



BOLETÍN INFORMATIVO

Número 93 • marzo 2016

www.sef.es

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA

- **Entrevista**
- **Actualidad**
- **Másters y Cursos**
- **Actidades de los Socios**
- **Publicaciones SEF**
- **Nuevos Patógenos**
- **Reuniones y Congresos**

EL ARTÍCULO DEL BOLETÍN

**CRISPR/Cas9 COMO HERRAMIENTA EN EL
CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS**

SUMARIO

EDITORIAL

3 **NOVEDADES**

ACTUALIDAD

4 **ENTREVISTA: JULIO J. DíEZ CASERO**

11 **UNA LLAMADA A LA SENSATEZ... Y A LA NECESIDAD DE APRECIAR Y VALORAR LA EVIDENCIA CIENTÍFICA SOBRE *XYLELLA FASTIDIOSA***

CURSOS DE ESPECIALIZACIÓN Y MÁSTER

14 **MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL**

14 **PLANTHEALTH – EUROPEAN MASTER DEGREE IN PLANT HEALTH IN SUSTAINABLE CROPPING SYSTEMS ROYECTO PATHOGEN**

14 **MASTER EN SANIDAD VEGETAL - 4ª EDICIÓN**

ACTIVIDADES DE LOS SOCIOS

TESIS DOCTORALES

15 **DIEGO OLMO GARCÍA.** Etiología y control de las enfermedades fúngicas de la madera del almendro en la isla de Mallorca. IVIA-UPV, Valencia

19 **ANTONIO VICENE SANZ ROS.** Influence of biotic and abiotic factors on health status of pine forests in northern Spain. ETSIIAA, Campus Palencia, Universidad de Valladolid

22 **YAZMÍN MÓNICA LANDEO RIOS.** Estudio del mecanismo de acción y efecto sinérgico de la proteína supresora de silenciamiento p22 del crinivirus Tomato chlorosis virus. IHSM-UMA-CSIC

26 **CAROLINA MARTÍNEZ MONCAYO.** Virus del moteado de la parietaria (PMoV): mecanismos de interacción del virus con la planta y caracterización de aislados virales. IRTA-Cabrils, Barcelona, IBMCP, UPV-CSIC, Valencia) e IVIA, Valencia

30 **JAIME CARRASCO CARRASCO.** Study of cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum* in Spanish mushroom crops. ETSIAM, Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha

34 **JAVIER CABRERA CHAVES.** Gene expression reprogramming during the formation of feeding sites induced by plant endoparasitic nematodes. Universidad de Castilla-La Mancha

39 **CLARAMONTESINOSHERRERO.** Evaluation of alternatives to synthetic fungicides to control citrus postharvest diseases. IVIA, Valencia

LIBROS Y PUBLICACIONES

41 **PUBLICACIONES SEF**

NUEVAS DESCRIPCIONES DE PATÓGENOS EN ESPAÑA

44 **HONGOS Y OOMICETOS**

45 **BACTERIAS**

45 **VIRUS Y VIROIDES**

45 **NEMATODOS**

REUNIONES Y CONGRESOS

46 **5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASES**

46 **1ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FIRE BLIGHT OF ROSACEOUS PLANTS**

46 **8TH IOBC/WPRS WORKING GROUP: INTEGRATED PROTECTION IN OAK FORESTS**

46 **3RD HEMIPTERAN-PLANT INTERACTIONS SYMPOSIUM**

DISPARATES FITOPATOLÓGICOS

47 **DISPARATES FITOPATOLÓGICOS**

EL ARTÍCULO DEL BOLETÍN

48 **CRISPR/CAS9 COMO HERRAMIENTA EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS** por Sarah B. Lade y Vicente Medina

Novedades BOLETÍN Y WEB SEF

Queridos Soci@s:

Os presentamos un nuevo número del Boletín en plena explosión de la primavera de 2016 con información muy diversa que esperamos os pueda interesar

En la sección de actualidad incluimos una interesante entrevista a nuestro compañero Julio J. Díez Casero, Presidente del Comité Organizador del próximo Congreso SEF en septiembre de este año en Palencia en la que nos comenta las principales novedades del congreso y de la ciudad de Palencia, sede del congreso. En esta misma sección incluimos un artículo de opinión sobre la situación actual de Xylella fastidiosa en Italia y la compleja situación judicial en que se encuentran una decena de investigadores involucrados en el estudio de este problema en la zona. El artículo del Boletín está dedicado a un tema de plena actualidad en Virología vegetal cuidadosamente elaborado por Sarah B. Lade y Vicente Medina, Grupo "Interaccio Planta-Microorganismo-Vector" (IMPLAMIC) y centro AGROTECNIO Universidad de Lleida.

