP quiméricas). Los sueros analizados de los ratones inmunizados mostraron que aquellos inoculados con VNP TuMV-VEGFR-3 tenían títulos significativamente más altos de anticuerpos anti-VEGFR-3 que los inoculados con el péptido libre. Además, se demostró un aumento de las propiedades de detección de anticuerpos de las VNP, ya que diluciones más altas de sueros resultaron positivas en los ensayos ELISA cuando las placas estaban tapizadas con VNP TuMV-VEGFR-3 que cuando lo estaban con el péptido libre. Ambos resultados demuestran el potencial de estas VNP quiméricas en el campo de la inmunología, siendo el primer caso reportado con VNP de virus vegetales hasta entonces[8].

TuMV-Pru p 3, las alergias alimentarias

Se funcionalizaron VNP de TuMV con el alérgeno del melocotón Pru p 3 para crear una nanopartícula cubierta de alérgeno que pudiera emplearse posteriormente para inmunoterapia frente a las alergias alimentarias. Este tipo de alergia afecta cada año a más personas, especialmente en países desarrollados, donde se calcula que entre el 5 y el 10 % de la población infantil, y entre el 3 y el 4 % de la población adulta, sufre algún tipo de alergia alimentaria. Las moléculas desencadenantes de esta respuesta inmune son denominadas *alérgenos*, y son a menudo lipoproteínas. La lipoproteína Pru p 3 es un modelo bien estudiado de este tipo de alérgenos, el cual supone uno de los más relevantes en la región mediterránea.

Es por ello por lo que se desarrollaron VNP de TuMV funcionalizadas con este alérgeno completo para conseguir una herramienta que pueda ser utilizada para inmunoterapia frente a las alergias alimentarias. Para ello, se creó un gen sintético que llevase fusionadas las secuencias de la CP del TuMV junto a la de Pru p 3, ambas separadas mediante un conector flexible. Mediante expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana* que fueron agroinfiltradas con *Agrobacterium tumefaciens*, se obtuvieron VLP de TuMV conjugadas con el alérgeno completo[5]. Posteriormente, las VLP se purificaron y probaron tanto en cultivos celulares como en ratones. Estas VLP TuMV-Pru p 3 no resultaron ser tóxicas ni *in vitro* ni *in vivo* y se transportaban por las células intestinales Caco-2 sin afectar a la integridad epitelial, lo que demuestra la posibilidad de ser administradas por vía oral para la inmunoterapia. La administración de VLP de TuMV-Pru p 3 en ratones previamente sensibilizados redujo significativamente los niveles de sIgG2a en ellos

La administración de VLP de TuMV-Pru p 3 en ratones previamente sensibilizados redujo significativamente los niveles de sIgG2a en ellos a casi la mitad

a casi la mitad y, además, se observó una tendencia a la baja en los niveles de sIgE, aunque no significativa[5]. Estos resultados apoyan el uso de las VLP funcionalizadas de TuMV en la inmunoterapia específica de alérgenos, así como en otras patologías de base inmunológica.

Perspectivas futuras

Como se ha descrito, se han desarrollado diversas nanoherramientas basadas en VNP del TuMV mediante dos técnicas principales de funcionalización: la conjugación química y la ingeniería genética. Sin embargo, se ha conseguido implementar en ellas recientemente un tercer método de funcionalización: la tecnología SpyTag/SpyCatcher, que combina una primera fusión génica con una conjugación química posterior. Esta tecnología se basa en el enlace isopeptídico intramolecular que se produce en el dominio CnaB2 de la proteína de unión a fibronectina (FbaB) de *Streptococcus pyogenes*[6]. Este enlace isopéptido espontáneo ocurre entre la amina de la Lys_{31} y el grupo carboxilo del Asp_{117} de forma irreversible y resistente a un amplio abanico de condiciones de pH, temperatura y tampones. Teniendo esto en cuenta, se desarrolló una tecnología novedosa para el acoplamiento de proteínas dividiendo el dominio CnaB2 en dos péptidos que, posteriormente, se reconstituyen a través de este enlace isopéptido espontáneo: SpyTag, una pequeña secuencia de 13 aminoácidos que incluye el Asp_{117}, y SpyCatcher, con el resto de la proteína. Al fusionar genéticamente SpyTag y SpyCatcher con el N-terminal o el C-terminal de dos proteínas de interés, estas últimas se unirán entre sí de forma estable y con un alto rendimiento.

Se abre la puerta a una nueva forma de funcionalizar las VLP del TuMV con secuencias proteicas de interés de forma irreversible y a un alto rendimiento

La tecnología SpyTag/SpyCatcher se probó en las VNP del TuMV utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) como proteína de interés fácilmente rastreable para funcionalizar las moléculas de CP. Para su producción, se utilizó la agricultura molecular mediante agroinfiltración en plantas de *Nicotiana benthamiana*. En este experimento se pudo observar cómo las VLP de TuMV quedaban funcionalizadas con GFP a través de SpyTag/SpyCatcher. Y no solo eso, sino que la unión entre SpyTag y SpyCatcher tuvo lugar *in vivo* dentro de las células de las plantas agroinfiltradas. Con estos resultados, se abre la puerta a una nueva forma de funcionalizar las VLP del TuMV con secuencias proteicas de interés de forma irreversible y a un alto rendimiento, por lo que las posibilidades de desarrollar nuevas nanoherramientas a partir de ellas en el futuro próximo se ven incrementadas.

En resumen, el TuMV es una excelente plataforma para la creación de nuevas herramientas en biotecnología a través de la agricultura molecular en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Las VNP del TuMV ofrecen una estructura interesante para su funcionalización y, una vez derivadas por conjugación química o ingeniería genética, se han aplicado con éxito en múltiples campos de la nanociencia y la nanotecnología [Figura 2]. Además, una nueva

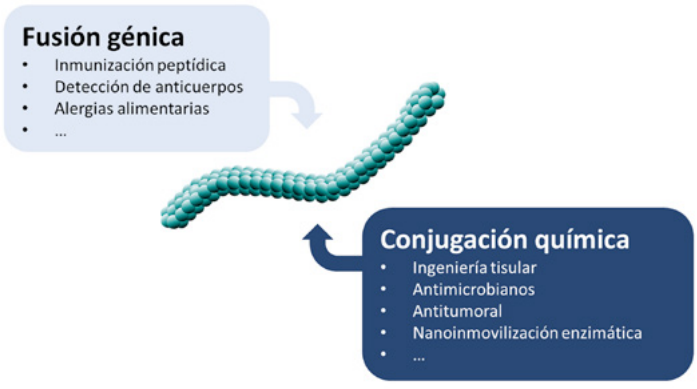


Figura 2. Esquema de las principales aplicaciones biotecnológicas de las distintas nanoherramientas desarrolladas mediante la funcionalización de nanopartículas virales del TuMV (*Figura* elaborada por los autores).

técnica de acoplamiento de proteínas llamada SpyTag/SpyCatcher ofrece un método prometedor para una funcionalización más robusta y eficiente de estas VNP. Esto muestra no sólo que las nanoplataformas derivadas del TuMV son muy versátiles, sino que también hay un enorme potencial para desarrollar nuevas nanoherramientas con ellas en los próximos años en campos como el desarrollo de vacunas o nuevos tratamientos antitumorales. Su aplicación en el campo de la fitopatología ha comenzado con algo de retraso, pero las primeras experiencias probadas están resultando de lo más prometedor, como se ha comprobado en el caso de *Dickeya dadantii*, por ejemplo. Otras plagas y patógenos están ya siendo probados.

Hay un enorme potencial para desarrollar, con las nanoplataformas derivadas del TuMV, nuevas nanoherramientas en nuevos campos como el desarrollo de vacunas o nuevos tratamientos antitumorales

REFERENCIAS

[1] Chung, Y. H., Cai, H. y Steinmetz N. F. (2020). "Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **156**: 214-235.

[2] Cuenca, S. *et al.* (2016). "Nanonets derived from turnip mosaic virus as scaffolds for increased enzymatic activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B". *Front. Plant Sci.* **7**: 464.

[3] González-Gamboa, I. *et al.* (2022). "Gelatin-methacryloyl hydrogels containing turnip mosaic virus for fabrication of nanostructured materials for tissue engineering". *Front Bioeng. Biotechnol.* **10**: 907601.

[4] Nellist, C. F. *et al.* (2022). "Turnip mosaic virus, a virus for all seasons". *Ann. Appl. Biol.* **180**: 312-327.

[5] Pazos-Castro, D. *et al.* (2022). "Suitability of potyviral recombinant virus-like particles bearing a complete food allergen for immunotherapy vaccines". *Front. Immunol.* **13**: 986823.

[6] Reddington, S. C. y Howarth, M. (2015). "Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **29**: 94-99.

[7] Rybicki, E. P. (2020). "Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents". *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **12**: e1587.

[8] Sánchez, F. *et al.* (2013). "Plant viral elongated nanoparticles modified for log-increases of foreign peptide immunogenicity and specific antibody detection". *J. Biotechnol.* **168**: 409-415.

[9] Velázquez-Lam, E., Imperial J. y Ponz F. (2020). "Polyphenol-functionalized plant viral-derived nanoparticles exhibit strong antimicrobial and antibiofilm formation activities". *ACS Appl. Bio Mater.* **3**: 2040-2047.

[10] Velázquez-Lam, E. *et al.* (2022). "Antitumor applications of polyphenol-conjugated turnip mosaic virus-derived nanoparticles". *Nanomedicine (Lond.)* [25 de agosto de 2022] .

Uso de elementos derivados de virus de plantas en aplicaciones biotecnológicas

Adrià Bugeda Cots y Juan José López-Moya

Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), CSIC-IRTA-UAB-UB
Campus UAB Bellaterra
Cerdanyola del Vallès, Barcelona

Sumario

Las aplicaciones biotecnológicas que tienen su origen en el conocimiento de virus y de otros patógenos relacionados, como los viroides, son muy numerosas y destacadas. En el caso de plantas, y a pesar de ser una disciplina científica relativamente reciente, la virología ha aportado un buen número de elementos cuyas funcionalidades resultan muy valiosas en biotecnología. En este artículo se revisan ejemplos relevantes en las diferentes categorías consideradas, y se mencionan las prometedoras perspectivas de futuro de nuevos desarrollos con potencial aplicación práctica.

Introducción

Los virus, viroides y otros elementos subvirales como los satélites, constituyen una categoría amplia de agentes con capacidad infecciosa que pueden afectar a prácticamente todos los seres vivos, incluyendo las plantas. Por razones históricas, la mayor parte de los virus y viroides de plantas que se conocen tienen carácter patogénico, siendo agentes causales de enfermedades que pueden afectar a los cultivos. Sin embargo, gracias a los recientes avances en metagenómica, ahora sabemos que su presencia es mucho mayor de lo considerado inicialmente, y que en muchas ocasiones juegan un papel neutro o incluso beneficioso como componentes esenciales de los ecosistemas.

En este artículo nos centraremos en un aspecto que también hace referencia a características positivas de los virus: servir de fuente de componentes útiles para aplicaciones biotecnológicas a partir de elementos de sus genomas.

En concreto, comentaremos sobre elementos genéticos reguladores, y sobre ácidos nucleicos y proteínas virales con capacidades enzimáticas que aportan funciones de interés biotecnológico. Por razones de espacio y para evitar solapamientos con otros artículos, no se incluirán los vectores virales de expresión, la producción de partículas virales ni los sistemas de inducción de silenciamiento génico en plantas basados en virus.

Elementos genéticos derivados de virus

Promotores de transcripción

Por su naturaleza de parásitos moleculares, los virus, viroides y agentes subvirales incluyen en sus genomas elementos genéticos, como promotores y terminadores, que resultan esenciales para usurpar funciones celulares del huésped de forma muy eficiente[3]. De hecho, la capacidad de estos elementos se espera que sea superior a la de sus homólogos celulares para poder com-

Adrià Bugeda es biólogo (UAB) y realiza su tesis doctoral en el CRAG, iniciada bajo la dirección de la recientemente fallecida Dra. María Coca. Su trabajo aborda múltiples aspectos del control de enfermedades de plantas, incluyendo la expresión biotecnológica de péptidos antimicrobianos usando vectores virales en el marco de colaboraciones con P. Manzanares y J. F. Marcos (IATA, CSIC), y J. A. Darós (IBMCP, CSIC).

Juan José López-Moya es ingeniero agrónomo (UPM) y trabaja en el CRAG en aspectos relacionados con enfermedades virales de plantas. Su equipo busca entender procesos de patogénesis y transmisión por insectos vectores, sus interacciones en infecciones múltiples, y la caracterización de funciones virales, así como explorar posibles usos biotecnológicos del conocimiento generado.

Los virus, viroides y agentes subvirales incluyen en sus genomas elementos genéticos, como promotores y terminadores, que resultan esenciales para usurpar funciones celulares del huésped de forma muy eficiente

petir eficazmente con ellos en el estilo de vida parasítico de los virus.

En general, y debido al pequeño tamaño de los genomas virales, los elementos genéticos son también pequeños, lo que los hace especialmente interesante en biología sintética. Muchas construcciones destinadas a ser usadas en células de organismos muy distintos utilizan promotores virales, como los derivados de citomegalovirus en sistemas celulares de mamíferos. Las plantas no son una excepción, siendo muy común el uso de promotores como el conocido 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV)[1].

La elección de los promotores usados en transgenia vegetal es una parte fundamental del diseño en función del objetivo perseguido. Existen numerosos promotores de origen vegetal caracterizados en la literatura con especificidad de tejido, o con expresión inducible, pero los promotores constitutivos de origen viral siguen teniendo amplio uso ya que permiten eludir en gran medida la regulación del huésped, resultando una alternativa para los propios promotores constitutivos de plantas.

La elección de los promotores usados en transgenia vegetal es una parte fundamental del diseño en función del objetivo perseguido

Una primera consideración es que la gama de especies huésped de cada virus puede condicionar los promotores virales disponibles, que, en general, serán más eficientes en las plantas que pueden infectar. En efecto, existen elementos más adaptados a dicotiledóneas, como el promotor del componente subgenómico que codifica la proteína de cubierta del tobamovirus del mosaico del tomate (ToMV), o a monocotiledóneas, como el componente derivado del badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (SCBV). No obstante, también se conocen promotores capaces de funcionar en muchas especies. En especial, el promotor 35S que hemos mencionado, en diferentes formatos (mínimo, o reforzado mediante duplicaciones), se estima que se ha empleado en más del 60 % de todas las plantas transgénicas de numerosas especies. Se trata de un potente promotor constitutivo capaz de expresar altos niveles del gen al que precede en todos los tejidos de la planta. Actualmente, hay una gran disponibilidad de plásmidos adecuados para la transformación de plantas que emplean este promotor. Entre las características que explican su éxito, destaca el reducido tamaño necesario para su correcta funcionalidad y la mencionada versatilidad de especies en las que es capaz de inducir elevados niveles de expresión de transgenes. La investigación básica sobre este promotor resultó clave para determinar su utilización, empezando con la determinación del tamaño necesario: a partir de una región del virus inicialmente grande, se comprobó que las construcciones con una secuencia mucho más reducida conservaban plena funcionalidad, y se describió la parte más pequeña necesaria para expresar transgenes, a la que se denominó *promotor mínimo*; resulta interesante que sea posible multiplicar la expresión del transgén correspondiente simplemente añadiendo copias del promotor en tándem como en los denominados *promotores duplicados*. Adicionalmente, es posible controlar la expresión incorporando secuencias reguladoras *aguas arriba* del promotor. Por ejemplo, es posible añadir un elemento que necesite de la interacción con un factor de transcripción para su expresión. Si, además, esta interacción requiere una pequeña molécula o ligando, se obtiene un sistema inducible dependiente de la adición del ligando de manera artificial en el momento deseado, dando como resultado una expresión del transgén controlada espaciotemporalmente.

La potencia y versatilidad del promotor CaMV 35S explica su utilización tan frecuente, aunque ya existen tecnologías que lo superan, y hay estudios basados en el uso de promotores quiméricos que combinan las secuencias activadoras de varios virus y que permiten mantener la expresión en una planta en situaciones adversas.

Otros elementos genéticos de utilidad son los potenciadores de la traducción, entre los que se pueden citar el elemento Omega del TMV y los inductores de traducción alternativos como los 3'-CITES o los IRES

Numerosos virus emplean mecanismos de iniciación no clásica de la traducción que les permiten secuestrar eficientemente la maquinaria celular

Potenciadores de la traducción

Otros elementos genéticos de utilidad son los potenciadores de la traducción, entre los que se pueden citar el elemento Omega del tobamovirus del mosaico del tabaco (TMV), y los inductores de traducción alternativos, como los 3'- potenciadores de traducción independientes de estructuras *cap* 3'-CITE, o los sitios de entrada internos de ribosomas (IRES)[4].

El inicio de la traducción en eucariotas es un proceso complejo que requiere de la interacción del RNA mensajero (mRNA) con las dos subunidades ribosomales mediada por numerosos factores de traducción. Este proceso es dependiente de la presencia de un nucleótido modificado en el extremo 5' de los mRNA, que constituye una estructura característica denominada *cap*, y de la cola de poli-adenina, poli(A), en el extremo 3'. En el caso de los organismos eucariotas, el factor de iniciación denominado 4 (eIF4) se encarga de la selección de secuencias con 5' *cap*, formando parte de un complejo mayor que facilita la migración del ribosoma de 5' a 3' hacia el codón de iniciación AUG. Entre las estrategias que utilizan los virus para secuestrar la maquinaria de traducción celular, se encuentra la de imitar la estructura de un mRNA, o bien sustituir el 5' *cap* y la cola poli(A) por otras estructuras que compiten eficientemente por la actividad de la maquinaria celular. También modulan el proceso la longitud y secuencia de las regiones líderes, presentando frecuentemente estructuras secundarias, y el contexto en el que se encuentra el codón de iniciación. Uno de los ejemplos más estudiados es la secuencia Omega del TMV, situada en la región 5' no traducida y que interacciona con la región 3', facilitando el reclutamiento de factores de iniciación como eIF3 e incrementando así la traducción. De manera similar, se han estudiado secuencias no traducidas del extremo 5' de algunos potyvirus (PSbMV, TEV) y alfamovirus (AMV). Estas secuencias tienen la capacidad de incrementar la traducción tanto en plantas transgénicas como en vectores virales heterólogos.