Además, se incluyen como viene siendo habitual los nuevos patógenos descritos en España entre enero y abril de 2016. Una edición más resulta especialmente extensa la sección de reseñas de Tesis Doctorales, que es fruto del buen hacer de nuestros socios en la formación de nuevos investigadores, enhorabuena a todos los nuevos nuev@s Doctor@s y sus Director@s.

Además, encontraréis información sobre Cursos de especialización y Máster, así como una relación de congresos y reuniones que organizan nuestros socios. Se omite la información relativa al listado de próximos Congresos que podréis encontrar completa y actualizada en la web-SEF. En el apartado de libros como ya sabéis únicamente se incluyen las publicaciones de la SEF, podréis encontrar una relación extensa y actualizada de libros de reciente publicación en la web-SEF. Además, desde Phytoma nos animan a conocer la edición digital de su revista.

Como siempre agradecemos todas vuestras aportaciones de material para la elaboración del Boletín y os animamos a que sigáis enviando toda aquella información que pueda ser de interés para nuestra sociedad como Tesis, cursos, reseñas de congresos a los que habéis asistido, etc.

L@s Editor@s

LA ENTREVISTA DEL BOLETÍN

JULIO JAVIER DÍEZ CASERO

Nuestro compañero y socio de la SEF es el Presidente del Comité organizador del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología que se celebrará en Palencia del 20 al 23 de septiembre de 2016.

Julio J. Díez Casero es Catedrático de Universidad en el Departamento de Protección Vegetal y Silvopascicultura en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Valladolid, Campus de Palencia.



Julio J. Díez Casero, Presidente del Comité organizador SEF 2016

¿Qué motivos te impulsaron a presentar a Palencia como sede del XVIII congreso de la SEF?

El congreso de la SEF es nuestro preferido, y llevamos asistiendo a él desde hace casi 20 años. Durante las últimas citas hemos presentado la candidatura varias veces, ya que nos apetecía organizarlo en Palencia, para dar la oportunidad a que la conocieseis. Por ello, vamos a poner todo nuestro interés en organizar este evento con detalle, intentando desarrollar un buen congreso aprovechando la experiencia de nuestros predecesores.

En los anteriores congresos ha habido una alternancia entre distintas ubicaciones distribuidas por los puntos cardinales de la península. El XVIII Congreso SEF en Palencia es el segundo desarrollado en la

comunidad de Castilla y León, después del del año 1998 en Salamanca; ya nos tocaba.

Por otra parte, la ciudad de Palencia, y por extensión Castilla y León, es una zona de marcado carácter agrícola tanto por superficie como por historia, destacando los cultivos de cereal y los viñedos, así como otros importantes cultivos extensivos. Además, la ciudad alberga desde hace años no solo la formación agrícola, sino también la formación forestal, alimentaria y enológica, en nuestra Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (ETSIIAA).

¿No te preocupó la situación de incertidumbre económica por la que atravesamos?

Pues sí,...nos lo pensamos un poco antes de decidirnos. A todos nos

preocupa la situación económica que estamos pasando, pero haremos todo lo que esté en nuestras manos para que esto no afecte al congreso. Confiamos por una parte, que los patrocinadores con los que ya estamos contactando se impliquen en su desarrollo, y por otra parte, que los participantes tengan en cuenta que para llegar a Palencia no hacen falta grandes desplazamientos: Palencia se encuentra situada a dos horas de Madrid, y la reciente llegada del AVE, que tarda una hora y cuarto desde Madrid, también facilitará la llegada de los asistentes. Por cierto, hemos negociado con RENFE precios especiales para los congresistas, lo que facilitará su llegada.

La comunidad científica, con especial incidencia en los jóvenes investigadores, se ha visto castigada durante los últimos años con una reducción en el presupuesto investigador inaceptable. Pero, confiamos pese a ello contar con un buen número de participantes en esta XVIII edición del congreso.

¿Cómo se ha planteado el congreso por parte del comité organizador?

El comité organizador se planteó desde el primer momento una integración del congreso en el centro de la ciudad de Palencia. La idea es hacer un congreso cercano, embebido en la propia ciudad. Por ello, nada más conocer nuestra nominación, nos pusimos en contacto con los diversos organismos locales y provinciales (Ayuntamiento de Palencia y Diputación) para gestionar las ubicaciones de las distintas sedes, que se han seleccionado en el centro geográfico de la ciudad: (1) el Teatro Principal, donde se desarrollarán las sesiones plenarias, (2) el edificio de la Diputación Provincial, y (3) la sala de usos múltiples de Abilio Calderón. La idea es dejar poder disfrutar de la ciudad sin tener que usar transporte público, ni pagar costosos taxis. Nuestro palacio de congresos será el casco viejo de la ciudad de Palencia.



Fachada del Teatro Principal de Palencia en que tendrán lugar las Sesiones Plenarias



Interior del Teatro Principal de Palencia en que tendrán lugar las Sesiones Plenarias

Por otro lado el comité organizador ha optado por contratar una empresa para la secretaría técnica, ya que a pesar de contar con cierta experiencia en la organización de otros congresos, o reuniones científicas, la magnitud e importancia del XVIII Congreso SEF merecía una especial atención. La empresa elegida ha sido Evento, que cuenta con experiencia reconocida y demostrada en la organización de numerosos congresos de carácter científico tanto nacional como internacional.

Asimismo, como señalamos anteriormente, estamos en plena campaña de búsqueda de financiación para sufragar el máximo posible de gastos y conseguir que el evento resulte viable minimizando el impacto en los participantes. Para ello, en estos momentos se están negociando diversos aspectos relacionados con el desarrollo del congreso (alojamiento, manutención...), con el fin de facilitarles el trabajo a los congresistas, y con la finalidad de optimizar los recursos disponibles.

En esta ocasión, el Congreso tendrá varias sedes, ¿Nos puedes explicar cuáles serán y porque finalmente se decidió esta opción?

El congreso se realizará en tres edificios colindantes y a efectos prácticos no es más complejo, ni más lejano que cuando se organiza en un palacio de congresos, o en un campus. Los desplazamientos son de corta distancia y en un par de minutos se alcanza cualquiera de las salas. Las ubicaciones elegidas han sido seleccionadas por su calidad y como señalamos anteriormente, tienen como punto central el Teatro Principal de Palencia (donde se desarrollarán las sesiones plenarias), la sala de juntas de la Diputación de Palencia, y la sala de congresos del edificio Abilio Calderón (también de Diputación). Se trata de edificios históricos ubicados en el mismo centro de Palencia, con la idea de integrar el congreso en la vida de la ciudad.



Fachada de la Diputación Provincial de Palencia en que tendrán lugar Sesiones Simultáneas

El Teatro Principal se ha elegido como sede principal por su capacidad para albergar a más de cuatrocientos participantes, mientras que las otras dos salas tienen una capacidad de 100 a 250 personas, suficiente capacidad para albergar las sesiones simultáneas.

En el programa del congreso se continúa apostando por los cambios que comenzaron a introducirse en el anterior Congreso en Lleida como su duración y la celebración de simposios previos al inicio del congreso. ¿Pero cuáles son las novedades que presenta este Congreso?

Los cambios en la organización del congreso en cuanto a su distribución vienen determinados por las experiencias anteriores, y por un consenso entre el comité organizador y el comité científico (la directiva de la SEF),

atendiendo en la medida de lo posible a la opinión expresada por los participantes de ediciones anteriores en la encuesta que llevó a cabo la SEF hace unos meses. Seguimos manteniendo los tres días de duración, más un cuarto día de viaje de campo. Con respecto a los simposios se llevarán a cabo dos, uno sobre la enfermedad causada por *Xylella fastidiosa*, y otro sobre inmunidad en plantas, en la mañana del primer día. En esta edición, hemos tenido que ajustar la duración de las sesiones del congreso al mínimo de días, pero tratando de mantener el número de comunicaciones que se han llevado a cabo en otros congresos, como bien han expresado los miembros de la SEF a través de la encuesta. Por ello, hemos tenido que sacrificar la mesa redonda que tradicionalmente se desarrollaba en este congreso, para dar mayor protagonismo a las sesiones orales.

ENTREVISTA



Catedral de Palencia



Museo Diocesano



Calle Mayor



Iglesia de San Miguel



Puente Mayor

Imágenes: <http://spaciolibre.com/destino-palencia>

En esta edición se ha apostado por un número importante de ponencias invitadas tanto de ponentes españoles como extranjeros de áreas diversas de la Fitopatología, ¿cómo ha sido la selección de los ponentes?