Numerosos virus emplean mecanismos de iniciación no clásica de la traducción que les permiten secuestrar eficientemente la maquinaria celular, incluyendo sistemas independientes de los componentes celulares, o con elementos que actúan en *cis* y otros mecanismos alternativos. Entre ellos destacan los iniciadores conocidos como 3'-CITE, independientes de *cap* y que responden a determinados factores, pudiendo superar el bloqueo que sucede en situaciones de estrés[10]. Considerando que las transformaciones estables o transitorias pueden generar un estrés considerable en la planta, el interés biotecnológico por estos inductores de la traducción es muy alto, ya que permitiría superar algunas limitaciones propias de los sistemas vegetales. Además, aparentemente estos elementos 3'-CITE pueden ser intercambiables manteniendo su funcionalidad, ya que dependen en gran medida de su estructura secundaria y terciaria que les sirve para interaccionar con sus dianas moleculares, siendo elementos de RNA funcionalmente independientes del resto de la secuencia y que pueden llegar a ser muy pequeños (en torno a 60 nucleótidos). Se han descrito 3'-CITE muy eficientes en monocotiledóneas, por lo que se están desarrollando sistemas de producción de proteínas con alto rendimiento basados en extractos de germen de trigo utilizando el elemento 3'-CITE del luteovirus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV), lo que da lugar a una producción de proteínas superior a otros sistemas. En cambio, parece que los elementos de regiones 5' de virus con *cap* son más eficaces en plantas dicotiledóneas. Si se encontraran y describieran nuevas secuencias potenciadoras en más especies de virus de plantas, sería en principio posible utilizar y combinar varias estrategias mejor adaptadas a cada huésped.

Existen otros sistemas de inicio de traducción mediante sitios de entrada interna de ribosomas (IRES), elementos con estructuras complejas que pueden ser activas para traducción en contextos diferentes a la región 5' de los genomas virales

Dentro de los elementos genéticos con usos biotecnológicos hay que destacar las ribozimas derivadas de viroides

Otras estrategias alternativas distintas a las mencionadas no precisan *cap* ni poli(A), como es el caso de virus satélites dependientes de otros virus, como, por ejemplo, el virus satélite de la necrosis del tabaco (STNV), donde se ha identificado una región anterior al codón de parada de la única proteína que codifica, que es capaz de actuar como sustituto del *cap* y presenta actividad promotora.

Existen otros sistemas de inicio de traducción mediante sitios de entrada interna de ribosomas (IRES), elementos con estructuras complejas que pueden ser activas para traducción en contextos diferentes a la región 5' de los genomas virales. Se han estudiado mucho en virus de mamífero, pero resulta controvertida la posible presencia y funcionalidad de IRES en virus de plantas, ya que ni el menor tamaño ni la estructura de las regiones 5' permite definirlos de manera precisa, por lo que los posibles candidatos aún no se han caracterizado suficientemente para su uso biotecnológico.

Secuencias nucleotídicas con capacidad catalítica

Ribozimas

Dentro de los elementos genéticos con usos biotecnológicos hay que destacar las ribozimas derivadas de viroides[5]. La capacidad patogénica de estas pequeñas entidades de RNA circular resultaba asombrosa por la ausencia de regiones codificantes para ninguna proteína, siendo todo un reto científico su caracterización. El descubrimiento de las ribozimas autocatalíticas, imprescindibles para su replicación por círculo rodante, significó todo un hito que trasciende la fitopatología para acercarnos a entender incluso fases muy tempranas de la evolución de la vida en las que el RNA podría tener un papel esencial. La conexión funcional y estructural con el agente causal de la hepatitis delta en humanos sirve de recordatorio de la utilidad inesperada que la ciencia básica en plantas puede aportar a los avances clínicos y biotecnológicos.

En el tema que nos ocupa, el conocimiento sobre ribozimas ha permitido su inclusión en construcciones genéticas donde resulta necesario generar extremos concretos en el RNA transcrito, con lo que hoy en día forman parte de las herramientas propias de biología sintética. Las peculiaridades de su conformación, con formatos específicos como los denominados de *cabeza de martillo*, se han ido caracterizando hasta determinar los requerimientos de tamaño y conservación de estructura necesarios para realizar su función.

Proteínas virales con actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas que codifican los genomas virales son bastante limitadas, pero, en general, tienen que ser altamente específicas, lo que las convierte de nuevo en una alternativa valiosa para adaptarlas a un uso biotecnológico.

Proteasas

Dentro de la amplia categoría de proteínas virales funcionales de origen viral destacan las proteasas, enzimas con capacidad catalítica de procesar enlaces peptídicos entre aminoácidos. Las proteasas son proteínas esenciales en el repertorio enzimático de los seres vivos. En el campo de la biotecnología, las proteasas de origen viral poseen varios aspectos que las hacen atractivas: pequeño tamaño, baja similaridad con proteínas del huésped y extraordinaria especificidad de corte[7]. En ocasiones también son responsables de la localización y momento de aparición de proteínas virales maduras, controlando la acumulación de productos intermedios. En muchos casos, la actividad proteasa es necesaria para activar otras funciones en la misma o en otras proteínas, sirviendo para su regulación[8].

En los virus vegetales se encuentran numerosas proteasas que desempeñan funciones en casi todos los procesos virales. Un ejemplo característico lo constituyen los potyvirus, cuyo genoma se expresa en una

Existen numerosas proteasas NIa con variaciones en los sitios de reconocimiento, lo que permite una gran versatilidad de diseños funcionales. La proteasa NIa más estudiada y utilizada en ingeniería genética es la del virus del grabado del tabaco (TEV)

Es especialmente frecuente la dedicación de proteínas virales a funciones específicas de protección del genoma viral frente a la inactivación del RNA

poliproteína que se procesa autoproteolíticamente por tres proteasas específicas que, además, son multifuncionales. En primer lugar, se encuentran las proteasas líderes de tipo P1, que se autocortan en *cis* y, además, se ha comprobado que su presencia regula la patogenicidad del virus, limitando efectos negativos de la infección. A continuación, se localiza la proteasa HCPro, que tiene además una potente actividad como supresor de silenciamiento génico, aparte de intervenir en procesos como la transmisión vectorial o la estabilidad de viriones. En último lugar, los potyvirus también poseen proteasas de gran importancia en biotecnología, las denominadas inclusión nuclear tipo a (NIa), que actúan tanto en *cis* como en *trans*. Estas proteasas muestran, además, una especificidad muy rigurosa en sus dianas de corte (un heptapéptido con corte específico en el penúltimo enlace peptídico), lo que aumenta su valor como herramienta biotecnológica: se han utilizado, entre otros ejemplos, en procesos de eliminación de señales de purificación por afinidad, en proteínas recombinantes o hasta en complejos proteicos, permitiendo la expresión simultánea de múltiples proteínas y su liberación controlada. Existen numerosas proteasas NIa con variaciones en los sitios de reconocimiento, lo que permite una gran versatilidad de diseños funcionales. La proteasa NIa más estudiada y utilizada en ingeniería genética es la del virus del grabado del tabaco (TEV). Su uso comercial ha sido posible mediante modificaciones que aumentaron su solubilidad y estabilidad sin comprometer la actividad proteasa. Se trata de una proteasa resistente a muchos inhibidores, que tolera relativamente bien la presencia de agentes desnaturalizantes, y que puede eliminar componentes de membrana sin usar detergentes. El conocimiento de su estructura tridimensional ha permitido manipular su especificidad para admitir numerosos aminoácidos en la posición posterior al corte proteolítico.

Supresores del silenciamiento génico

En la totalidad de los virus de plantas analizados hasta el momento, se han encontrado sistemas de evasión de las defensas del huésped que utilizan supresores del silenciamiento génico[2]. Desde su descubrimiento, el silenciamiento de RNA se ha asociado a mecanismos de defensa frente a virus y transposones, por lo que es entendible que los virus hayan evolucionado para disponer de supresores, en un ejemplo clásico de carrera de armamentos. Las estrategias de evasión viral son muy variadas, desde la replicación en el interior de estructuras subcelulares o compartimientos, a un movimiento célula a célula suficientemente rápido como para anticipar la señalización de las vías de silenciamiento. Es especialmente frecuente la dedicación de proteínas virales a funciones específicas de protección del genoma viral frente a la inactivación del RNA. Estos supresores de silenciamiento existen tanto en virus de RNA (donde el genoma es una diana directa del silenciamiento postranscripcional) como en virus de DNA (que precisan de protección en sus transcritos y evitan modificaciones como metilaciones excesivas de sus genomas). Las proteínas que actúan como supresoras del silenciamiento de RNA (VSR) son a menudo multifuncionales, y se hipotetiza que posiblemente adquirieron la actividad supresora posteriormente a sus otras funciones conocidas. En otros casos, las proteínas VSR provienen de duplicaciones o modificaciones de otras proteínas con especialización posterior.

Del mismo modo que poseen orígenes distintos, también actúan a muchos niveles diferentes en la planta e interaccionan con moléculas de distinta naturaleza para ejercer su función[6]. Por ejemplo, dificultando el ensamblaje de complejos proteicos de la planta, mediante el secuestro de sus componentes, el bloqueo de los sitios activos, la generación de cofactores anta-

gonistas o la imitación de moléculas reguladoras que intervienen en la homeostasis de moléculas defensivas. Gracias a esta gran diversidad, escoger supresores del silenciamiento de RNA para desempeñar según qué tareas es otro punto a favor de su uso en biotecnología.

Las proteínas VSR se usan rutinariamente en expresión transitoria y en organismos transgénicos para permitir y mejorar la expresión de los genes o transgenes deseados. Se siguen múltiples estrategias: la más simple es la cotransformación de las construcciones para los genes de interés junto con otra construcción que contenga un VSR, usando por ejemplo la proteína p19 del tombusvirus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) o una proteína HCPro de potyvirus. También se puede incorporar directamente el VSR junto con la proteína de interés en la misma construcción. En los vectores virales se suelen conservar las proteínas que actúan de VSR en la secuencia final del vector, aunque en ocasiones se prefieren vectores deconstruidos que incorporan VSR heterólogos.

Las proteínas VSR se usan rutinariamente en expresión transitoria y en organismos transgénicos para permitir y mejorar la expresión de los genes o transgenes deseados

Otras proteínas virales funcionales

Además de las actividades que hemos mencionado, existen otras actividades enzimáticas derivadas de virus que pueden ser empleadas en biotecnología. Enzimas modificadoras de ácidos nucleicos como las nucleasas, helicasas, transcriptasas reversas y polimerasas pueden proceder de virus, y en ocasiones se dispone de eficientes sistemas ya comercializados que tienen una amplia utilización. Por ejemplo, la actividad polimerasa del fago Phi29 se utiliza de manera rutinaria en procesos de amplificación de ácidos nucleicos para secuenciación masiva. También, las transcriptasas reversas comerciales, que permiten sintetizar DNA a partir de RNA como un paso esencial para amplificar por RT-PCR, tienen su origen en enzimas derivadas de virus animales. Existe, por lo tanto, la posibilidad de emplear enzimas derivadas de virus de plantas con estas y otras funciones. Una vez más, el único límite es la imaginación de los biotecnólogos.

Conclusiones y perspectivas futuras

Los virus y agentes subvirales en su conjunto constituyen una caja de herramientas biotecnológicas que, como hemos visto, aportan funcionalidades de gran interés y aplicabilidad. Además de los casos mencionados de promotores, potenciadores de expresión, ribozimas, proteasas y polimerasas, hay muchos otros elementos que están pendientes de ser caracterizados para llegar (eventualmente) a más posibles explotaciones prácticas. Nuestro conocimiento actual continúa incrementándose, y aparte de la frecuente descripción de nuevos virus, incluso en los géneros mejor estudiados, se siguen descubriendo novedades, como los mecanismos de deslizamiento de la polimerasa en potyvirus para la expresión de regiones solapantes (PIPO y PISPO) en fases de lectura diferentes de la poliproteína viral[9]. Junto a los cambios de fase de lectura durante la traducción, estos sistemas resultan frecuentes en los compactos genomas virales, ya que permiten incrementar la capacidad de codificar genes diferentes sin aumentar el tamaño, una peculiaridad deseable que nuevamente podría aplicarse a fines biotecnológicos.

La ciencia básica ha precedido a todos los avances que hemos descrito, y podemos acabar resaltando su importancia para los futuros desarrollos tecnológicos en biotecnología. El estudio de los virus, viroides y agentes subvirales ha sido, y es, actualmente, un campo fértil para los progresos biotecnológicos, y podemos tener la certeza de que lo seguirá siendo en el futuro.

El estudio de los virus, viroides y agentes subvirales ha sido, y es, actualmente, un campo fértil para los progresos biotecnológicos

Categoría	Elemento	Procedencia	Usos y características
Promotor	35S	CaMV caulimovirus	Expresión constitutiva de construcciones en numerosas especies y tejidos, tanto estable como transitoria
Potenciador de traducción en 5'	Omega	TMV tobamovirus	Región líder en 5' que facilita la traducción proteica, facilitando interacciones con la maquinaria celular en sistemas de expresión
Potenciador de traducción en 3'	3'-CITE	BYDV luteovirus y otros virus	Región en 3' con actividad independiente de *cap* que favorece la traducción de construcciones génicas
RNA autocatalítico	Ribozimas	Numerosos viroides	Actividad nucleasa específica a partir de la propia secuencia del transcrito, permite generar moléculas de RNA con extremos determinados
Proteasa	NIa-Pro	TEV potyvirus	Proteasa de tipo NIa-Pro característica de potyvirus, específica de corte en un heptapéptido conocido. Existen variantes comerciales optimizadas
Supresor de silenciamiento	P19 (tombusvirus) HCPro (potyvirus)	Numerosos virus	Productos multifuncionales con actividad supresora del silenciamiento de RNA. Se coinfiltran frecuentemente en sistemas de expresión transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Selección de algunos ejemplos de elementos derivados de virus y viroides de plantas con usos biotecnológicos (*Figura* elaborada por los autores).

REFERENCIAS

[1] Amack, S. C. y Antunes, M. S. (2020). "CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology". *Current Plant Biology* **24**: 100179.

[2] Csorba, T., Kontra, L. y Burgyán, J. (2015). "Viral silencing supressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence". *Virology* **479-480**: 85-103.

[3] Diamos, A. G., Rosenthal, S. H. y Mason, H. S. (2016). "5' and 3' untranslated regions strongly enhance performance of geminiviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves". *Frontiers in Plant Science*. **7**: 200.

[4] Fan, Q., Treder, K. y Miller, W. A. (2012). "Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency". *BMC Biotechnology* **12**: 22.

[5] Flores, R. *et al* (2005). "Viroids and viroid-host interactions". *Annual Review of Phytopathology* **43**: 117-139.

[6] Jin, Y., Zhao, J. H. y Guo, H. S. (2021). "Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi". *Current Opinion in Virology* **46**: 65-72.

[7] Mann, K. S. y Sanfaçon, H. (2019). "Expanding repertoire of plant positive-strand RNA virus proteases". *Viruses* **11**: 66.

[8] Rodamilans, B. *et al.* (2015). "RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the potyviridae family". *Journal of Virology* **89**: 6965-6967.

[9] Rodamilans, B. *et al.* (2018). "Plant viral proteases: beyond the role of peptide cutters". *Frontiers in Plant Science* **9**: 666.

[10] Truniger, V., Miras, M. y Aranda, M. A. (2017) "Structural and functional diversity of plant virus 3'-cap-independent translation enhancers (3'-CITEs)". *Frontiers in Plant Science* **8**: 2047.

VIGS y tecnologías relacionadas en el análisis funcional de la interacción planta-patógeno

Francisco Tenllado Peralo

Grupo "Interacciones moleculares planta/virus/vector"
Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas
Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC. Madrid

Francisco Tenllado Peralo es doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, y actualmente científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB Margarita Salas), en Madrid. Su trabajo de investigación se centra en la generación de conocimiento básico de los mecanismos que regulan la respuesta de susceptibilidad de la planta a los virus. En concreto, la caracterización de las rutas metabólicas y de defensa del huésped alteradas por la infección, los potenciales efectos beneficiosos que la infección viral pudiera tener en plantas sometidas a otros tipos de estreses bióticos o abióticos, y el diseño de estrategias de resistencia no transgénica para su aplicación al control de enfermedades virales.

Introducción

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés) es una tecnología ampliamente utilizada en estudios funcionales en los que se desea reprimir de manera específica la expresión de un gen diana mediante el empleo de genomas virales modificados. Esta técnica de genética reversa es uno de los métodos más usados en el campo de la fitopatología, especialmente en especies vegetales en las que no se dispone de otras herramientas genéticas. En trabajos pioneros, Kumagai y col.[8] transfectaron hojas de *Nicotiana benthamiana* con un vector viral portador de secuencias parciales de la enzima fitoeno desaturasa (PDS), observando una disminución de los transcritos del gen acompañada por la aparición de un fenotipo sistémico de hoja blanca. A partir de este hito, ha venido incrementándose paulatinamente en la literatura científica tanto el número de vectores virales disponibles, como el número de especies vegetales en las que esta técnica posibilita herramientas de análisis de la función génica[5].

El mecanismo que subyace en la tecnología VIGS no es otro que el silenciamiento génico por ARN, un sistema de regulación génica conservado en eucariotas que representa una importante línea de defensa antiviral. Cuando un virus penetra en el interior celular, los procesos de replicación y transcripción viral producen ARN bicatenario (dsARN) –ya sea como intermediarios de la replicación, formas con estructura secundaria (*hairpins*) o, en el caso de los virus ADN, la formación de transcritos solapantes– que actúa como inductor del silenciamiento génico. Las formas dsARN son reconocidas por proteínas de tipo DICER (DCL) del huésped, cortando el dsARN en pequeños ARN primarios interferentes (siARN) de 21 a 24 nucleótidos. A continuación, diversas ARN polimerasas dependientes de ARN (RDR) utilizan los siARN primarios como cebadores para la síntesis de dsARN empleando como molde un ARN homólogo, en un proceso en el que se generan siARN secundarios y que amplifica el silenciamiento desde el sitio de infección inicial a través del resto de tejidos vegetales. Los dúplex de siARN generados por la acción de las DCL son separados y cargados como cadenas sencillas en proteínas ARGONAUTA (AGO) que, junto con otros cofactores, forman el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Estos complejos RISC actúan como efectores del proceso silenciando el ARN o el ADN con similitud de secuencia a los siARN, ya sea mediante el corte endonucleolítico de transcritos o la inhibición traduccional, en el caso del silenciamiento génico postranscripcional, o mediante la represión de la expresión génica por hipermetilación del ADN, en el caso del silenciamiento génico transcripcional[4]. Este sistema de defensa antiviral es el que explota la tecnología VIGS mediante la inserción en el genoma viral de secuencias de un ARNm del huésped para el que se desea suprimir su función.