Como en el resto de la organización del congreso, la selección ha sido por consenso entre el comité organizador y el comité científico. Hemos tratado de seleccionar ponentes con una gran trayectoria y una dilatada carrera científica, que estuvieran trabajando en temas actuales. Además, se ha intentado dar cabida a las diversas áreas de la fitopatología. Creemos firmemente que el número de ponencias invitadas es adecuado, y que en general presentan un interés general para todos los asistentes al congreso. Se han programado siete conferencias plenarias invitadas de los siguientes investigadores: Mike Wingfield (FABI, Sudáfrica), Maria Saponari (Institute for Sustainable Plant Protection, Bari, Italia), Thomas Gordon (University of California at Davis), Sophien Kamoun (The Sainsbury Laboratory), Ricardo Flores (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia), Antonio de Vicente (Universidad de Málaga) y Mariano Cambra (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias).

¿Cómo están respondiendo las entidades locales, autonómicas y estatales respecto al apoyo al congreso?

Desde el momento que les comunicamos la nominación de Palencia como sede para el XVIII Congreso SEF, las entidades locales (Ayuntamiento de Palencia, y Diputación de Palencia) han mostrado un gran interés en colaborar, manifestando un notable entusiasmo por la celebración de este evento.

Hay que destacar su disposición a cedernos las sedes del congreso, sin importarles cambiar incluso los calendarios (con actividades ya previstas para el Teatro Principal) para poder encajar nuestro congreso. Con respecto a las entidades autonómicas y

estatales, esperamos un apoyo decidido al evento, como ya lo hemos tenido para otros organizados anteriormente.

¿Y las empresas del sector?

Hemos contactado con numerosas empresas del sector en busca de patrocinio. Por ahora tenemos el apoyo de algunas de ellas, pero necesitamos un apoyo decidido de un mayor número para poder desarrollar un buen congreso. Esperamos este apoyo de las empresas nacionales y también de alguna internacional con la que estamos contactando. A lo largo de los años algunas han patrocinado tradicionalmente los congresos de la SEF y confiamos que sigan haciéndolo y aquellas que no lo han hecho perseveraremos para que aporten en la medida de sus posibilidades.

El viernes, cómo ya es habitual en nuestros Congresos, están previstas dos excursiones técnicas. ¿Qué destacarías de los lugares que se van a visitar?

Para esta edición está prevista una visita a pinares afectados por decaimiento que presentan una gran mortalidad, y a viñedos de la zona, con los tradicionales problemas fitosanitarios del cultivo. La idea es llevar a cabo la visita técnica a la Ribera del Duero, donde en la parte lúdica podremos disfrutar de una cata de vinos, y de una comida en las bodegas especializadas en enoturismo de la zona.

¿Qué aspectos de la ciudad y alrededores no nos podemos perder durante nuestra estancia en Palencia?

La ciudad de Palencia es una ciudad pequeña que puede recorrerse fácilmente a pie y donde podemos descubrir un sinfín de joyas arquitectónicas, destacando entre otras la catedral a la que se nombra como "La Bella Desconocida", las iglesias de San Miguel, San Lazaro, etc. o el Cristo del Otero. Asimismo, existen varios museos y exposiciones para visitar, y todo ello cerca de las sedes del congreso. Tenemos además otros atractivos propios de una ciudad pequeña y tranquila:

Palencia es la segunda ciudad de España en superficie de zonas verdes, después de Vitoria. Para aquellos que quieran ir un poco más lejos (como los acompañantes) existen opciones para visitar en la provincia: el canal de Castilla y sus impresionantes esclusas, la villa romana de La Olmeda, San Martín de Frómista, así como un rico patrimonio de románico del norte de la provincia (el denominado País Románico). Para los que quieran disfrutar del paisaje, pueden acercarse al Cerrato Palentino (la Toscana española), en el sur de la provincia, o a la montaña Palentina en el norte, a la que se llega atravesando las llanuras de nuestra famosa Tierra de Campos. La información detallada al respecto se facilitará a los asistentes tanto en el congreso como a través de la página web.

Y para finalizar, ¿Qué consejos te gustaría transmitir a los socios a poco más de medio año para la celebración del congreso?

Es nuestra intención que el congreso sea lo más provechoso posible desde el punto de vista científico y lo más agradable posible desde el punto de vista personal. En la parte científica, vamos a tratar de dar una participación a todos los grupos, que como en los últimos congresos volverán a poner de manifiesto el alto nivel en el que se encuentra la fitopatología en España. Recomendaríamos a todos los socios que no pierdan la ocasión de participar en nuestro congreso, por esto y porque creemos firmemente que merece la pena conocer nuestra ciudad.

Palencia sorprende al viajero, tanto por lo desconocido de sus tesoros artísticos, como por la variedad y belleza del paisaje, como por la calidez de sus gentes. Y todo esto vamos a tratar de transmitirlo al congreso. “Tienes que venir a Palencia SEF 2016, que no te lo cuenten”



Una llamada a la sensatez... y a la necesidad de apreciar y valorar la evidencia científica sobre *Xylella fastidiosa*

La devastación de olivares en la Apulia italiana causada por la enfermedad denominada ‘Decaimiento Súbito del olivo’, que fue detectada por primera vez en Octubre del año 2013 y con la cual está asociada una estirpe específica de una bacteria de cuarentena en la Unión Europea denominada *Xylella fastidiosa*, concretamente la subespecie *pauca*, ha causado un notable impacto en los Sectores Oleícola y de la Sanidad Vegetal en España por las potenciales repercusiones que podrían tener lugar en caso de que se produjera la introducción de dicha bacteria en nuestro país.

Tras la primera detección de la bacteria en Italia, la UE estableció acciones legislativas de obligado cumplimiento que dieron lugar a la puesta en marcha de medidas para contener su expansión más allá de la zona de primera detección, e impedir que pudiese ser dispersada a otras zonas oleícolas en la UE mediante la distribución de material vegetal infectado. Al mismo tiempo, un grupo de investigadores del CNR de Bari liderado por los Drs. Boscia y Saponari inició un esforzado programa de investigación fitopatológica, merecedor de nuestro aplauso y admiración, que determinó la naturaleza específica y el genoma de la bacteria causal antes indicada, desarrolló un protocolo para el diagnóstico molecular de ella, e identificó los insectos chupadores de xilema que propician la diseminación y transmisión de la misma. Todo ello en un tiempo récord, digno de elogio, para los que al compartir profesión en la investigación fitopatológica con los colegas italianos, somos experimentados conocedores del esfuerzo en tiempo y recursos (personales y monetarios) que requiere poder completar tales logros científicos. Los resultados referidos han sido publicados en revistas fitopatológicas internacionalmente reconocidas, tras ser sometidos al proceso de revisión por pares anónimos que confiere convicción a la investigación científica y sostiene el avance del conocimiento sobre problemas como el que nos ocupa, y la significación de los mismos ha sido reconocida por sus colegas y propiciado que hayan sido recogidos como

noticia de impacto por la revista Nature, una de las revistas científicas de mayor prestigio a nivel mundial.

Sin embargo, a pesar de dicho reconocimiento, los Drs. Boscia y Saponari, junto con otros cinco investigadores y tres responsables del Servicio de Protección Vegetal de la Región de Apulia, se están viendo sometidos a un proceso de investigación por la Fiscalía de Lecce, como consecuencia de la acusación no documentada por parte de organizaciones medioambientalistas, de ser responsables de la introducción de la bacteria en Italia con ocasión de un Curso Internacional que tuvo lugar en el Instituto Agronómico Mediterráneo de Bari (IAMB) en el año 2010. Este proceso fiscal sigue a otro que fue desestimado hace meses, después de que se demostrara que la estirpe de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* identificada en los olivos afectados en la Apulia es idéntica a la detectada en plantaciones de cafeto en Costa Rica, país desde el que durante los últimos años se han producido repetidas introducciones de la bacteria en plántones de cafeto importados en varios países de la UE. Además, los Drs. Boscia y Saponari (que no pertenecen al IAMB ni participaron en ese Curso Internacional) y otros investigadores inculcados han informado documentalmente que la estirpe de la bacteria utilizada en el Curso del IAMB era originaria de vid en California y pertenece a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* no patogénica de olivo pero sí de vid. La inculcación por la Fiscalía



Olivo severamente afectado por el Decaimiento Súbito asociado a infecciones por la bacteria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* en la provincia de Lecce (Península de Salento, Italia) Foto BB Landa & JA Navas

contiene otro aspecto desconcertante porque manifiesta una clara contradicción lógica: mientras que por un lado los magistrados desestiman que la información científica disponible sostenga la existencia de una verdadera relación causal entre la bacteria y el Decaimiento Súbito del olivo, por otro acusan a los investigadores de haber propiciado la diseminación de la bacteria en la Apulia. Por tanto, no se acierta a comprender la base en la que se fundamenta la acusación: ¿se les acusa de diseminar una bacteria que no es la causa de la muerte de los olivos que caracteriza a la enfermedad?