El mecanismo que subyace en la tecnología VIGS no es otro que el silenciamiento génico por ARN, un sistema de regulación génica conservado en eucariotas que representa una importante línea de defensa antiviral

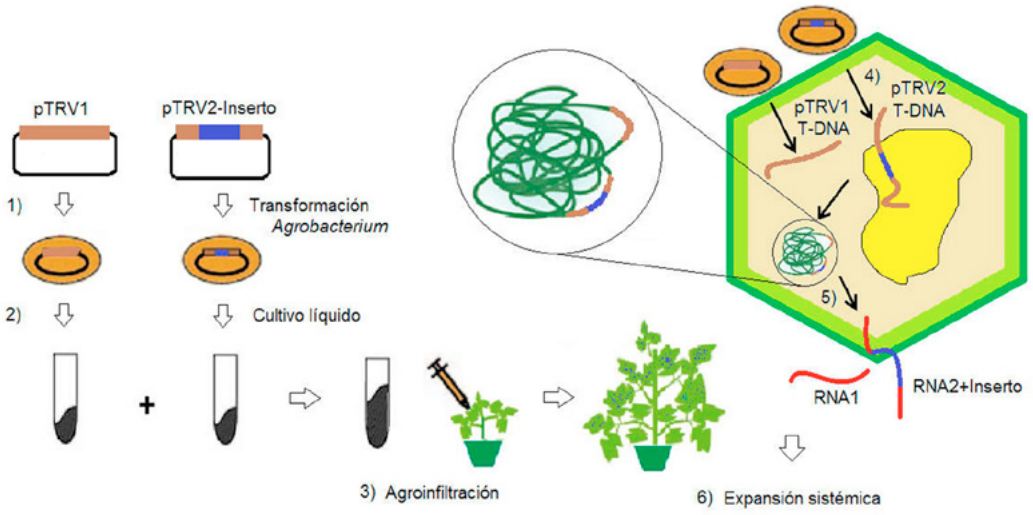
Aunque existen diversas técnicas para introducir los vectores virales en el huésped, la más empleada utiliza la transformación mediada por cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos Ti portadores del genoma viral

El lugar de inserción idóneo en el genoma viral no es trivial, ya que se ha documentado que, para virus ARN, el lugar óptimo se sitúa en regiones próximas a *hairpins* del genoma viral, con lo que se consigue la producción eficiente de siARN necesarios para el establecimiento del silenciamiento sistémico. En el caso de virus ADN, dado que los dsARN se generan por el anillamiento de transcritos sentido y antisentido, el lugar de inserción óptimo se sitúa en las zonas próximas a la convergencia de los transcritos solapantes.

Sistemas experimentales VIGS

La mayoría de los vectores virales usados en VIGS derivan de virus ARN de cadena sencilla, pero también se dispone de numerosos vectores basados en virus ADN, como el virus del mosaico africano de la yuca (ACMV). Dentro de la amplia gama de vectores VIGS disponibles[9], el virus del cascabeleo del tabaco (TRV) presenta el más amplio espectro de huéspedes, con ejemplos en la literatura que abarcan una gran variedad de angiospermas de interés agronómico (maíz, algodón), ornamental (*Rosa hybrida*) y medicinal (*Catharanthus roseus*), así como plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *N. benthamiana*. Los vectores comúnmente usados en dicotiledóneas no son normalmente efectivos en monocotiledóneas, aunque los basados en el TRV y el virus del mosaico del pepino se han usado con éxito en trigo y maíz. Para este importante grupo de plantas, se han empleado vectores derivados del virus del mosaico del bromo y el virus del mosaico estriado del centeno (BSMV) en estudios de genética reversa con VIGS.

Aunque existen diversas técnicas para introducir los vectores virales en el huésped –bombardeo biolístico, inoculación de transcritos o savia infectada, infiltración en vacío, etc.–, la más empleada utiliza la transformación mediada por cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos Ti portadores del genoma viral. Generalmente se han extraído de estos vectores los genes responsables de la transmisión viral y determinantes de síntomas, para, de esta manera, evitar su diseminación y los síntomas que pudieran enmascarar el fenotipo del gen endógeno silenciado. En algunos casos se han eliminado también las proteínas virales supresoras de silenciamiento génico, con objeto de que dichas proteínas no interfieran con el establecimiento del silenciamiento del gen diana. Un aspecto de especial importancia a considerar



Tecnología VIGS mediada por TRV para el silenciamiento en planta de un gen diana (*Figura* elaborada por el autor).

Artículo de revisión

La tecnología VIGS posibilita el estudio de la función del gen diana sin la necesidad de establecer métodos laboriosos de transformación genética estable

La evaluación de los fenotipos resultantes de los ensayos VIGS conlleva la determinación de diversos parámetros como la frecuencia, eficiencia y efectividad del silenciamiento, así como el comienzo y la duración del efecto silenciante

concierne al tamaño del inserto del gen a silenciar; generalmente suele ser variable –de unas decenas a 200-700 nucleótidos–, aunque, dependiendo del vector elegido, la longitud puede estar limitada debido a constricciones espaciales de la cápsida viral o a la propia inestabilidad del vector viral[5]. Además, la utilización de fragmentos pequeños puede reducir la eficiencia del silenciamiento génico, mientras que el empleo de insertos de mayor tamaño puede favorecer la aparición de fenómenos de silenciamiento sobre secuencias génicas no deseadas (*off-target*). Existen diversos *softwares* para facilitar el proceso de selección del inserto idóneo en los ensayos VIGS, como, por ejemplo, SGN VIGS.

Ejemplos VIGS en interacciones planta-patógeno

La tecnología VIGS posibilita el estudio de la función del gen diana sin la necesidad de establecer métodos laboriosos de transformación genética estable, de los que, además, se carece para un gran número de especies vegetales. Consecuentemente, ha enriquecido numerosos campos de experimentación que previamente se veían limitados por la carencia de métodos de estudio de función génica[9]. Entre ellos, se encuentran aplicaciones en el campo de la biología del desarrollo, metabolismo secundario, interacciones simbióticas, y uno de especial interés en protección de cultivos como es el de las interacciones planta-patógeno, al desentrañar cómo los patógenos establecen relaciones con su huésped. Boevink y col. [2] utilizaron la tecnología VIGS para identificar y caracterizar el modo de acción de un nuevo efector fúngico en *Phytophtora infestans*, el agente causal del tizón tardío en solanáceas. Esta molécula efectora facilita la infección de *P. infestans* mediante la atenuación de la expresión de genes de respuesta a patógeno, como genes regulados por ácido salicílico y ácido jasmónico. Nuestro grupo de investigación de Interacciones moleculares planta/virus/vector, del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, está centrado en el estudio de la interacción que se establece entre las plantas y los patógenos virales que las atacan. En concreto, estamos interesados en la manifestación de necrosis sistémica provocada por infecciones conjuntas del virus X de la patata (PVX) y diversos potyvirus. En nuestro laboratorio determinamos que el silenciamiento génico inducido por VIGS de las proteínas quinasas inducidas por ácido salicílico (SIPK) o herida (WIPK) compromete parcialmente la respuesta de necrosis sistémica causada por la interacción sinérgica de PVX y el virus Y de la patata[1]. Sin embargo, la disminución de muerte celular no trajo aparejada una mayor acumulación viral en tejido infectado, lo que sugiere que las cascadas celulares de quinasas regulan positivamente uno de los síntomas más graves causados por las interacciones virus-planta.

Consideraciones metodológicas en experimentos VIGS

Una de las principales características de la tecnología VIGS es que el silenciamiento del gen endógeno es transitorio en la mayor parte de los casos descritos; además, la intensidad del silenciamiento varía entre individuos y entre diversos órganos, lo que da como resultado mosaicos donde los sectores silenciados y no silenciados se presentan adyacentes en el tejido vegetal. Todo ello hace que la evaluación de los fenotipos resultantes de los ensayos VIGS deba de ser abordada de una forma metódica, que conlleva la determinación de diversos parámetros como la frecuencia, eficiencia y efectividad del silenciamiento, así como el comienzo y la duración del efecto silenciante[3]. A esto hay que sumar el hecho de que la infección del vector viral carente de inserto en algunas especies puede causar síntomas de enfermedad y una mayor acumulación del patógeno que la infección con un vector que expresa, por ejemplo, un frag-

Tecnologías VIGS enfocadas al estudio funcional planta-patógeno

Es de suma utilidad ordenar los datos en un sistema de clasificación por fenotipos bien definido, que permita determinar la intensidad, duración y localización del silenciamiento en las plantas inoculadas

El silenciamiento génico inducido por el huésped (HIGS) utiliza la capacidad de los siARN de atravesar las barreras celulares que separan a la planta del patógeno

mento de un gen delator (*GFP* o *GUS*). Por tanto, es recomendable un análisis comparativo de plantas inoculadas con el vector portador del gen diana, junto con plantas no tratadas y plantas inoculadas con el vector vacío o con un vector que porte un gen delator. De esta manera, se podría distinguir el fenotipo causado por el silenciamiento del gen de interés del fenotipo inespecífico resultado de una posible mayor acumulación viral. A esto hay que añadir la utilidad que supone el empleo en paralelo de construcciones que silencien un gen endógeno de fenotipo fácilmente reconocible, como puede ser el gen *PDS* o el de la chalcona sintasa.

Además de las observaciones fenotípicas, la extensión del silenciamiento del gen de interés debe ser evaluada mediante técnicas moleculares de detección de ARNm, como la RT-PCR, o de proteínas, como el *western blot*. De esta manera, se esperaría obtener una correlación directa entre el efecto fenotípico y el nivel de reducción en la acumulación del ARNm del gen diana. En casos donde el silenciamiento del gen diana fuera mayoritariamente a través de una inhibición traduccional, los ensayos de acumulación de la proteína diana serían determinantes en la evaluación del VIGS.

Dada la naturaleza variable y transitoria de los ensayos VIGS, es recomendable llevar a cabo un sólido análisis estadístico con los datos obtenidos que aporte consistencia a las observaciones fenotípicas. A tal efecto, es de suma utilidad ordenar los datos en un sistema de clasificación por fenotipos bien definido, que permita determinar la intensidad, duración y localización del silenciamiento en las plantas inoculadas. Con dicho sistema, es más fácil distinguir entre los efectos silenciantes en diferentes especies o cultivares, y realizar comparaciones del silenciamiento de distintos genes dianas[3].

Tecnologías relacionadas con VIGS

La posibilidad de manipulación del huésped utilizando genomas virales ha provocado la aparición de un creciente número de aplicaciones de la tecnología VIGS que van más allá del estudio de la función del gen diana en la planta. Así, por ejemplo, es posible silenciar los genes de un patógeno celular mediante la toma, a través de su huésped, de partículas virales o ARN portadores del gen de interés. Esta aproximación se ha denominado silenciamiento génico inducido por el huésped (HIGS)[7] y puede ir dirigida frente a bacterias, hongos, insectos, nemátodos e incluso plantas parásitas. Esta aplicación utiliza la capacidad de los siARN de atravesar, bien en forma libre o embebidos en vesículas, las barreras celulares que separan a la planta del patógeno, aunque el HIGS también puede verse desencadenado por la toma de dsARN. Por ejemplo, el HIGS con BSMV de tres genes relacionados con la patogenicidad suprimió el fenotipo de enfermedad causado por el hongo de la roya *Puccinia triticina* en trigo. Sin embargo, las aplicaciones biotecnológicas en protección de cultivos con esta aproximación, aunque prometedoras, deben considerar la reciprocidad del transporte de los siARN entre los dos organismos intervinientes. De la misma forma que las plantas manipuladas pueden introducir siARN en el patógeno, los patógenos también pueden hacer llegar siARN a su huésped, modificando potencialmente su respuesta de defensa.

En los últimos años se ha visto incrementada la demanda de diversos productos bioactivos –vacunas, anticuerpos, anticancerígenos, etc.– obtenidos a partir de plataformas vegetales[10]. En este sentido, el mismo vector viral que se emplea en VIGS puede utilizarse con pocas modificaciones para la sobreexpresión de proteínas de interés –una tecnología conocida como VOX–, convirtiéndose así la planta en un auténtico biorreactor. El ejemplo pionero

Tecnologías VIGS enfocadas al estudio funcional planta-patógeno

El mismo vector viral que se emplea en VIGS, puede utilizarse para la sobreexpresión de proteínas de interés, convirtiéndose así la planta en un auténtico biorreactor

en este campo lo constituye el virus del mosaico del tabaco (TMV) que, una vez introducido mediante agroinfiltración en *N. benthamiana* junto con la proteína supresora de silenciamiento P19 del virus del enanismo arbustivo del tomate, es capaz de producir hasta 4,8 g/kg de inmunoglobulina G en dos semanas. Otros vectores virales pueden generar proteínas foráneas a las que se les han añadido péptidos señal, sitios de escisión o dominios que facilitan su purificación, de manera que se obtiene una amplia variedad de péptidos o proteínas de alto interés farmacéutico. Así, por ejemplo, en monocotiledóneas se ha utilizado al BSMV como un sistema de sobreexpresión de proteínas de gran tamaño, donde el gen de interés se fusiona a una proteína viral separada por un péptido autoproteolítico. Cuando el BSMV entra en la célula del huésped, la proteína de fusión se traduce y sufre un autocorte liberando la proteína de interés.

Diversos sistemas basados en repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas) han revolucionado el campo de la edición genómica en múltiples organismos, incluidas las plantas. La mayoría de estrategias CRISPR-Cas se basan en la transformación genética empleando *A. tumefaciens* para la expresión de nucleasas Cas o el ARN guía sintético (sgARN). Diversos vectores virales se han utilizado para la expresión de los sistemas componentes del CRISPR-Cas desde que en 2014 se describió la expresión de sgARN por un vector de geminivirus en *N. benthamiana* y *Arabidopsis*, una estrategia conocida como edición genómica inducida por virus (VIGE). Desde entonces, se han empleado tanto virus ARN como ADN para la edición génica de precisión en una amplia variedad de mono y dicotiledóneas, algunas de gran importancia agronómica como trigo, maíz, arroz, tomate y patata[6].

Se han empleado tanto virus ARN como ADN para la edición genómica inducida por virus (VIGE)

Dado que el tamaño de la proteína Cas9 excede la capacidad de almacenamiento de la mayoría de los vectores virales, generalmente se utilizan líneas transgénicas que expresan esta proteína, mientras que los sgARN se introducen mediante expresión transitoria con vectores virales. La principal limitación de esta aproximación recae en que la mayoría de virus son incapaces de infectar meristemos, dificultando la heredabilidad de la edición génica. Así, las plantas editadas requieren procedimientos de cultivo de tejidos para fijar los cambios genéticos en su línea germinal. Sin embargo, recientemente se ha conseguido soslayar este inconveniente mediante la fusión al sgARN de un fragmento del ARNm del locus *Flowering T*, con lo que el ARNm de fusión es transferido al meristemo floral de plantas de *Arabidopsis* que expresan Cas9 obteniendo semillas *editadas*[6]. La edición genómica con vectores virales que expresan diversos sgARN (*multiplexing*) presenta numerosas ventajas, especialmente para el análisis funcional de familias multigénicas cuyos miembros actúan redundantemente.

En general, son aconsejables las estrategias no transgénicas de VIGE que no requieren la integración en el genoma de algún elemento del sistema CRISPR, dado que ahorran tiempo y, además, son más fácilmente aplicables a especies vegetales refractarias a la transformación o regeneración. Es más, incluso si se eliminan los componentes transgénicos por retrocruzamientos, las plantas obtenidas se consideran transgénicas en términos legales. En este sentido, recientes avances usando diversos vectores virales que expresan nucleasas Cas de menor tamaño, como Cas12a, aportan una solución libre de transgénicos. En definitiva, la adición de la edición genómica basada en VIGE a la familia de tecnologías relacionadas con VIGS añade un enorme potencial que soslaya la naturaleza transitoria y frecuentemente quimérica del VIGS, y posibilitará al avance de los análisis de función génica en una era postgenómica.

Artículo de revisión

El uso de los genes PDS o GFP como sistema delator visual puede resultar útil para colegir la eficiencia del silenciamiento del gen diana en diferentes partes de la planta

La tecnología VIGS y sus derivados han permitido la comprensión de numerosos mecanismos moleculares y análisis de función génica en especies para las cuales no existen librerías de mutantes o fáciles protocolos de transformación

Limitaciones de la tecnología VIGS

La tecnología VIGS presenta una serie de desventajas inherentes, algunas de las cuales ya han sido comentadas. **(a)** En primer lugar, en la mayoría de los casos no se consigue una completa supresión de la expresión del gen de interés. Aunque esta tecnología permite obtener usualmente una reducción del 75-90 % en la expresión del gen diana, estos niveles pueden aún generar una proteína funcional con el consiguiente fenotipo. **(b)** Además, el fenotipo de pérdida de función puede quedar enmascarado debido a redundancia funcional entre miembros de una familia génica. **(c)** Por otra parte, el silenciamiento mediante VIGS no es uniforme, pudiendo variar en diferentes partes de la planta. Esta limitación es más grave cuando se silencian genes que no producen fenotipos observables. En estos casos, el uso de los genes *PDS* o *GFP* como sistema delator visual puede resultar útil para colegir la eficiencia del silenciamiento del gen diana en diferentes partes de la planta. **(d)** A veces las infecciones del vector viral vacío por sí solas pueden desarrollar síntomas graves en la planta, lo que puede confundir la búsqueda del fenotipo del gen diana. Aunque la mayoría de vectores VIGS son asintomáticos, este problema no puede resolverse de manera satisfactoria en algunos vectores virales. **(e)** Incluso tras una supresión exitosa, las plantas tratadas pueden volver a recuperar la expresión del gen diana después de, aproximadamente, 3-4 semanas (transitoriedad). **(f)** Además, si no se realiza una selección adecuada de los fragmentos génicos candidatos, la tecnología VIGS puede dar lugar a fenómenos de silenciamiento sobre secuencias génicas no deseadas (*off-target*). **(g)** Las plantas tratadas con VIGS están sometidas a estrés en su metabolismo y respuestas defensivas –incluso si se han eliminado del vector viral las proteínas de virulencia–, lo que puede dar lugar a drásticos cambios en su transcriptoma.