Además del injusto proceso inculpatario al equipo investigador, la Fiscalía de Lecce ha ordenado la inmediata paralización de las medidas de contención que se venían aplicando en las zonas olivareras afectadas y próximas en la Apulia, medidas cuya oportunidad está refrendada por el conocimiento científico y cuya interrupción abre todas las posibilidades para propiciar la expansión geográfica de la bacteria a toda Europa. Mientras tanto, la UE ha iniciado procedimientos contra Italia por infringir la legislación vigente y causar retrasos en la ejecución del plan de contención contra esta enfermedad.

En este escenario, no tenemos duda alguna de que *X. fastidiosa* subsp. *pauca* será actor ganador entre todos los actores implicados en este asunto y de que Italia tendrá que pagar sanciones a la UE. Y lo más desalentador es que, como ha ocurrido muchas veces en la historia de la ciencia, pasará más de una década para que se ofrezcan disculpas públicas a los investigadores que han hecho sus deberes y realizado su trabajo de forma rigurosa, “dejándose la piel” en ello.

Como ocurriera anteriormente, el proceso inculpatario abierto por la Fiscalía de Lecce ha sido recogido por la revista *Nature* y el periódico *The Washington Post* del 23 de diciembre de 2015, y contra él se han pronunciado, en apoyo inequívoco de los investigadores italianos, la Asociación de Sociedades de Agronomía de Italia junto con diversas Sociedades Fitopatológicas de España, los EE UU y la UE. Además, el contenido de la noticia en inglés ha sido difundido repetidamente en España mediante textos online. Desafortunadamente, estos textos no se han ajustado suficientemente al original por la extensión y contenido traducido, y parecen haber sido tomados de fuentes no del todo precisas. Todo ello ha dado lugar a interpretaciones incorrectas del hecho,

ha incrementado la preocupación generada por la noticia en nuestro país, y ha contribuido a sembrar dudas sobre la actuación rigurosa de los investigadores italianos. Por otro lado, 2 años después de la identificación de la bacteria en la zona de Gallipoli (provincia de Lecce, Apulia), la enfermedad del olivo y lo que la rodea son objeto de tertulias, comentarios y debates en las calles, bares y redes sociales de Salento, en las que se postulan un número inimaginable de teorías conspiratorias que van desde la intencionalidad de compañías multinacionales para promover la venta de sus productos pesticidas, la implicación de la mafia, los intereses inmobiliarios, etc. Confiemos en que estas especulaciones no lleguen a recibir ni siquiera el crédito de algunos oídos en nuestro país, tan receptivos últimamente a noticias de la prensa sensacionalista.

Desde nuestro punto de vista, los hechos que relatamos son un ejemplo más de

la insuficiente penetración del conocimiento científico que todavía persiste en la sociedad actual, en contraposición con la desconcertante disposición a dar valor a la opinión sostenida por la emoción o los sentimientos, pero carente de soporte factual. Desalienta constatar como continúa produciéndose lo que sabiamente advirtiera Bertrand Russell hace más de 50 años "... cuando estudiemos o consideremos cualquier tema preguntémonos únicamente cuales son los hechos y cuál es la verdad que revelan, y nunca dejemos que nos desvíe lo que deseamos creer o lo que más nos pueda beneficiar si así fuese creído...". Las instituciones educativas, las sociedades científicas y los organismos públicos de investigación tienen todavía un largo trecho por recorrer para propiciar que la ciencia permee la sociedad y las decisiones para afrontar los problemas que amenazan nuestro bienestar se basen en el conocimiento y no en las opiniones.

Blanca B. Landa del Castillo y Juan A. Navas Cortés (Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), CSIC; Córdoba). **María Milagros López** (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia). **Rafael M. Jiménez Díaz** (IAS-CSIC y ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Córdoba).



Vista de un olivar devastado por el Decaimiento Súbito asociado a infecciones por la bacteria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* en la provincia de Lecce (Península de Salento, Italia). Foto: B.B. Landa

MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL**Fechas: 2016 y 2017****Preinscripción: 1 febrero a 30 abril de 2016,
y 18 de mayo a 30 junio de 2016****INFORMACIÓN: http://www.etsia.upm.es/master_biotechnology****PlantHealth – European Master Degree in PLANT HEALTH IN SUSTAINABLE CROPPING SYSTEMS****Fechas: 2016 y 2017****Preinscripción: 16 de diciembre de 2015 a 16 marzo de 2016****INFORMACIÓN: <http://www.planthealth.upv.es>****MÁSTER EN SANIDAD VEGETAL - 4ª EDICIÓN****Fechas: 2016 y 2017****Preinscripción: 1 de mayo a 10 de junio de 2016****Matrícula: 1 a 20 de julio de 2016****INFORMACIÓN: <http://mastersanidadvegetal.es>**



Diego Olmo García

Ha defendido el día 8 de enero de 2016 en la Universitat Politècnica de Valencia (UPV) su Tesis Doctoral titulada: “Etiología y control de las enfermedades fúngicas de la madera del almendro en la isla de Mallorca”, realizada bajo la dirección del Dr. Josep Armengol Fortí (Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV) y el Dr. David Gramaje Pérez (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino de La Rioja). El tribunal estuvo compuesto por el Dr. Antonio Trapero Casas (Universidad de Córdoba), la Dra. Paloma Abad Campos (UPV), y el Dr. Jordi Luque Font (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries de Cabrils). La Tesis recibió la calificación de Sobresaliente Cum Laude por unanimidad.



El autor junto al tribunal y directores de la Tesis Doctoral. De izquierda a derecha: Jordi Luque, Josep Armengol, Diego Olmo, Antonio Trapero, David Gramaje y Paloma Abad

El almendro es uno de los principales cultivos de Mallorca. Desde el año 2008, en parcelas de diferentes zonas de la isla se ha constatado la presencia de síntomas de decaimiento de ramas y muerte de almendros, que recuerdan en gran medida a los que diferentes autores han descrito en otras zonas del mundo causados por hongos patógenos de la madera en diversos cultivos (Figura 1). Para estudiar la etiología de esta problemática se realizaron prospecciones en parcelas de

almendros distribuidas en las principales comarcas de cultivo de la isla durante seis años consecutivos (2009-2014). En estas prospecciones se caracterizaron los síntomas y se tomaron muestras que se analizaron en laboratorio. Los síntomas observados frecuentemente fueron: clorosis foliar, decaimiento generalizado y muerte de ramas, que se asociaban con síntomas internos en la madera, tales como: necrosis sectoriales, punteaduras y anillos oscuros en la zona

vascular o presencia de madera esponjosa (Figura 2). En los análisis de laboratorio se obtuvieron 14 especies fúngicas de muestras de almendro: *Collophora hispanica*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iraniano*, *Phellinus pomaceus*, *Pleurostomophora richardsiae* y dos especies encontradas sólo en muestras de una parcela de albaricoqueros situada junto a parcelas de almendros: *Pm. minimum* y

Pm. venezuelense. Entre las especies identificadas en almendro, *C. hispanica* y *Pm. amygdalinum* son dos nuevas especies fúngicas que han sido descritas a partir de aislados obtenidos en las prospecciones realizadas. Las especies más frecuentes en las parcelas de almendro estudiadas fueron *P. richardsiae* y *D. seriata*, seguidas por las otras especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae y por *C. hispanica*. Las especies que se aislaron con mayor frecuencia, fueron a su vez las que tuvieron una distribución más amplia; presentes en más comarcas.



Figura 1. Síntomas externos de clorosis de hojas, seca de brotes, decaimiento, marchitez y colapso de ramas, asociados a hongos de la madera en almendro

Posteriormente, se estudió la patogenicidad a almendro de algunas de las especies detectadas. Concretamente, se realizaron dos ensayos de patogenicidad, el primero de ellos se llevó a cabo durante dos años consecutivos (2013 y 2014) con las cinco especies de Botryosphaeriaceae (*D. olivarum*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*) y las dos de Diatrypaceae (*E. lata* y *E. leptoplaca*) aisladas en las prospecciones, que se inocularon en árboles de 1 a 2 años de cuatro variedades diferentes de almendro ('Jordi', 'Ferragnes', 'Pons' y 'Vivot')

plantados en una parcela experimental. El ensayo se evaluó transcurridos 9 meses desde la inoculación, midiendo la longitud total de las necrosis internas producidas. En este primer ensayo se demostró la patogenicidad a almendro de las siete especies que se ensayaron. Las especies que causaron las lesiones de mayor longitud fueron *N. luteum* el primer año de ensayo, y *N. parvum* y *N. mediterraneum* el segundo año. En ambos años, la especie que causó las lesiones de menor longitud fue *E. leptoplaca*. Además, se observó que la dimensión de la lesión producida por el



Figura 2. Corte transversal de una rama de almendro en la que se observan síntomas de necrosis sectorial y puntos necróticos.