Conclusiones

A pesar de las limitaciones arriba mencionadas, la tecnología VIGS y sus derivados gozan de creciente popularidad entre los patólogos y, en general, entre los biólogos moleculares de plantas. Ha permitido la comprensión de numerosos mecanismos moleculares y análisis de función génica en especies para las cuales no existen librerías de mutantes o fáciles protocolos de transformación. Además de en el campo de las interacciones planta-patógeno antes mencionado, estas tecnologías se han aplicado con éxito en biología del desarrollo, análisis de metabolitos secundarios e interacciones simbióticas que incluyen micorrizas, hongos o rizobios. Su naturaleza transitoria, que puede complicar el análisis de función génica en algunos casos, redunda en una ventaja cuando se investigan fenotipos letales, una aproximación que gana adeptos entre investigadores que trabajan en plantas modelo como *Arabidopsis*, *N. benthamiana* o tomate. Además, recientes avances extienden el potencial de VIGS a otras vertientes: **(a)** Por ejemplo, en especies en las cuales la transformación genética es factible pero laboriosa, esta tecnología se emplea como una herramienta con la que rápidamente seleccionar genes candidatos para una futura obtención de líneas *knockout* estables. **(b)** Facilita el análisis genético en cultivos leñosos –kiwi, vid, etc.–, ya que se ha demostrado que el silenciamiento génico vía VIGS es transferible a través de injerto. **(c)** Las aproximaciones *–ómicas* están produciendo una enorme cantidad de datos, y, con frecuencia, la tecnología VIGS supone el único medio para el análisis de genes candidatos de estos ensayos exploratorios de proteómica, transcriptómica y genómica. **(d)** La tecnología VIGS combinada con estudios de asociación de genoma completo (GWAS) permite identificar los genes responsables de importantes caracteres agronómicos. **(e)** Se utilizan con frecuencia diversas plataformas digitales

Artículo de revisión

automatizadas para el análisis eficiente del fenotipado obtenido por VIGS.

Se mantienen abiertas algunas preguntas acerca de los mecanismos moleculares que subyacen en el VIGS, cuya resolución permitiría mejorar la eficacia de la tecnología y su implementación en especies refractarias. En concreto, cómo se genera la señal de amplificación de los siARN, la caracterización de las bases moleculares de su transporte a larga distancia, y hasta qué punto puede ser diferente el silenciamiento inducido por vectores virales modificados de la respuesta de defensa inducida por los virus nativos. Lo que es incontrovertible es que la utilización de la tecnología VIGS ha jugado un papel esencial en la investigación de la respuesta de las plantas a sus patógenos, así como a otros tipos de estreses ambientales. En un futuro es esperable que esta tecnología llegue a ser más popular, si cabe, con el desarrollo de nuevos vectores en especies modelo y cultivos en los que hasta el momento no están disponibles. Además, en un momento en que la secuenciación exploratoria de genomas está proporcionando una gran cantidad de datos, la tecnología VIGS permite el análisis detallado de conjuntos de genes candidatos en una investigación centrada en hipótesis de trabajo.

Lo que es incontrovertible es que la utilización de la tecnología VIGS ha jugado un papel esencial en la investigación de la respuesta de las plantas a sus patógenos

REFERENCIAS

[1] Aguilar, E. *et al.* (2017). "Identification of MAPKs as signal transduction components required for the cell death response during compatible infection by the synergistic pair Potato virus X-Potato virus Y". *Virology* **509**: 178-184.

[2] Boevink, P. C., *et al.* (2016). "A *Phytophthora infestans* RXLR effector targets plant PP1c isoforms that promote late blight disease". *Nat. Commun.* **7**: 10311.

[3] Broderick, S. R. y Jones M. L. (2014). "An optimized protocol to increase virus-induced gene silencing efficiency and minimize viral symptoms in Petunia". *Plant Mol. Biol. Rep.* **32**: 219-233.

[4] Carbonell, A. y Carrington, J. C. (2015). "Antiviral roles of plant ARGONAUTES". *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 111-117.

[5] Dommes, A. B. *et al.* (2019). "Virus-induced gene silencing: empowering genetics in non-model organisms". *J. Exp. Bot.* **70**: 757-770.

[6] Ellison, E. E. *et al.* (2020). "Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs". *Nat. Plants* **6**: 620-624.

[7] Koch, A. y Wassenegger, M. (2021). "Host-induced gene silencing—mechanisms and applications". *New Phytol.* **321**: 54-59.

[8] Kumagai, M. H. *et al.* (1995). "Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 1679-1683.

[9] Rössner, C., Lotz, D. y Becker, A. (2022). "VIGS goes viral: How VIGS transforms our understanding of plant science". *Annu. Rev. Plant Biol.* **73**: 703-728.

[10] Tusé, D. *et al.* (2020). "The emergency response capacity of plant-based biopharmaceutical manufacturing—what it is and what it could be". *Front. Plant Sci.* **11**: 594019.

(*Imagen* suministrada por Israel Pagán).

...a la Dra. Aurora Fraile

Aurora Fraile Pérez es profesora titular de la Escuela de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) e investigadora principal del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Hasta su jubilación en julio de 2021, Aurora ha sido parte fundamental del Grupo de Investigación y Unidad Docente de Patología Vegetal de la UPM y del Grupo de Investigación de Interacción y coevolución planta-virus del CBGP. Socia fundadora de la SEF, fue vocal de su Junta Directiva en el período 2000-2004. En esta entrevista, Aurora nos habla de su trayectoria profesional, de su experiencia como investigadora y profesora, y de cómo ve el desarrollo actual y futuro de la investigación y de la docencia en el campo de la Fitopatología.

... por Soledad Sacristán

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA/CSIC)
Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas
Universidad Politécnica de Madrid (UPM)
Madrid

¿Nos puedes hacer un breve resumen de tu trayectoria profesional?

Durante todos mis estudios previos a la universidad (en mis tiempos, Bachillerato y Preuniversitario), siempre me atrajeron las materias de ciencias, sobre todo la Biología y las Matemáticas. Una vez superado el examen de acceso a la universidad (Examen de Preu) me planteé cursar Biología o Matemáticas, pero finalmente me decanté por la carrera de Ingeniero Agrónomo, que me parecía que podría proporcionarme una formación que conjuntara ambos intereses. Estudié la carrera en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid (ETSIA) en la especialidad de Fitotecnia, donde tuve la suerte de tener profesores tan destacados como Alonso Rodríguez Navarro (Bioquímica) y Eloy Mateo-Sagasta (Patología Vegetal). Una vez aprobadas todas las asignaturas (1975), y mientras preparaba el proyecto de fin de carrera, **solicité entrar como "meritoria" en la cátedra de Patología Vegetal para ampliar mis conocimientos en ese campo, y ya no consiguieron echarme**. Toda mi trayectoria profesional se ha desarrollado en distintos aspectos de la Patología Vegetal. Empecé aprendiendo y colaborando en los diagnósticos que hacían Eloy Mateo-Sagasta y Ángela Alonso de las consultas que llegaban a la cátedra, y comencé mi tesis doctoral sobre inducción de fitoalexinas por *Botrytis cinerea* bajo la dirección de Fernando García-Arenal. El período de doctoranda fue muy formativo, tanto científica como personalmente, y tuve la suerte de contar con la ayuda y, en muchas ocasiones, con la amistad de profesores tales como Francisco García Olmedo, Gabriel Salcedo, Cipriano Aragoncillo, José María Malpica y, por supuesto, Fernando García-Arenal. Con todos ellos mantuve discusiones muy enriquecedoras sobre mi trabajo que me ayudaron a desarrollar mi espíritu crítico.

Una vez defendida mi tesis doctoral (marzo de 1979) trabajé en el estudio de la resistencia de *Botrytis cinerea* a fungicidas, compaginándolo con la docencia de Patología Vegetal.

Obtuve la plaza de profesor adjunto numerario en 1982. Aquí tengo que recordar la inestimable ayuda que me proporcionaron, para preparar mis temas de oposición, Ramona Beltrá (bacterióloga del CSIC) y Dionisio López Abella (virólogo del CSIC).

Desde que obtuve la adjuntía he trabajado, junto con Fernando García-Arenal, en distintos aspectos de la Virología Vegetal.

¿Por qué te dedicaste a la Fitopatología y qué te llevó a elegir tus líneas concretas de investigación?

Mi interés por la Patología Vegetal se despertó en las clases de Eloy Mateo-Sagasta en quinto de carrera, pues hasta entonces poco sabía de la materia. A Mateo-Sagasta le debo todo lo que sé de hongos fitopatógenos, que tan útil me ha sido en la docencia de la asignatura de Patología Vegetal; a él fue al primer fitopatólogo que oí, ya en esos años, hablar de enfermedades de causa compleja.

Mis primeras líneas de investigación (durante mi tesis doctoral y un período posterior) se centraron en *Botrytis cinerea*, primero como inductor de fitoalexinas y posteriormente estudiando su resistencia a fungicidas, ya que en la Cátedra de Patología Vegetal se trabajaba fundamentalmente en hongos. Una vez que Fernando García-Arenal regresó de su estancia postdoctoral en la Universidad Cornell (Ithaca, NY, EE. UU.) me propuso colaborar con él abriendo una línea de Virología Vegetal en la Cátedra de Patología Vegetal. Esto fue un gran reto para mí que acepté encantada.

Si te hubieras tenido que dedicar a otra cosa, ¿qué habrías escogido?

Siempre me ha gustado la docencia y probablemente hubiera sido una profesora de instituto en Matemáticas o Biología. Ya con 17 años empecé a compaginar mis estudios con las clases particulares (sobre todo de Matemáticas) para conseguir dinero de bolsillo. En muchos casos disfruté dando esas clases y tengo que reconocer que conseguí en varias ocasiones buenos progresos en la formación de mis alumnos.

¿Cuál consideras que ha sido tu mayor logro a lo largo de tu carrera investigadora, o aquel que te ha producido mayor satisfacción?

Siempre, **el encontrar una respuesta plausible a una pregunta científica que te has planteado, es muy satisfactorio**. Desde este razonamiento, el ver publicado el primer artículo científico basado en los resultados de mi tesis doctoral fue mi primera gran satisfacción.

En el campo de la Virología Vegetal, mi mayor satisfacción fue el trabajo que desarrollamos conjuntamente con los profesores García-Arenal y Malpica sobre el análisis de las mutaciones espontáneas en el gen de la proteína del movimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV). Este trabajo se llevó a cabo utilizando plantas de tabaco del cultivar Xanthi de cuatro tipos: las que permiten la infección sistémica por TMV (*nn-Xanthi*); la línea isogénica NN-Xanthi que, debido

Síntomas sistémicos de TMV en *Nicotiana tabacum* (*Imagen* suministrada por la autora).

a que expresa el gen de resistencia *N* limita la infección por TMV al punto de infección, expresado como lesiones locales necróticas; y mutantes transgénicos de ambos genotipos de plantas que expresan constitutivamente la proteína de movimiento de TMV (plantas *nn-MP* y *NN-MP*). Las plantas de estos cuatro genotipos se inocularon con dos tipos de clones del virus: el clon completo y un clon mutado en el gen de la proteína de la cápsida (*MP562V*). Estas herramientas nos permitieron analizar las mutaciones espontáneas en el gen de la proteína de movimiento del TMV cuando no está sujeto a presión selectiva. Fue un trabajo duro, tanto en el planteamiento de los experimentos como en las horas y horas de trabajo de invernadero inoculando plantas y recogiendo lesiones locales necróticas y en el análisis de las secuencias resultantes, pero los resultados obtenidos creo que fueron una aportación importante.

En otro orden de cosas, me siento satisfecha de mi trayectoria porque pienso que, en la mayoría de los casos, he sido responsable y crítica con mi trabajo y he dado, en cada caso, lo más posible de mis capacidades. Además, creo que he sido accesible a becarios y estudiantes colaboradores para los problemas que se les planteasen.

Has desarrollado un número considerable de trabajos de colaboración, ¿cómo crees que te han enriquecido?

Por supuesto, todos los trabajos de colaboración me han enriquecido muchísimo. Es siempre positivo contrastar diferentes puntos de vista y distintas maneras de enfrentar las preguntas que uno se plantea en la investigación.

Yo no hice, por distintas causas, una estancia postdoctoral en un laboratorio extranjero y, aunque he mantenido colaboraciones con investigadores extranjeros, las personas que más han influido en mi desarrollo científico son nacionales.

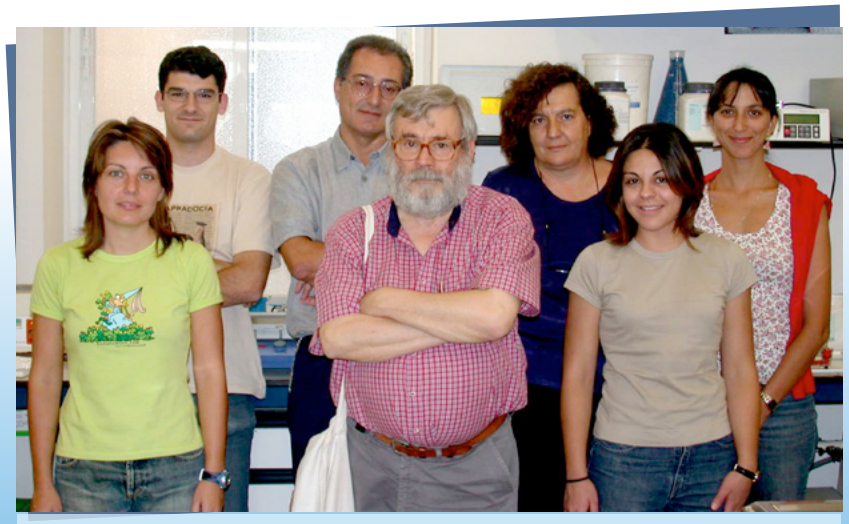
Quiero destacar, sólo como un ejemplo, lo enriquecedora que fue la colaboración durante años con el profesor José María Malpica, persona con un enorme espíritu crítico y una sólida formación en Estadística que, siempre que discutíamos cualquier planteamiento de un experimento o de un resultado, te obligaba a explorar todas las alternativas.

¿Ha habido alguna figura del mundo de la investigación que te haya impresionado o marcado especialmente?

Debo mencionar aquí a Fernando García-Arenal, con el que he trabajado estrechamente durante todo mi período investigador. García-Arenal es una persona con una inteligencia poco común, una memoria infinita y una grandísima capacidad de análisis, que me ha enseñado a plantear y contestar preguntas científicas en las fronteras del conocimiento. Además, ha sido capaz de dirigir el grupo de investigación con acierto y mano firme, cosa no siempre sencilla.

Eres profesora titular de Universidad en la ETSIAAB y has enseñado asignaturas relacionadas con la Fitopatología durante muchos años, ¿cómo ha sido compaginar la docencia con la investigación?

Como consideración general, creo que la docencia se ve muy enriquecida si el docente participa también en tareas de investigación. Compaginar ambas tareas no es siempre fácil, sobre todo en las épocas de prácticas o tutorías que absorben la mayor parte de las horas laborables disponibles. En esas épocas hay que dedicar



Aurora Fraile (quinta por la izquierda) con Fernando García-Arenal y José María Malpica (tercero y cuarto por la izquierda) y otros miembros del grupo en el Laboratorio de Virus de la Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos de Madrid, año 2006 (*Imagen* suministrada por Israel Pagán).

parte de las horas no laborables a estudiar, leer artículos científicos, ordenar los datos de laboratorio, etc. A pesar de ello, creo que el balance es positivo. En mi caso, **la docencia en Patología Vegetal me ha obligado a no perder de vista otros patógenos aparte de los virus y a mantenerme al día en otros campos**.

Como consideración general, creo que la docencia se ve muy enriquecida si el docente participa también en tareas de investigación

¿Qué relación has tenido con la SEF y cómo la valoras?

Cuando comencé mi vida profesional en la cátedra de Patología Vegetal, me hice socia del Grupo Especializado en Fitopatología Microbiana dentro de la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Cuando, en septiembre de 1981 se fundó la Sociedad Española de Fitopatología, pasé a ser socia fundadora de la misma. Creo que fue una excelente idea fundar la SEF, que ha sido capaz de asociar a la mayoría de las personas que tienen alguna relación con la Fitopatología.

Siempre he estado al tanto de las actividades de la SEF, he asistido a la mayoría de los congresos, a prácticamente todas las asambleas (no sólo a las que se celebran coincidiendo con los congresos) y fui vocal de la Junta Directiva en el período 2000-2004.

¿Cómo ves el futuro de la Fitopatología? ¿Cuáles serán los aspectos clave que deberían ser abordados en el futuro, en general, y en tu área, en particular?

A pesar de que la Fitopatología tiene cada vez menos presencia en los planes de estudio de la mayoría de las carreras de Ingeniero Agrónomo en sus distintas nomenclaturas, creo que es una disciplina imprescindible para manejar de manera racional los cultivos. Mi esperanza es que los responsables de elaborar dichos planes de estudio se den cuenta de ello antes de que patógenos como *Xylella fastidiosa* o el virus del fruto rugoso marrón del tomate (*Tomato brown rugose fruit virus*, ToBRFV) acaben con cultivos de alto valor. **Creo que la Fitopatología ya no puede ir enfocada a un único patógeno en un único cultivo, sino que se deben tener en cuenta todos los factores que afectan al desarrollo de la enfermedad** (cultivo, ambiente, población del patógeno, poblaciones de otros organismos presentes, flora presente en el área, etc.)

¿Cuáles crees que son los factores que determinan el éxito de una carrera investigadora? ¿Qué consejos darías a los que empiezan o aspiran a empezar ahora?

Por supuesto, la carrera investigadora se debe comenzar porque se tenga interés y curiosidad en el campo elegido. Hay que tener en cuenta que la investigación es una práctica bastante rutinaria en el día a día, al menos en el campo de la Fitopatología (muchas horas de muestreo, muchas horas de invernadero, muchos extractos que hacer, muchas secuencias que analizar, muchos experimentos fallidos que hay que repetir, etc.). Esta rutina puede desanimar a los investigadores que se inician, pero llegar a obtener resultados, analizarlos y encontrarles una explicación razonable creo que es una enorme satisfacción.

El único consejo que daría a quien quisiera iniciarse en la investigación en Fitopatología (y me imagino que puede ser válido para otras disciplinas) es que tengan una base sólida en la materia, es decir, que se estudien, como primer paso, los libros de texto referidos, no a su objetivo concreto, sino a la materia en general y, por supuesto, también algún libro de texto de Estadística. Creo que es utilísimo tener una visión general de la materia en la que se encuadra nuestra investigación.

¿Cuáles son, en tu nueva etapa, tus principales actividades? ¿Mantienes alguna relación con el mundo de la Fitopatología?

Hace un año que me jubilé y aún no tengo mi vida nueva totalmente organizada, sobre todo porque tengo tres niet@s que demandan mucha atención. Mi idea es dedicarme a viajar, a ver museos, cine y teatro que no he podido disfrutar durante los años de vida profesional. Aunque cuando me jubilé tenía claro que esta es una nueva etapa en mi vida, sigo manteniendo relación con el laboratorio de Interacción y coevolución planta-virus que dirige Fernando García-Arenal en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) y suelo estar disponible cuando me piden ayuda para

discutir resultados, hacer algún experimento o salir al campo a muestrear, cosa que siempre me ha gustado. Por supuesto, ya no estudio con detenimiento los artículos científicos relacionados con lo que fue mi ámbito de investigación. Sin embargo, intento no desligarme del todo de lo que fue mi carrera investigadora y sigo pendiente de lo que se publica en esos campos, sobre todo por lo que se refiere a revisiones científicas; no se pueden borrar de un plumazo los intereses de 40 años de trabajo.

Aurora Fraile (segunda por la izquierda) con Antolín López, Fernando García-Arenal, Israel Pagán, María Ángeles Ayllón y Soledad Sacristán en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), año 2013 (*Imagen* suministrada por Israel Pagán).

¿Qué aspectos añoras más de tu actividad profesional anterior?

Lo que más añoro de mi actividad profesional anterior son las discusiones en las reuniones semanales de laboratorio, en algunos casos tormentosas, pero siempre muy formativas. Añoro también las discusiones científicas con los colaboradores en las distintas líneas de trabajo y la accesibilidad de los jefes e investigadores de otros laboratorios del CBGP para resolver dudas, prestar material, etc.

Mirando en retrospectiva, ¿qué te ha aportado a nivel personal tu actividad profesional?

Soy una persona que nunca he aceptado los dogmas, ni siquiera en mi adolescencia, y mi actividad profesional me ha aportado herramientas para rebatir muchos de esos dogmas. Por otro lado, me ha abierto la mente, permitiéndome considerar y respetar puntos de vista distintos a los míos, sustentados por un razonamiento lógico. En resumen, **mi actividad profesional me ha abierto la mente y ha desarrollado mi capacidad de razonamiento y de contraste de pareceres, no sólo en lo que se refiere a la investigación sino también en mi vida en general**.

Finalmente, mi actividad profesional me ha aportado grandísim@s amig@s con l@s que sigo manteniendo una estrecha relación.

Cogiendo muestras de campo con Israel Pagán, año 2017 (*Imagen* suministrada por Israel Pagán).

Muchas gracias, Aurora, por atender nuestra invitación y contestar a nuestras preguntas.

Te deseamos todo lo mejor en esta nueva etapa de tu vida.

Modo de acción del fluopiram en nematodos fitoparásitos

Lee Robertson

Grupo de Nematología
Dpto. Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (INIA-CSIC)
Madrid

Mode of action of fluopyram in plant-parasitic nematodes

Schleker, A. S. S., Rist, M., Matera, C., Damijonaitis, A., Collienne, U., Matsuoka, K., Habash, S. S., Twelker K., Gutbrod, O., Saalwächter, C., Windau, M., Matthiesen, S., Stefanovska, T., Scharwey, M., Marx, M. T., Geibel , S. & Grundler , F. M. W.

Scientific Reports **12**: 11954.

Publicado el 13 de julio de 2022

Los nematodos fitoparásitos son plagas muy dañinas para la agricultura mundial ya que causan grandes perjuicios. Es difícil estimar el coste económico, pero se considera que tanto las pérdidas de rendimiento, como los costes necesarios para controlar los nematodos con productos fitosanitarios, superan los 100 000 millones de dólares estadounidenses.

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de compuestos más selectivos, potencialmente menos dañinos para los organismos no diana y ecosostenibles con el medio ambiente. Recientemente, se ha descubierto que el fungicida fluopiram, que inhibe la succinato deshidrogenasa (SDH) en el complejo mitocondrial II de la cadena respiratoria aeróbica de los hongos, impide la eclosión de los huevos en el nematodo formador de agallas *Meloidogyne incognita*, así como en los nematodos formadores de quistes *Heterodera glycines* y *Heterodera schachtii*.

Específicamente, el artículo describe con detalle el impacto del fungicida en los nematodos M. *incognita* y M. *javanica*, y *H. schachtii*, demostrando claras diferencias en la sensibilidad de los dos géneros hacia el producto. El fluopiram paralizó a una determinada concentración, el 50 % de los nematodos analizados; sin embargo, para *H. schachtii* se requirieron dosis mayores. Paralelamente, se observó que dicha parálisis era reversible en un 50 % de la población ensayada de M. *incognita* J2 recuperándose del pretratamiento con fluopiram, y en un 100 % en el caso de *H. schachtii*, provocando, además, ciertas diferencias en el proceso de infección y desarrollo de los nematodos.

Por otro lado, la investigación también mostró que el fluopiram altera la biosíntesis de ATP en los nematodos ensayados, y la homología de secuencias de proteínas SHD indicó que la selectividad entre *Heterodera* spp. y *Meloidogyne* spp. podría deberse a alteraciones en la unión de ligandos causadas por la posesión del aminoácido alanina dentro de una de las cuatro subunidades (SDHC), que

ocupa una posición crucial para la interacción del fluopiram con su receptor. Es probable que esta diferencia a nivel genético suponga que *H. schachtii* sea menos sensible al compuesto, tal y como lo validaron los estudios de mutantes de *Caenorhabditis elegans*.

Hay pocos ingredientes activos en el control de nematodos patógenos, por lo que el uso de este producto abre una línea molecular de investigación sobre el mecanismo de actuación de productos similares sobre el metabolismo de los nematodos, muchos de los cuales forman parte del grupo de organismos de cuarentena en Europa.

Dos proteínas específicas de los apresorios de *Magnaporthe* (MAS), MoMas3 y MoMas5, son necesarias para suprimir la inmunidad innata del huésped y promover el crecimiento biotrófico en las células de arroz

Jorge Poveda[1,2]

[1]Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology (IMAB)
Universidad Pública de Navarra
[2]Centro de Investigação de Montanha (CIMO)
Instituto Politécnico de Bragança- Portugal

Two Magnaporthe appressoria specific (MAS) proteins, MoMas3 and MoMas5, are required for suppressing host innate immunity and promoting biotrophic growth in rice cells

Gong, Z., Ning, N., Li, Z., Xie, X., Wilson, R. A. & Liu, W.
Molecular Plant Pathology **23**: 1290-1302.
Publicado el 8 de mayo de 2022

Magnaporthe oryzae (sin. *Pyricularia oryzae*) es un hongo ascomiceto patógeno hemibiotrofo vegetal de diversos cultivos. Aunque puede infectar trigo y mijo, su verdadera importancia económica radica en su capacidad para infectar al arroz, provocando la enfermedad más devastadora de su cultivo, el tizón del arroz. Esta enfermedad da lugar a pérdidas anuales en el cultivo de entre el 10 y el 30 % , lo que supone el alimento para 60 millones de personas durante todo un año.

Para penetrar los tejidos vegetales, *M. oryzae* forma apresorios en sus hifas. Hasta el momento se han descrito varias proteínas específicas de estos apresorios, codificadas por los genes *MoGAS1*, *MoGAS2* y de *MoMAS3* a *MoMAS6*. Los dos primeros genes ya han sido descritos como factores de virulencia necesarios para llevar a cabo la infección, sin embargo, se desconoce la función de los otros cuatro genes (*MoMAS3-MoMAS6*).

El análisis transcriptómico determinó cómo estos cuatro genes se expresan de forma específica en los apresorios y en los primeros instantes de la infección. Tras el silenciamiento de los cuatro genes en cuatro mutantes diferentes (Δ*Momas3*, Δ*Momas4*, Δ*Momas5* y Δ*Momas6*) se determinó que la pérdida de ninguno de estos genes afectaba la correcta formación del apresorio o el crecimiento vegetativo de *M. oryzae*. Sin embargo, la virulencia de los mutantes Δ*Momas3* y Δ*Momas5* se reducía de forma significativa. Ambas cepas silenciadas eran capaces de infectar la primera célula de la epidermis de las hojas de arroz, pero no continuaban con normalidad el proceso infectivo, lo que podría suponer la posible pérdida de su capacidad biotrófica. Además, en ausencia de ambos genes, la planta acumula celularmente, en respuesta a la infección, especies reactivas de oxígeno (ROS) que activan su respuesta defensiva. Sin embargo, en plantas incapaces de producir ROS, ambas cepas mutantes infectan de forma efectiva las hojas de arroz. Por lo tanto, las proteínas MoMas3 y MoMas5 están implicadas en la supresión de las respuestas defensivas vegetales, permitiendo el desarrollo del patógeno como biotrofo.

En resumen, el trabajo describe la importancia de dos proteínas en la capacidad infectiva de *M. oryzae* mediante la supresión de las respuestas defensivas vegetales. Esto supone un importante avance en el conocimiento de la biología del hongo y en la descripción de nuevas dianas para el diseño de herramientas efectivas de control de la enfermedad.

Volverse viral: Agentes de control biológico basados en virus para la protección vegetal

Inmaculada Ferriol Safont
Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC)
Madrid

Going viral: Virus-based biological control agents for plant protection

Wagemans, J., Holtappels, D., Vainio, E., Rabiey, M., Marzachì, C., Herrero, S., Ravanbakhsh, M., Tebbe, C. C., Ogliastro, M., Ayllón, M. A. & Turina, M.

Annu. Rev. Phytopathol. **26**: 21-42.

Agosto de 2022 - Publicado como *Review in Advance* el 17 de marzo de 2022

Los estreses bióticos más importantes para los cultivos son aquellos causados por hongos, oomicetos, insectos, virus y bacterias, siendo el control químico uno de los métodos frecuentemente utilizados para su control. Sin embargo, factores como el desarrollo de resistencias en los patógenos/plaga, el posible daño a los ecosistemas naturales, la toxicidad de los residuos en el campo y la contaminación del medio ambiente han estimulado la búsqueda de alternativas más seguras como el uso de agentes de control biológico (*biological control agents*, BCA).

En este trabajo se revisa cuál es el *estado del arte* del uso de virus como agentes de control biológico contra hongos, bacterias, virus e insectos, poniendo atención en aquellos

criterios que deben tener los BCA, como son especificidad, eficacia, persistencia y bioseguridad. Y enfocándose no sólo en el papel biocida del virus sino también en las complejas interacciones ecológicas entre los virus y sus hospedadores. Existe una gran biodiversidad de virus que pueden ser utilizados como BCA de control biológico contra bacterias fitopatógenas (bacteriófagos), hongos/oomicetos (micovirus), insectos plaga e insectos vectores (entomovirus) y virus de plantas (protección cruzada).

Aunque existe un gran potencial en el uso de virus de bacterias o bacteriófagos como BCA, tan sólo hay un número limitado de biobactericidas basados en bacteriófagos en el mercado. Además, la monitorización de las poblaciones bacterianas después de que el producto sea aplicado, la especificidad con el hospedador, el efecto en otros organismos que no sean diana y el riesgo de desarrollar resistencias bacterianas son puntos a tener en cuenta en el desarrollo y aplicación de bacteriófagos como BCA. El uso de bacteriófagos en combinación con otras estrategias de control, la nanotecnología y el uso de múltiples fagos son algunas de las aproximaciones que se están utilizando para reducir el desarrollo de resistencias.

Los micovirus han sido utilizados como BCA empleando diferentes estrategias. Un caso exitoso de hipovirulencia es el del virus *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1) contra su hospedador, el hongo *Cryphonectria parasitica* causante del tizón del castaño. Los micovirus también pueden cambiar el estilo de vida del hongo hospedador de patógeno a endófito. Y, en el caso de micovirus que no causan hipovirulencia, se plantea el uso del silenciamiento génico inducido, *virus-induced gene silencing* (VIGS), mediante la inserción de un gen diana del huésped en el genoma viral del micovirus (clon infeccioso).

Dentro de la clasificación de virus entomopatógenos encontramos baculovirus, cipovirus, densovirus, entomopoxvirus y picornavirus que infectan insectos. Pero no todos estos virus tienen potencial como BCA. Los baculovirus han sido mayormente caracterizados y utilizados con éxito en insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera y, además, existen diferentes productos comerciales mayoritariamente para Lepidoptera. Los densovirus podrían ser también buenos candidatos, ya que el pequeño tamaño de su genoma de ADN favorece su manipulación genética y su producción. También es importante entender cómo el viroma de los insectos puede influir en las interacciones con su planta huésped. Otra alternativa es manipular genéticamente los virus de insectos para la expresión de ARN interferente (ARNi) que tenga como diana un gen del hospedador.

Por último, los virus de plantas atenuados también han sido utilizados como BCA al ser preinoculados en el hospedador y proteger de una segunda infección de un aislado más virulento del mismo virus.

En resumen, existen diferentes ejemplos del uso de virus como BCA para limitar el impacto de los patógenos y plagas en los cultivos, pero todavía persiste la necesidad de entender el efecto en sus hospedadores y en organismos que no sean diana, así como tener una mayor aceptación social.

FUE NOTICIA en 2022

Por Soledad Sacristán y Nieves Capote

Identificado un nuevo vector de *Xylella fastidiosa*

El hemíptero *Neophilaenus lineatus* ha sido confirmado como vector de *Xylella fastidiosa* al encontrarse una docena de individuos infectados en los muestreos de 2021 en la Comunidad Valenciana. Así, esta especie se une a *Philaenus spumarius* y *N. campestris*, los otros dos vectores capaces de transmitir la bacteria descritos hasta hora, todos de la familia Aphrophoridae.

Neophilaenus lineatus (Fuente: Walwyn; CC BY-NC-SA 2.0).

Investigadores del IVIA y de la Universitat de València identifican bacterias antagonistas para el control del fuego bacteriano

El estudio, publicado en la revista *Environmental Microbiology Reports*, muestran la actividad de varios aislados bacterianos como agentes de biocontrol.

Fuego bacteriano (*Imagen*: Ken Johnson; Oregon State University, 2014; CC BY-SA 2.0).

La SEF ya tiene canal YouTube

Se puede acceder desde la web de la SEF haciendo *click* en el enlace correspondiente en la parte superior, junto a los enlaces a nuestras redes sociales. Los primeros contenidos, tras obtener los permisos para su publicación por parte de los ponentes, son el de la Jornada del 40 Aniversario de nuestra sociedad y el de la Jornada de Bioseguridad y Biocontención en laboratorios de Sanidad Vegetal. Esperamos que os agraden, y seguir nutriendo el canal con nuevos contenidos próximamente.

Celebrado el encuentro internacional Phytoma: "Nuevo escenario de la sanidad en el olivar"

El Encuentro Internacional Phytoma **"Nuevo escenario de la sanidad en el olivar: estrategias de control y servicios ecosistémicos"** abordó los principales avances y retos fitosanitarios del olivar. Tuvo lugar el 9 y 10 de noviembre de 2022 en el Auditorio de Dcoop en Antequera, Málaga.

Sanidad Vegetal nombra a Valgenetics laboratorio designado para análisis fitosanitarios

La empresa de biotecnología ha sido reconocida una vez más por Sanidad Vegetal para realizar análisis de organismos presentes y de cuarentena para la exportación de material vegetal.

(*Fuente*: Valgenetics S.L., 2022)

Celebrado con éxito el XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología

Del 24 al 26 de octubre de 2022 tuvo lugar la celebración del XX Congreso de la SEF en el campus de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). El Congreso contó con un total de 359 asistentes. Se impartieron numerosas ponencias plenarias e invitadas y se realizaron nueve sesiones simultáneas en diferentes temas (Detección y Diagnosis, Gestión de Enfermedades, Epidemiología e Interacción Planta-Patógeno) que sumaron un total de 66 presentaciones orales. Todo ello, unido a la presentación de 250 pósteres, constituyó un hito en la celebración de los Congresos de nuestra Sociedad.

Más información en la sección correspondiente.

TESIS DOCTORALES

Advances towards integrated management of fungal grapevine trunk diseases

- **Doctoranda:** María del Pilar Martínez Diz (Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia, AGACAL-EVEGA).
- **Directores:** Dra. Emilia Díaz Losada (AGACAL-EVEGA) y Dr. David Gramaje Pérez (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, ICVV).
- **Fecha y lugar de lectura:** 26 de octubre de 2020; videoconferencia por Teams.

Implicación de genes de *Pseudomonas simiae* PICF7 en endofitismo, control biológico y promoción del crecimiento vegetal

- **Doctoranda:** Nuria Mª Montes Osuna.
- **Directores:** Dr. Jesús Mercado Blanco y Dra. Carmen Gómez-Lama Cabanás. Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- **Tutor:** Dr. Francisco Javier López Escudero (Universidad de Córdoba, UCO).
- **Fecha y lugar de lectura:** 2 de marzo de 2022. Salón de Actos del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Finca Alameda del Obispo, Córdoba.

Effect of light on nectarine-Monilinia spp. interaction and analysis of fungal and fruit responses during M. laxa infection

- **Doctoranda:** Marta Balsells Llauradó.
- **Directores:** Dra. Rosario Torres Sanchis y Dr. Josep Usall i Rodié.
- **Fecha y lugar de lectura:** 29 de marzo de 2022. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria (ETSEA) de la Universidad de Lleida (UdL).

Diversidad de *Castanea sativa* Mill. en base a marcadores genéticos relacionados con el estrés hídrico y la tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* Rands

- **Doctorando:** Francisco Alcaide Romero.
- **Directores:** M.ª Ángela Martín Cuevas (Universidad de Córdoba) y Alejandro Solla Hach (Universidad de Extremadura).
- **Fecha y lugar de lectura:** 1 de abril de 2022. Universidad de Extremadura.

Impacto de la edición de EIF4E sobre la resistencia a virus y la fertilidad en plantas de melón

- **Doctorando:** Giuliano Sting Pechar (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CEBAS-CSIC, y Universidad de Murcia).
- **Directores:** Prof. Miguel Ángel Aranda Régules, Dra. Livia Donaire Segarra, Dr. Roque Carlos García-Almodóvar (CEBAS-CSIC).
- **Fecha y lugar de lectura:** 11 de mayo de 2022. Universidad de Murcia.

Novel insights of viroid biology and host responses to their infection

- **Doctorando:** Joan Márquez Molins (Institute for Integrative Systems Biology, I²SysBio).
- **Directores:** Gustavo Gómez, Vicente Pallás y José Antonio Navarro Bohígues.
- **Fecha y lugar de lectura:** 16 de mayo de 2022. Salón de actos del I²SysBio. Paterna, Valencia.

Implicaciones de las infecciones mixtas de dos cepas de un virus de plantas en su epidemiología, evolución e interacción con el huésped

- **Doctoranda:** Cristina Alcaide Cabello (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CEBAS-CSIC).
- **Directores:** Miguel Ángel Aranda Régules y Pedro Gómez López.
- **Fecha y lugar de lectura:** 20 de mayo de 2022. CEBAS-CSIC.

Transcriptomics technologies and their potential for pine pitch canker management

- **Doctoranda:** Cristina Zamora Ballesteros (Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, iuFOR, y Universidad de Valladolid).
- **Director:** Dr. Julio J. Díez Casero (iuFOR y la Universidad de Valladolid).
- **Fecha y lugar de lectura:** 10 de junio de 2022. Campus "La Yutera", Palencia.

Caracterización funcional de una colección de germoplasma de olivo silvestre para la mejora del olivar

- **Doctorando:** Pablo Díaz Rueda
- **Directores:** Dr. José Manuel Colmenero Flores (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC) y Dra. María Nieves Capote Maínez (IFAPA "Las Torres").
- **Fecha y lugar de lectura:** 15 de julio de 2022. Facultad Biología, Universidad de Sevilla.

XVI Congreso de la Unión Mediterránea de Fitopatología MPU2022

Del 4 al 8 de abril de 2022
Limassol, Chipre

Manuel Anguita Maeso y Blanca B. Landa del Castillo
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC). Córdoba

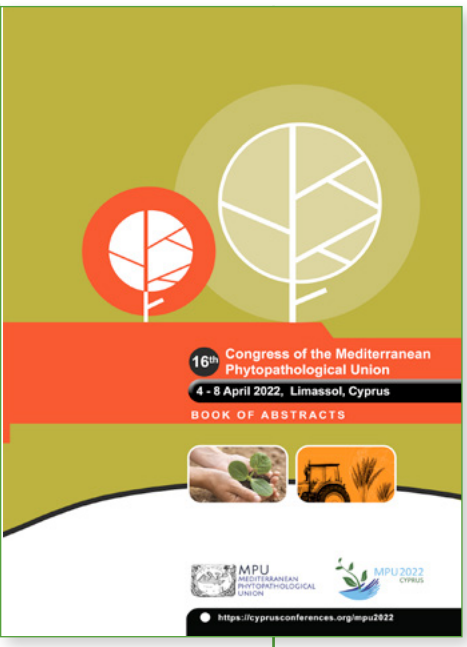
El XVI Congreso de la Unión Mediterránea de Fitopatología (MPU2022) tuvo lugar en Limassol, Chipre, del 4 al 8 de abril de 2022. Un total de 130 participantes, procedentes tanto de países europeos como extracomunitarios, celebraron el 60 aniversario de la MPU y los 62 años de la publicación de *Phytopathologia Mediterranea* como revista de patología vegetal de primer nivel. Este evento sirvió para mostrar el importante papel que juega la agricultura mediterránea y la fitopatología en la salvaguarda de los alimentos y las tradiciones de la dieta mediterránea y la seguridad alimentaria para todo el planeta.

El Congreso MPU2022, que tuvo como lema "Salvaguardando la Sanidad Vegetal Mediterránea", promovió la difusión de los últimos avances científicos, y facilitó el diálogo y la colaboración entre investigadores interesados en todos los aspectos de la Fitopatología. Esta conferencia también abordó perspectivas más amplias en campos científicos no explorados previamente con tanta extensión en los congresos de la MPU, incluidos los estreses abióticos, los biopesticidas, la patología forestal, la agricultura digital, la igualdad de género en la investigación, la financiación científica, y la enseñanza y el desarrollo profesional en fitopatología junto con una sesión especial conjuntamente con la Sociedad Árabe de Protección Vegetal.

Además, se llevaron a cabo sesiones plenarias, simultáneas y de paneles sobre temas clave como análisis genómicos de patógenos; patógenos emergentes invasivos; manejo integrado de enfermedades; seguridad alimentaria; nuevas herramientas en diagnóstico y gestión de enfermedades; interacciones moleculares patógeno-huésped; impacto del cambio climático; biocontrol, compuestos naturales y estimulantes vegetales; epidemiología y modelización; y papel del microbioma en sanidad vegetal. Esta conferencia también tuvo una sesión sobre estrés abiótico y, en particular, estrés por sequía y salinidad, así como métodos para mitigarlos.

Los trabajos presentados en el Congreso ascendieron a 83 presentaciones orales, incluidas 15 presentaciones invitadas de científicos de relevancia internacional, y 63 presentaciones en formato panel, y que cubrieron todas

Fotos de ponentes durante el congreso, facilitadas por los autores.



las áreas de la patología vegetal. Entre estas presentaciones, dos estudiantes de doctorado españoles recibieron premios a la mejor presentación oral. El trabajo titulado "Modelling the airborne inoculum of *Polystigma amygdalinum*, which causes red leaf blotch of almond in Catalonia, Spain" presentado por Gemma Pons-Solé del IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Alimentarias) y el trabajo titulado "Modelling potential climatic suitability for olive vascular diseases in southern Spain", presentado por Luis Felipe Arias-Giraldo del IAS (Instituto de Agricultura Sostenible), recibieron el 2.º y 3.er premio respectivamente.

La participación en esta conferencia contribuyó al fructífero intercambio de ideas científicas y ayudó a forjar nuevas amistades y futuras colaboraciones que, junto a la experiencia vivida en la ciudad, resultó ser científicamente gratificante, muy agradable y verdaderamente inolvidable.

III Reunión Nacional de la Red Nacional de Virología de Plantas RENAVIPLANT

Del 25 al 27 de mayo de 2022
Murcia

Pedro Gómez López
Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS-CSIC). Murcia

RENAVIPLANT
RED NACIONAL DE VIRUS DE PLANTAS

Este año 2022 tuvo lugar la III Reunión Nacional de Virus de Plantas (RENAVIPLANT) entre los días 25 a 27 de mayo en el Museo de Arqueología de Murcia (MAM) gracias a la financiación recibida por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Ref: RED2018-102703-T) de la Agencia Estatal de Investigación, dentro del programa Acciones de dinamización «Redes de Investigación», y a patrocinadores como la empresa Agrenvec SL.

El evento fue coordinado por Pedro Gómez, doctor en Patología Vegetal y Científico Titular del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, con el apoyo de los miembros del Comité Científico y colaboradores en la organización.

Esta iniciativa tuvo su arranque en Alicante en 2003 y, con un notable incremento de participantes, la Red Nacional de Virus de Plantas está actualmente formada por 14 grupos con más de 55 investigadores en plantilla pertenecientes a distintos OPIs y universidades de España. Así pues, en esta tercera edición se reunieron en torno a un centenar de inves-

tigadores nacionales, trabajando en distintos aspectos de la virología de plantas, junto a la presencia y participación de investigadores internacionales, como el Dr. Sébastien Massart (Universidad de Lieja, Bélgica) y la Dra. Rosa Lozano-Durán (Universidad de Tubinga, Alemania).

El objetivo de esta reunión presencial fue facilitar el contacto entre el mayor número de investigadores españoles, compartir novedades con los proyectos de investigación en marcha y estimular la comunicación entre los grupos, consolidando y creando nuevas relaciones de colaboración dentro de los grupos nacionales y con otros grupos internacionales que permitan un avance en el conocimiento en la virología de plantas. Para ello, la reunión contó con un programa científico que comprendía seis sesiones temáticas:

- Detección de virus y Epidemiología
- Ecología y evolución de virus
- Fuentes de resistencia viral
- Interacciones moleculares planta/virus/vector
- Control y mejora de virus de plantas
- Biotecnología basada en virus

(*Foto* oficial de los participantes al congreso, facilitada por el autor, Pedro Gómez).

Cada sesión estaba formada por una charla plenaria y sus correspondientes charlas específicas, habiéndose presentado un total de 62 comunicaciones (36 orales y 26 pósteres).

Toda la información detallada acerca del programa, libro de resúmenes de la reunión y participantes están disponibles en la página web de la Red Nacional de Virus de plantas.

Cabe destacar que se trata de una de las primeras reuniones postpandemia, que ha permitido restaurar las relaciones interpersonales entre investigadores, estudiantes y grupos, facilitando una mayor comunicación del conocimiento y el establecimiento de colaboraciones entre grupos. Así que, con el incremento en participantes, colaboraciones establecidas y excelente nivel de las comunicaciones científicas presentadas, se considera muy oportuno poder continuar con nuevas ediciones a corto-medio plazo.

15th *International Symposium of Plant Virus Epidemiology* ISPVE

Del 5 al 8 de junio de 2022
Madrid

Aránzazu Moreno Lozano
Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC)

Después de más de dos años sin reuniones presenciales, la decimoquinta edición del Congreso Internacional de Epidemiología de Virus de Plantas (15th *International Symposium of Plant Virus Epidemiology*; ISPVE) tuvo lugar del 5 al 8 de junio de 2022, en el campus central del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid. El ISPVE cuenta con más de 40 años de existencia, y su actual presidente es William Wintermantel

(USDA, Salinas, California, EE. UU.).

La organización del evento fue coordinada por el Dr. Alberto Fereres, profesor de investigación del Grupo de Insectos Patógenos de Plantas, del Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC, que contó con la colaboración del resto del comité de organización y el comité científico, en los que participaron otros socios de la SEF como los Dres. Aránzazu Moreno, Inmaculada Ferriol y Fernando García-Arenal.

El ISPVE 2022 contó con la participación de un total de 152 congresistas, procedentes tanto de instituciones de investigación públicas como empresas privadas de los cinco continentes, siendo, aproximadamente el 27 % de las inscripciones, de estudiantes.

El enfoque de la reunión en la edición de este año fue ampliar el alcance de la epidemiología de virus de plantas a otras enfermedades transmitidas por vectores (por ejemplo, enfermedades bacterianas) y reunir a personas que trabajan en diagnóstico, vigilancia y modelización, ecología y evolución, interacciones virus-vector y manejo de enfermedades en el contexto del cambio climático.

Se presentaron un total de 138 comunicaciones (77 presentaciones en panel y 61 presentaciones orales), destacando las siete ponencias invitadas por científicos de gran relevancia y prestigio internacional entre los que figuraban dos socios de la SEF, Dres. Fernando García-Arenal y Tomás Canto.

Además del programa científico, la reunión incluyó diversos actos sociales como el acto de bienvenida, celebrado en los jardines de la Residencia de Estudiantes del CSIC, un recorrido por el casco antiguo de Madrid o la cena de clausura. En todos ellos, los congresistas disfrutaron de una muy buena oportunidad, no solo para intercambiar información y establecer nuevas colaboraciones con sus compañeros, sino también de reencontrarse "cara a cara" con viejos y nuevos colegas, degustar la comida española y conocer más sobre Madrid, su cultura y sus alrededores.

Fue en uno de estos actos sociales, la cena de clausura, donde se entregaron los premios otorgados a la mejor presentación oral y a la mejor presentación en panel, presentadas por un estudiante, y que recayeron, respectivamente, en Ornella Chase, por la presentación oral titulada "In planta production of filamentous virus-like particles: insights into 3-D models of different sweet potato infecting viruses vectored by aphids or whiteflies", y en Oumaima Moubset, por el panel titulado "Virome release of an invasive exotic plant species in Southern France".

Además, según lo acordado en la Asamblea del ICPVE, se comunicó que la próxima sede en albergar este congreso será Sao Paulo (Brasil), y el simposio será organizado por el Prof. Joao Spotti Lopes, entre otros, en el año 2025.

Foto oficial de los participantes al congreso, facilitada por la autora.

Celebrada la III Reunión del Grupo Especializado SEF en «Control químico de enfermedades y desarrollo de resistencias a productos fitosanitarios»

8 de junio de 2022
Oleiros, A Coruña

José Díaz Varela
Departamento de Bioloxía
Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña

Dolores Fernández-Ortuño
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

FITORES
Control químico de enfermedades y desarrollo de resistencias a productos fitosanitarios

El pasado día 8 de junio tuvo lugar la III reunión del grupo «Control químico de enfermedades y desarrollo de resistencias a productos fitosanitarios», en el Hotel Noa en Santa Cruz (Oleiros, A Coruña).

Organizada por los miembros del grupo de Investigación FISAPLANT de la Universidade da Coruña, y actuando como presidente el profesor José Díaz Varela, acudieron expertos en la temática pertenecientes a distintas instituciones públicas y privadas, entre otros, Antonieta de Cal e Inmaculada Larena (INIA), David Ruano (ITACYL), Dolores Fernández-Ortuño, Laura Ruiz y Alejandra Vielba (Universidad de Málaga), Mónica Berbegal (UPV), Juan Antonio Martínez (UPCT) y, por último, Néstor Carrillo, Javier Veloso y José Díaz de la Universidade da Coruña; además de personal de empresas de fitosanitarios, como Productos CITROSOL, con Celia Murciano. Durante las diferentes presentaciones orales se trataron temas relacionados con la detección, diagnóstico y monitorización de las resistencias a fitosanitarios en enfermedades, causadas principalmente por hongos, en caqui, cítricos, cerezo, cucurbitáceas o pimiento, entre otros. Pinchando en el libro de resúmenes de la Reunión, se pueden consultar las temáticas tratadas.

En septiembre de 2016, la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) aprobó en Junta Directiva la creación de este grupo especializado, formado por científicos de universidades y organismos públicos de investigación, empresas del sector y otros expertos, procedentes de diferentes instituciones públicas y privadas de prestigio nacional e internacional. Hoy en día, el control químico es la herramienta más utilizada en la protección de los cultivos frente a los diferentes organismos fitopatógenos y,

III Reunión del Grupo Especializado SEF (*Foto,* cortesía de José Díaz Varela).

a través de este grupo especializado, se pretende establecer canales de comunicación con instituciones o sociedades (públicas y privadas) que tengan relación con el control químico de enfermedades; asesorarles como comités de expertos; generar foros específicos de discusión e intercambio de información científica; organizar reuniones-jornadas-simposios para estar al día sobre problemas de resistencia a los diferentes mecanismos de acción, registro de nuevos productos fitosanitarios, normativas y protocolos al respecto. Todo ello con la finalidad última de mejorar, en la práctica, la utilización sostenible de los fitosanitarios y la inclusión de estos compuestos químicos en los programas de lucha integrada contra plagas y enfermedades.

VI Jornadas Científicas de Estudiantes de la Sociedad Española de Bioestadística

Del 14 al 16 de septiembre de 2022
Burjassot, Valencia

Martina Cendoya
Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA)
Moncada, València

Las VI Jornadas Científicas de Estudiantes de la Sociedad Española de Bioestadística (SEB) se celebraron del 14 al 16 de septiembre de 2022 en la Facultad de Ciencias Matemáticas de la Universitat de València (UV). El objetivo de estas jornadas es visibilizar el trabajo de los estudiantes de máster y doctorado en el área de la Bioestadística, siendo una gran oportunidad para el intercambio de conocimientos y experiencias.

El evento contó con 50 participantes y un total de 30 contribuciones orales divididas en siete sesiones y una sección de pósteres. Las sesiones estuvieron enfocadas tanto al desarrollo de metodologías estadísticas como a su aplicación, abordándose diversas temáticas como salud, genética, biología y ecología, entre otras.

El programa científico incluyó un curso introductorio sobre inferencia bayesiana, impartido por Joaquín Martínez Minaya (Universitat Politècnica de València). Además, una mesa

redonda con María José Caballero (GVA), Elena Lázaro (IVIA), David Conesa (UV) y Antonio Vicent (IVIA) abrió el debate sobre el papel transversal de la estadística en la investigación científica. Se dedicó también una sesión especial a la historia de las jornadas, donde los organizadores de la primera edición compartieron cómo surgió esta iniciativa y cómo ha ido evolucionando, manteniendo su esencia inicial de un espacio creado por y para los estudiantes.

El comité científico y organizador estuvo formado íntegramente por estudiantes de la SEB, que contó con el apoyo tanto de la propia Sociedad como de la Facultad de Ciencias Matemáticas y el Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la UV.

La participación de miembros de la SEF en el comité organizador, ponencias orales y la mesa redonda materializa el objetivo de colaboración establecido en el convenio entre ambas Sociedades.

La organización agradece a todos los asistentes su contribución al éxito de estas jornadas.

Puede encontrarse más información sobre las jornadas pinchando aquí y en la imagen del libro de resúmenes de las comunicaciones presentadas.

Foto de grupo de las VI Jornadas Científicas de Estudiantes de la SEB (Cortesía del Comité organizador).

XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología

Del 24 al 26 de octubre de 2022
Valencia

Vicente Pallás
Presidente del Comité Organizador

Después de dos aplazamientos por razones obvias, se celebró en Valencia el XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), en el campus de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), del 24 al 26 de octubre de 2022.

El Congreso contó con un total de 359 asistentes. Las ponencias plenarias e invitadas tuvieron lugar en el salón de actos del edificio Nexus, mientras que las sesiones simultáneas se celebraron en los tres salones de la Ciudad Politécnica de la Innovación. En la organización, además del Comité Organizador y la Junta Directiva de la SEF, han colaborado la Oficina de Congresos, la Secretaría Técnica de Eventos, ambos de la UPV, y la empresa Global Comunica S.L. A destacar también el sustento del IBMCP, IAM e IVIA, además de 19 empresas patrocinadoras.

Acto de inauguración del XX Congreso de la SEF en el salón Nexus de la UPV (*Fotografía* de Carlos Gascó, con permiso).

La mesa presidencial del acto de inauguración del Congreso estuvo constituida por D.ª Belén Picó Sirvent (vicerrectora de Investigación de la UPV), D. Antonio Quintana Martínez (director general de Agricultura, Ganadería y Pesca; Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica) y D. Vicente Pallás Benet (presidente de la Sociedad Española de Fitopatología, SEF, y del Comité Organizador).

El Congreso estuvo precedido por el Simposio *Retos actuales del control químico de enfermedades: gestión de resistencias, aspectos regulatorios y uso sostenible*, organizado por el Grupo de trabajo de la SEF, Fitores, que tuvo una gran asistencia.

Tras la inauguración oficial del Congreso, la Dra. Angela Sessitsch (Austrian Institute of Technology, AIT, Viena) impartió una conferencia sobre el microbioma de plantas. Posteriormente, el Dr. Leandro Peña (IBMCP, CSIC-UPV, Valencia), nos habló de la situación actual de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos, para dar paso a cuatro presentaciones sobre amenazas emergentes en la agricultura española y mundial que constituyeron la sesión plenaria I.

El martes 25 de octubre se inició con la presentación a cargo de la Dra. Godelieve Gheysen (Universidad de Gante, Bélgica) quien nos habló de la posible consideración de los ne-

matodos como patógenos biotróficos o herbívoros. La segunda plenaria del día estuvo impartida por la Dra. Kristiina Mäkinen (Universidad de Helsinki, Finlandia) quien disertó sobre las potencialidades de proteínas relacionadas con los potyvirus en la mejora de la resistencia. Esta fue seguida por la ponencia invitada del Dr. Emilio Rodríguez-Cerezo, de la European Commission-Joint Research Centre (JRC, Sevilla), que versó sobre el estado de las nuevas técnicas de edición genómica como herramientas de mejora en el actual escenario, dando paso a la sesión plenaria II sobre Interacciones planta-patógeno.

El miércoles 26 se impartieron: la ponencia plenaria del Dr. Renaud Ioos (ANSES, Nancy, Francia) sobre la necesidad de implantar los laboratorios de referencia europeos, y en concreto del de hongos y oomicetos: y la ponencia de la Dra. Neus Teixidó (IRTA, Lleida), sobre las estrategias alternativas para el control de las podredumbres de postcosecha en fruta. Seguidamente, la Dra. Blanca Landa (IAS-CSIC, Córdoba) actualizó los esfuerzos colectivos que se están llevando a cabo para el manejo de la bacteria *Xylella fastidiosa* a nivel europeo, dando paso a la sesión plenaria III sobre Control de enfermedades. La Dra. Dolores Fernández-Ortuño (UMA, Málaga) impartió la ponencia invitada dedicada a la posibilidad de que los oligonucleótidos se conviertan en una alternativa a los fungicidas convencionales para el control de hongos fitopatógenos.

Además de todas estas ponencias plenarias e invitadas, se realizaron nueve sesiones simultáneas en diferentes temas, lo que permitió alcanzar la nada despreciable cifra de 66 presentaciones orales que, junto con los 250 pósteres, constituyeron un hito en las presentaciones de los congresos de nuestra Sociedad. Pueden consultarse accediendo al Libro de abstracts del Congreso.

La conferencia de clausura constituyó un cálido y merecido homenaje al Dr. Fernando García-Arenal, catedrático de Patología Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid y expresidente de la SEF (1996-2000), quien hizo un pormenorizado balance sobre su actividad investigadora y disertó sobre la evolución y emergencia de los virus y el control de las enfermedades causadas por estos.

Aspecto de una de las ponencias impartidas en el salón Nexus de la UPV (*Fotografía* de Carlos Gascó, con permiso).

Conferencia de Clausura del Prof. Fernando García-Arenal en el Auditorio Cubo azul de la Ciudad Politécnica de la Innovación de la UPV (*Fotografía* de Carolina Escobar, con permiso).

El Congreso finalizó con la cena de clausura, que tuvo lugar en el restaurante La Ferradura, en la playa de Valencia, donde, tras felicitar a los nuevos componentes de la Junta (Dra. Blanca Landa, presidenta; Dr. David Gramaje, tesorero; Dr. Pedro Gómez y Dra. Dolores Fernández-Ortuño, vocales) se entregaron los premios correspondientes a las distintas modalidades:

- Premios SEF de Relatos cortos (Fito-Relatos): David Ruano.
- Premios SEF de Fotografía Científica en Fitopatología "Miguel Cambra": Rafael Villar.
- Premio "Ricardo Flores", a la mejor presentación formato póster: Sandra Tienda; finalista, Félix Moran.
- Premio Phytoma-SEF, a la mejor presentación oral: Jonatan Niño; finalista, Manuel Anguita-Maeso.

Finalmente, me gustaría destacar y agradecer muy sinceramente la gran labor de los Comités Organizador y Científico, que han posibilitado que este Congreso haya sido un éxito de participación y de contenidos; y a la Junta de la SEF, su incansable estímulo, su valiosísima dedicación a nuestra Sociedad y su gratísima compañía en estos años pandémicos. Grandísimos compañeros. ¡Nos vemos en Córdoba!

Participantes del XX Congreso de la SEF celebrado en Valencia del 24 al 26 de octubre de 2022 (*Fotografía* de Carlos Gascó, con permiso).

Nuevas descripciones de Patógenos en España

octubre 2021 - septiembre 2022

Juan A. Navas-Cortés

NOTA INFORMATIVA:

Os recordamos la obligación de comunicar a la administración pública competente "...la aparición de organismos nocivos de los vegetales o de síntomas de enfermedad para los vegetales y sus productos, cuando no sean conocidos en la zona…", tal y como establece la Ley de Sanidad Vegetal (Ley 43/2002).

En consecuencia, y con anterioridad a la publicación de los resultados, los investigadores tienen la obligación de ponerse en contacto con el Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Autónoma correspondiente para informar de la detección de nuevos patógenos, si se trata de primeras citas en España.

Igualmente, se debe contactar con dichos servicios ante cualquier nueva detección de un organismo de cuarentena (aunque no sea primera cita en España); ante la duda, se recomienda consultar con estos servicios el posible estatus de organismo de cuarentena para el patógeno identificado.

HONGOS Y OOMICETOS

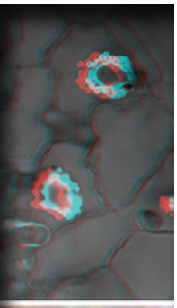
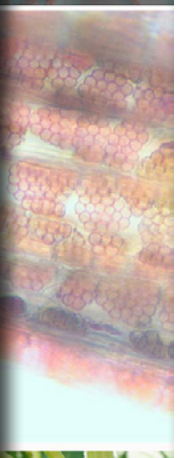
Two indigenous *Berberis* species from Spain were confirmed as alternate hosts of the yellow rust fungus *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*
Rodríguez-Algaba, J., Hovmøller, M. S., Villegas, D., Cantero-Martínez, C., Jin, Y. y Justesen, A. F.
Plant Disease **105**: 2281-2285 (2021).

First report of *Diaporthe amygdali* associated with twig canker and shoot blight of nectarine in Spain
García-López, M. T., Gordon, A., Raya, M. C., Díez, C. M. y Moral, J.
Plant Disease **105**: 3300 (2021).

First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing crown canker of almond in Spain
Muñoz, R. M., Lerma, M. L., Castillo, P., Tolosa, V. M., Olmo, D., Trapero, A. y Agustí-Brisach, C.
Journal of Plant Pathology **104**: 411-412 (2022).

First report of *Sardiniella urbana* (Botryosphaeriaceae) causing decline of *Celtis australis* in Mallorca Island (Balearic Islands, Spain)
Pintos-Amengual, Á., Stchigel, A. M y Cano-Lira, J. F.
Plant Disease **105**: 3748 (2021).

First report of Verticillium wilt and mortality of *Ailanthus altissima* caused by *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum sensu lato* in Spain
Moragrega, C., Carol, J., Bisbe, E., Fabregas, E. y Llorente, I.
Plant Disease **105**: 3754 (2021).

Etiology of septoria leaf spot of pistachio in southern Spain
López-Moral, A., Agustí-Brisach, C., Raya-Ortega, M. C., Lovera, M., Trapero, C., Arquero, O. y Trapero-Casas, A.
Plant Disease **106**: 406-417 (2022).

Survey of oomycetes associated with root and crown rot of almond in Spain and pathogenicity of *Phytophthora niederhauserii* and *Phytopythium vexans* to 'Garnem' rootstock
Beluzán, F., Miarnau, X., Torguet, L., Armengol, J. y Abad-Campos, P.
Agriculture **12**: 294 (2022).

First report of *Neofusicoccum parvum* causing canker on *Castanea sativa* in Spain
Ciordia, M., Loureiro, M. D. y González, A. J.
Plant Disease **106**: 1299 (2022).

First report of *Colletotrichum chrysophilum* causing apple bitter rot in Spain
Cabrefiga, J., Pizà, D., Vilardell, P. y Luque, J.
Plant Disease **106**: 1752 (2022).

First report of *Pleurostoma richardsiae* associated with twig and branch dieback of olive trees in Spain
Calvo-Peña, C., Burgos, M., Diez-Galán, A., Ibáñez, A., Coque, J. J. R. y Cobos, R.
Plant Disease **106**: 1981 (2022).

***Fusarium annulatum* causes Fusarium rot of cantaloupe melons in Spain**
Parra, M. Á., Gómez, J., Aguilar, F. W. y Martínez, J. A.
Phytopathologia Mediterranea **61**: 269–277 (2022).

First report of *Hymenoscyphus fraxineus* causing ash dieback in Spain
Stroheker, S., Queloz, V. y Nemesio-Gorriz, M.
New Disease Reports **44**: e12054 (2021).

Diversity of sooty blotch and flyspeck fungi on cider apples in Spain
Batzer, J. C., Prado, M. M., Svendsen, J. M. y Gleason, M. L.
PhytoFrontiers **2**: 289-306 (2022).

New reports of *Phytophthora* species in plant nurseries in Spain
Mora-Sala, B., León, M., Pérez-Sierra, A. y Abad-Campos, P.
Pathogens **11**: 826 (2022).

First report of *Gnomoniopsis smithogilvyi* causing chestnut brown rot on nuts and burrs of sweet chestnut in Spain
Aguín-Casal, O., Rial-Martínez, M. C., Piñón-Esteban, P., Sainz, M. J., Regueira-Paz, N., Vázquez, J. P. M. y Corral, C. S.
Plant Disease, First look [25 de mayo de 2022, 0322]

Occurrence of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* species on woody ornamentals in public gardens and parks in northwestern Spain
Pintos-Varela, M. C., Rial-Martínez, C., Esteban, M. P. P., Salinero-Corral, C. y Aguín-Casal, O.
Plant Health Progress, First look [2 de septiembre de 2022, 0008]

Molecular characterization of *Peronospora variabilis* isolates infecting *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium album* in Spain
Fondevilla, S., Arias-Giraldo, L. F., García-León, F. J. y Landa, B.
Plant Disease, First look [3 de octubre de 2022, 1198]

BACTERIAS

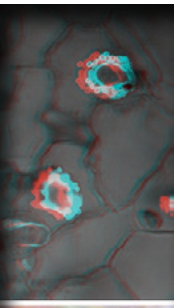
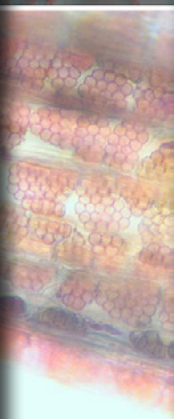
First report of bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* on carrots in Spain
Palomo, J. L., Shima, M., Monterde, A., Navarro, I., Barbé, S. y Marco-Noales,
Plant Disease **105**: 2712 (2021).

Evidence that *Xylella fastidiosa* is the causal agent of almond leaf scorch disease in Alicante, mainland Spain (Iberian Peninsula)
Marco-Noales, E., Barbé, S., Monterde, A., Navarro-Herrero, I., Ferrer, A., Dalmau, V., Aure, C. M., Domingo-Calap, M. L., Landa, B. B. y Roselló, M.
Plant Disease **105**: 3349-3352 (2021).

NEMATODOS

A new needle nematode, *Longidorus maginicus* n.sp. (Nematoda: Longidoridae) from southern Spain.
Liébanas, G., Clavero-Camacho, I., Cantalapiedra-Navarrete, C., Guerrero, P., Palomares-Rius, J. E., Castillo, P. y Archidona-Yuste, A.
Journal of Helminthology **96**: e40, 1-13 (2022).

A proposed new species complex within the cosmopolitan ring nematode *Criconema annuliferum* (de Man, 1921) Micoletzky, 1925.
Criconema paraaanuliferum sp. nov. and *Criconema pseudoannuliferum* sp. nov.
Clavero-Camacho, I., Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Castillo, P., Liébanas, G. y Archidona-Yuste, A.
Plants **11**: 1977 (2022).

VIRUS Y VIROIDES

First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting cucumber plants in Spain
Chynoweth, R., Jimenez, D., Liberti, D., Bellon-Dona, D., Carralero-González, A., Crespo-Sempere A. y Albiach-Marti, M.R.
Plant Disease **105**: 2258 (2021).

First report of *Passiflora edulis symptomless virus* in pomegranate in Spain
Canales, C., Morán, F., Candresse, T., Olmos A. y Ruiz-García, A. B.
Journal of Plant Pathology **103**: 1375 (2021).

First report of *Cactus virus X* in Spain
Janssen, D., Garcia, C. y Ruiz, L.
Australasian Plant Disease Notes **17**: 4 (2022).

First detection and molecular characterization of *Apple stem grooving virus, Apple chlorotic leaf spot virus,* and *Apple hammerhead viroid* in loquat in Spain
Canales, C., Morán, F., Olmos, A. y Ruiz-García, A. B.
Plants **10**: 2293 (2021).

First report of *Apium virus Y* in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) in Spain.
Babalola, B. M., Faure, C., Marais, A., Fraile, A., Garcia-Arenal, F. y Candresse, T.
New Disease Reports **45**: e12097 (2022).

First report of *Schlumbergera virus X* in dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Spain
Janssen, D., García, C. y Ruiz, L.
Plant Disease **106**: 2004 (2022).

First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting watermelon and zucchini in the Canary Islands, Spain
Alfaro-Fernández, A., Espino de Paz, A. I., Botella-Guillén, M., Font-San-Ambrosio, I., Sanauja, E., Galipienso, L. y Rubio, L.
Plant Disease **106**: 2006 (2022).

First report of *Carrot torradovirus* 1 (CaTV1) naturally infecting carrots in Spain
Babalola, B. M., Faure, C., Marais, A., Fraile, A., Garcia-Arenal, F. y Candresse, T.
Journal of Plant Pathology, First look [19 de agosto de 2022, 01196].

Una de las novedades del Congreso de la SEF previo a la pandemia (Toledo, 2018), fue convocar, por primera vez, un concurso de relatos breves relacionados con la Fitopatología, en la que pudieran participar todos los socios, con el objeto de incentivar la divulgación de la Fitopatología. La segunda edición se ha retrasado hasta 2022; y, así, durante el XX Congreso de la SEF, que tuvo lugar en Valencia, se entregó un premio de 300 euros al fito-relato ganador. El jurado estuvo compuesto por miembros de la Junta Directiva de la SEF y eligió como mejor relato el presentado por David Ruano Rosa, titulado "El libro de Abu", que aquí publicamos.

El libro de Abu

—Abu, Abu, despierta, tienes visita —susurraba Aixa mientras lo zarandeaba con delicadeza.

Ibn al-Awwam[1], conocido por todos en Sevilla como Abu Zaccaria, vivía en una modesta casa en los arrabales, en la que había sustituido el patio que daba entrada a la vivienda, por un huerto al que le gustaba llamar, junto con sus heredades del Aljafe, «la zona de experimentación». Era allí donde a menudo realizaba sus observaciones y experiencias que luego gustaba plasmar en sus manuscritos.

—Pero... ¿qué hora es? Si ni siquiera ha amaneci... —En ese momento Aiab irrumpió en el interior de la única estancia. Gritaba y maldecía.

—¡Abu! ¡El mal se ha apoderado de nuevo de mis tierras! —Aiab era bajito y grueso, muy grueso. Sudaba por todos los poros de su piel y le faltaba el aliento—. Sin duda alguna esto es obra de Faisal. No soportaba que mis plantas fueran mejores que las suyas, sobre todo desde que me trajeron esas semillas de Damasco. Acuérdate, que hasta el año pasado mis plantas eran un palmo más altas que las suyas. Es el segundo año, ¿sabes? ¡El segundo año! El año pasado las plantas que daban a su terreno murieron unas semanas después de nacer, y este año esa «mancha» se ha extendido como el aceite en el agua. Quiero, necesito, que vengas cuanto antes y descubras qué clase de maleficio ha usado.

—Aiab, cálmate, deja al menos que me vista. Realizaremos el Fajr[2] y partiremos a tus tierras cuanto antes. —En ese momento Aiab tomó conciencia de que Abu estaba medio desnudo, sentado en la cama, con los ojos cegados por la luz del candil, lo cual hizo que se ruborizara y saliera rápidamente al patio.

Unos instantes después ya estaban en la puerta de la casa, camino de las tierras de Aiab. Estas se encontraban cerca del río Guadalquivir, en una zona protegida de las crecidas, pero con suficiente humedad para soportar los veranos austeros de Sevilla. Sin duda alguna, eran las mejores de la ciudad.

Como bien decía Aiab, sus espinacas siempre fueron la envidia de todos los vecinos, y las más cotizadas en el mercado. Hasta el año anterior. Es cierto que las nuevas semillas dieron lugar a una muy buena cosecha, mejor que las anteriores, pero recordaba haber visto una zona, allá donde se hundía levemente el terreno, en la que las plantas no llegaron a desarrollarse del todo, dejando en el cultivo unas calvas sin mucha importancia. Abu veía una clara relación en el uso de esas semillas nuevas con la aparición del problema, solo que Aiab era obstinado y prefería echar la culpa a maldiciones y malas artes.

—Las plantas comenzaron a marchitarse, pensé que podía ser por falta de riego, por lo que eché más agua. Cuando empezaron a amarillear dejé de regar. —Se agachó a coger una planta y se la acercó a Abu.

Era evidente el exceso de agua en el terreno, pero, sin duda alguna, algo más ocurría ya que, mientras que el exceso de humedad era generalizado, el problema quedaba limitado a una zona del mismo. Las plantas más desarrolladas estaban marchitas y algo amarillentas y presentaban una clara ausencia de raíz principal, compensada con mayor proliferación de raíces secundarias, mientras que otras se habían tornado marrones y con aspecto algo gelatinoso que llegaba hasta el mismo cuello de la planta.

—¡Es mi perdición, Abu! ¡Mi perdición! —Aiab levantaba los brazos y miraba al cielo rezando para ahuyentar el supuesto mal—. Dime, ¿qué puedo hacer?

—No desesperes, Aiab, juntos buscaremos solución a este problema. Hace unos días me dijeron que Abdel había vuelto de su viaje al norte cargado con multitud de cosas y, entre ellas, un carro entero de libros y pergaminos que podrían sernos de mucha ayuda. —Abu se mostraba muy ilusionado con lo que se podría encontrar en ese carro, no tanto Aiab.

—¿Libros? ¡Por Alá, Abu! ¿Qué pretendes que haga con libros? ¿Los quemo para ahuyentar los malos espíritus? ¿Los troceo y me los como? ¡Necesito soluciones, no libros! —gritaba mientras se agachaba a coger plantas para acercárselas a Abu.

—Escucha, Aiab, los libros están llenos de soluciones. Hay muchos eruditos por todo el mundo que escriben sus conocimientos, y eso puede ayudarnos a identificar el problema y atajarlo con mayor rapidez. —Abu iba aumentando el tono de voz ya que veía cómo Aiab se marchaba quejándose y haciendo incontables aspavientos, hasta que lo perdió de vista en un huerto de naranjos cercano a la orilla del río.

A su vuelta a Sevilla, Abu pasó por el zoco de intramuros, cercano a la mezquita de Ibn Adabbas. Abdel tenía una tiendecita en la zona de la alcaicería que destinaba a venta de objetos elaborados en seda, aunque también comerciaba con libros y pergaminos que conseguía en el norte de la península, principalmente de los monasterios cristianos de las ciudades conquistadas años atrás durante el Califato de Córdoba. Otros los compraba en sus viajes a Damasco.

—¡Querido Abu! ¿Qué te trae a mi tienda? —preguntó Abdel mientras se acercaba a la puerta para recibirlo.

—¡Amigo Abdel!, toda Sevilla habla de tus nuevos productos. No sé si sabrás que Aiab está teniendo problemas con sus espinacas, en la parte que linda con los terrenos de Faisal, y me ha pedido ayuda. Algunos de los textos que pude comprarte de tu último viaje me han sido de gran ayuda. ¡Es increíble la información que pude obtener! Sin ir más lejos, en *Agricultura Nabathea*[3] encontré el remedio para un problema que afectaba a mis vides. Sus hojas estaban rojas y de aspecto débil —Abdel, como buen comerciante, lo miraba con cara de interés mientras pensaba en dónde iba a colocar las sedas que le habían llegado en su ausencia—. Pues eso se conoce como "calamidad de las estrellas" y el remedio es untar la vid con aceite, vino y agua, cocido y bien caliente. Es por eso que se me ocurrió que, entre los libros que has traído, podría encontrar algo que arroje algo de luz a este asunto.

Abdel cogió un candil y llevó a Abu entre pasillos atestados de sedas hasta un cuartucho de escasa luz, pero bien reservado de la humedad donde apilaba multitud de manuscritos de todo tipo.

—Créeme, Abu, deberías unir todas esas experiencias que desarrollas en Aljafe a la información que obtienes de estos manuscritos. Escribe un gran libro, el cual pueda ser utilizado por otros de igual modo que tú usas estos textos —comentaba Abdel mientras le iba poniendo entre las manos multitud de libros.

Entre los documentos que Abdel le iba entregando, Abu encontró un manuscrito del cordobés Aben Náser, en el que recomendaba, para algunos males que asolan los huertos, dejar sin cultivar la tierra o cambiar de cultivo unos ciclos, con el fin de interrumpir la continuidad de dicho mal. Fue así como Abu le pidió a Aiab, sin mucho éxito, que dejara descansar aquellos terrenos durante un tiempo o sustituyera sus espinacas por otro cultivo que pudiera serle rentable.

—¡Tú me quieres buscar la ruina! ¡Mis espinacas son las más cotizadas de toda Sevilla! —le gritó haciendo sus aspavientos habituales y marchándose enojado.

El tiempo hizo que Aiab diera su brazo a torcer y, a regañadientes, cambió sus espinacas por berenjenas, consiguiendo que fueran las más codiciadas del mercado. Sin embargo, eso no evitó que denunciara a su vecino alegando que había envenenado sus tierras. También evitó traer semillas de tierras lejanas, pero solo por si acaso.

En lo que respecta a Abu, decidió hacer caso a Abdel y recopilar todo el conocimiento sobre agricultura que durante siglos se había ido acumulando en al-Ándalus, al que añadió tanto sus experiencias como aquellas recogidas en los textos a los que conseguía tener acceso. Así fue como surgió *Kitab al-Filaha*[4], o quizá no, pero de lo que no hay duda es que llegó a convertirse en el texto de mayor relevancia de la agricultura árabe en España, conocido por todos sus contemporáneos como *El libro de Abu*.

Por David Ruano-Rosa

Unidad de Cultivos Leñosos y Hortícolas
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Valladolid

[1] Sevilla, finales del s. XII – principios s. XIII, conocido como Abu Zaccaria. Prestigioso agrónomo andalusí de época almohade.

[2] Primer rezo del día, antes del amanecer.

[3] Texto de Ibn Wahshiyya de Qussīn que compila los conocimientos agronómicos de la época (siglo X) en el actual Irak.

[4] *Kitab al-Filaha* o *Libro de agricultura*, es un tratado escrito por Abu Zaccaria entre el s. XII-XIII, que compila técnicas y conocimientos agrícolas de al-Ándalus en el que, junto con los conocimientos adquiridos por el propio autor, se incluyen multitud de referencias, entre otras, a textos geopónicos orientales, occidentales y africanos de gran relevancia tales como *Agricultura nabathea* o *Almokna*.

Premio SEF de Fotografía Científica en Fitopatología "MIGUEL CAMBRA"

En el marco del XX Congreso SEF celebrado el pasado mes de octubre en Valencia, tuvo lugar la concesión del «Premio SEF en Fotografía Científica en Fitopatología "Miguel Cambra"».

La fotografía ganadora, resultado de una votación de los asistentes al Congreso y premiada con 300 euros, la presentó Rafael Villar Moreno, estudiante de doctorado FPU, que trabaja en el IHSM-UMA-CSIC / Universidad de Málaga.

Título: ***Fluorescent Battlefield***

Interacción entre dos cepas de *Pseudomonas chlororaphis*, aisladas de la rizosfera de árboles de aguacate, con actividades beneficiosas para la planta y capacidad de control biológico frente a hongos fitopatógenos. En la foto vemos a ambas cepas crecidas en medio de cultivo rico TPG (triptona-peptona-glicerol) con un 0,5 % de agar para fomentar la movilidad tipo *swarming*. Podemos observar cómo ambas emiten diferente fluorescencia bajo luz UV, lo que es debido a la distinta capacidad de producción de pigmentos fluorescentes (Imagen tomada en la Universidad de Málaga, edificio IHSM-UMA-CSIC).

IN MEMORIAM

Antonio Gómez Barcina (1932-2022)

Por Pablo Castillo
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC)
Córdoba

En enero de 2022 nos dejó Antonio Gómez Barcina, uno de los padres de la Nematología española y una persona generosa, de ideas claras y una calidad humana excepcional. Antonio fue investigador científico del CSIC, doctor en Veterinaria por la Universidad de Madrid, y ha dedicado su carrera científica al estudio de los nematodos fitoparásitos en diversos cultivos agrícolas, particularmente los cultivos de solanáceas, y los cultivos tropicales y subtropicales de la costa granadino-malagueña. El Dr. Gómez Barcina inició su actividad científica como estudiante de grado en el Departamento de Zoología del Suelo y Entomología Aplicada de la Universidad de Madrid. En 1963, se incorpora al Centro Experimental Económico-Agrario La Mayora hasta 1979. En este Centro realiza su tesis doctoral titulada *Especificidad y distribución geográfica de nematodos fitoparásitos de la zona costera de Málaga y Granada*, bajo la dirección del Prof. D. Fernando Jiménez Millán. En 1971, Antonio fue elegido director del Centro Experimental La Mayora y promovió la conversión del Centro (en el marco de un programa de cooperación hispano-alemán) en la Estación Experimental "La Mayora" del CSIC, y actualmente siendo centro mixto CSIC-UMA, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-CSIC). En este Centro promovió proyectos y programas de investigación muy importantes para la agricultura de Andalucía, como los relativos al cultivo del fresón y los cultivos tropicales y subtropicales. Durante este periodo, en 1973, continuó su especialización en Nematología con una estancia postdoctoral en la Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Inglaterra, sobre diagnóstico y control de nematodos fitopatógenos. Entre 1979 y 1981, fue investigador de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) en Granada, y en 1981 se traslada al Instituto López-Neyra de Parasitología, dirigiendo el Centro hasta 1989, e iniciando la reestructuración del centro y el relanzamiento de las principales líneas científicas en Parasitología animal y vegetal. Desde 1989 hasta 1995, se incorpora al Centro IFAPA Camino de Purchil, en Granada, y desde 1995 hasta su jubilación en 2002, queda adscrito al Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) en Córdoba.

Antonio fue redactor jefe de la *Revista Ibérica de Parasitología*, revista oficial de la Asociación Española de Parasitólogos, y ha sido uno de los pioneros y promotores de la Nematología Agraria en España y en Andalucía, y ha formado a varios nematólogos como los Dres. Juana Artero Maurandi, Reyes Peña Santiago y Pablo Castillo. Ha publicado más de 100 artículos científicos referenciados, y capítulos de libro y una monografía, incluyendo líneas de investigación en diagnóstico, patogenicidad y control de nematodos fitoparásitos. Asimismo, Antonio ha participado en numerosas comisiones científicas, entre las que podemos destacar las de vocal Junta de Gobierno Patronato "Alonso Herrera", vocal Comisión Conjunta de Ciencias Agrarias CSIC-MEC, miembro Comisión Mixta, INIA-CSIC. Sin ninguna duda, Antonio ha sido uno de los principales promotores y miembros activos de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), habiendo ostentado el cargo de vicepresidente y presidente de la SEF, así como de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología (ALF).

Antonio Gómez Barcina, junto a colegas y amigos nematólogos en el I Congreso de la SEF en Granada, 1982.

(*Fotografías proporcionadas por el autor*)

Antonio ha sido probablemente uno de los miembros de la SEF con mayor actividad y colaboración en la organización de congresos y reuniones de la SEF, habiendo organizado en 1982 el I Congreso fundador de la SEF en Granada. En 1987, Antonio pasaría a los anales de la SEF superando de forma excepcional el doble reto de la organización del VII Congress of the Mediterranean Phytopathological Union en conjunción con el V Congreso de la SEF, con más de 300 congresistas y más de 200 trabajos presentados. Ese año, marcó un gran hito en la organización de Congresos en la SEF, quedando en nuestra memoria para siempre la excepcional visita nocturna a la Alhambra de Granada, la visita a las Alpujarras, y la excepcional gastronomía andaluza (con excepción del "inolvidable" concierto de guitarra en el Carmen de los Mártires). Además, bajo la presidencia de Antonio en la SEF, se promovieron y firmaron varios convenios marco entre la SEF y diversas Consejerías de Agricultura de Comunidades Autónomas de España, acercando la SEF a los problemas reales del sector agrario. Como especialista en Nematología Agrícola, impartió varios cursos de doctorado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y en 1987 fue director del primer curso específico de Parasitología en colaboración con el Colegio Oficial de Veterinarios de Granada y la Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. En mayo de 1992 volvió a repetir con éxito el doble reto de organizar el VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología, y el VII Congreso de la SEF en Torremolinos compitiendo con numerosos eventos desarrollados en España ese año. En este Congreso, siendo Antonio presidente de la SEF, se instauró el Premio SEF-Phytoma, que tiene como objetivo apoyar la investigación y divulgación de los conocimientos en el área de la Fitopatología en España. En los últimos años, era Socio de Honor de la SEF.

Además de todo esto, Antonio tenía dos grandes pasiones que no escondía, su magnífica familia (su mujer, Jean; y sus tres hijos, Javier, Susana y Daniel), y sus innumerables y grandes amigos que elogiaba continuamente y de los que se sentía muy orgulloso, y permitidme que lo cuente, su Real Madrid, que le divertía y servía de tema de debate con sus amigos.

En definitiva, Antonio fue un destacado científico en su especialidad, y un crítico y provocador en su tiempo (enemigo de la burocratización y papanatismo del sistema de I+D). Pero, sobre todo, fue una persona excepcional y un amigo que nunca falla; usando sus mismas palabras, Antonio era y lo será para siempre "un cinco estrellas" en todos sus sentidos. Y aunque es difícil expresar con palabras, los que tuvimos la fortuna de conocerle y tratarlo personalmente, pudimos comprobar su buen talante y su alegría constante y contagiosa, que siempre hacía que las cosas más difíciles parecieran mucho más tolerables. Entre sus muchas enseñanzas, siempre recordaremos el arte de la amistad sincera, con un trato tan cercano, cariñoso y humano que tenía con todos los que le rodeaban sin ninguna distinción de rangos o niveles de responsabilidad; siempre recordaremos sus bromas constantes y su sonrisa alegre, que nos hacía más felices a su lado.

Hasta siempre, querido Antonio ….

Antonio Gómez Barcina, junto a colegas y amigos en el XI congreso de la Mediterranean Phytopathological Union, en Évora, Portugal, 2001.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (SEF)

Dpto. de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).
Ctra. de La Coruña Km 7,5, Madrid-28040.

Teléfono: 913 364 532 / 918 373 112
sef@sef.es // www.sef.es

ISSN (digital): 2659-2975

Socios protectores de la SEF:

Coordinadores de la revista:

Nieves Capote Maínez / Carmen Hernández Fort

Colaboradores de este número:

Manuel Anguita
Adrià Bugeda
Nieves Capote
Pablo Castillo
Martina Cendoya
José Antonio Daròs
José Díaz Varela
Dolores Fernández-Ortuño
Inmaculada Ferriol
Pedro Gómez
Blanca B. Landa
Juan José López-Moya
Aránzazu Moreno
Juan Antonio Navas
Vicente Pallás
Fernando Ponz
Jorge Poveda
Sara Rincón
Lee Robertson
David Ruano
Soledad Sacristán
Francisco Tenllado
Daniel A. Truchado
Rafael Villar
Lucía Zurita

Miembros de la Junta directiva de la SEF:

Presidente: Vicente Pallás
Vicepresidente: Carolina Escobar
Secretaria: Aránzazu Moreno
Tesorero: Francisco Cazorla

Vocales: Nieves Capote
Carmen Hernández
Diego Olmo
Soledad Sacristán
Antonio Vicent

Edición y coordinación:

Alicia Irurzun (Editorial Hélice)
Alberto Aguilera 13, 4º izda.
28015 Madrid. Tlf: 91 548 11 90

Diseño y maquetación:

Antonio V. Robles
Tlf: 675 651 107

Página web:

Antonio Vicent y Diego Olmo

La responsabilidad del contenido de las colaboraciones aquí publicadas corresponderá a sus autores, quienes autorizan la reproducción de sus artículos e imágenes a la SEF exclusivamente para esta revista. La SEF no hace necesariamente suyas las opiniones o los criterios expresados por sus colaboradores.

***© Sociedad Española de Fitopatología, 2022**. Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.*

PORTADA: Virus de plantas y elementos derivados de virus, como herramientas en aplicaciones biotecnológicas.

Tiras de fotos en páginas 58 a 61, procedentes de los socios de la SEF:

- *Phytophthora capsici* [Juana Páez, 11/9/2012]
- Moteado en hoja de níspero (*Fusicladium eriobotryae*) [SEF, 3/10/2012]
- Mildiu del girasol causada por el oomiceto *Plasmopara halstedii* [M. Leira Molinero, 22/1/2013]
- Interacción patógeno-planta en 3D. SEF-Phytoma 2012 [Jesús Martínez, 22/1/2013]
- Como hormigas al hormiguero. SEF-Phytoma 2012 [Marta Sena, 22/1/2013]
- Esporangios de *Phytophthora palmivora* [Cristina R. Padrón, 22/1/2013]
- Sección de pseudoteca de *Didymella rabiei* [J. Navas, 4/10/2012]
- *Polymyxa betae* en remolacha [P. García-Benavides e I. Ortega, 11/9/2012]
- *Aspergillus* en naranja [Paloma Sánchez Torres, 28/9/2012]
- Pimiento infectado por el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) [C. Muñoz, 3/10/2012]
- Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en *Pyracantha coccinea* [Jesús Murillo, 12/9/2012]

Los créditos de las imágenes del índice pueden verse en sus respectivos apartados.