Figura 3. Necrosis interna en almendros de la variedad 'Ferragnes' causada seis meses después de la inoculación con cuatro aislados de *C. hispanica*: Col-1 (1), Col-3 (2), Col-8.4.2 (3) y Col-9.1.6 (4); 2 aislados de *Pm. amygdalinum*: Psp-2 (5) y Psp-3 (6); un aislado de *Pm. iranimum*: Pir-1 (7); 4 aislados de *P. richardsiae*: Pri-2 (8), Pri-9.2 (9), Pri-1.3 (10) y Pri-6.2.1.2 (11); y el control con PDA (12).

hongo inoculado dependía de la variedad de almendro evaluada. En general, la variedad 'Jordi' fue la menos sensible el primer año de estudio, y 'Vivot' y 'Ferragnes' lo fueron el segundo año. En el segundo ensayo se estudió la patogenicidad de las especies *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranimum* y *P. richardsiae* en plántones de almendro de la variedad 'Ferragnes' en invernadero. En este caso, la evaluación se realizó a los seis meses de la inoculación, igualmente midiendo la longitud de las lesiones necróticas internas. Todas las especies inoculadas resultaron patógenas a almendro, siendo *P. richardsiae* la especie que causó la mayor longitud de lesión (Figura 3). Finalmente, se realizó un estudio de evaluación de fungicidas para la protección de heridas de poda frente a la infección por cuatro especies de Botryosphaeriaceae (*D.*

seriata, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*). Este estudio se llevó a cabo en dos fases; en primer lugar, una evaluación in vitro (reducción del crecimiento micelial) con diez fungicidas y, posteriormente, una evaluación de cinco de estos fungicidas, elegidos entre los más efectivos in vitro, aplicándolos en heridas de poda uno o siete días tras el corte y la inoculación. Como en los casos anteriores, para evaluar este estudio se midió la longitud de la lesión, pero además también se calculó el porcentaje de reaislamiento del patógeno inoculado en cada caso. Los fungicidas tebuconazol y piraclostrobin, seguidos de ciproconazol y metil tiofanato, se mostraron como los más efectivos en la evaluación in vitro, mientras que el fungicida más efectivo para la protección de heridas de poda fue el metil tiofanato.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Olmo, D., Armengol, J., León, M., Gramaje, D. 2014. Pathogenicity testing of lesser-known fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees. *European Journal of Plant Pathology* 143: 607-611.

Olmo, D., Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., León, M., Armengol, J. 2014. First report of *Phaeoacremonium venezuelense* associated with wood decay of apricot trees in Spain. *Plant Disease* 98: 1001.

Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., U. Damm, Armengol, J. 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* 28: 2012: 1-13.

Antonio Vicente Sanz Ros



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Influence of biotic and abiotic factors on health status of pine forests in northern Spain” en la Universidad de Valladolid. ETS Ingenierías Agrarias, Campus La Yutera, Palencia, Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Laboratorio de Patología y Entomología Forestales que se ha llevado a cabo bajo la dirección del Dr. Julio J. Diez Casero (Universidad de Valladolid) y la tutoría del Dr. Michael M. Müller (Natural Resources Institute, Finland). El tribunal estuvo constituido por los doctores Elena Hidalgo Rodríguez (Universidad de Valladolid), Fernando Manuel Álvés Santos (Universidad de Valladolid), Ana Pérez Sierra (Forest Research, Forestry Commission UK), Oscar Santamaría Becerril (Universidad de Extremadura) y María del Carmen Morales Rodríguez (Universidad de Múnich, Alemania). La Tesis recibió la calificación de Sobresaliente *Cum Laude* con Mención Internacional.



De izquierda a derecha: Ana Pérez Sierra, Antonio V. Sanz Ros, Julio J. Diez Casero, Oscar Santamaría Becerril, María del Carmen Morales Rodríguez, Elena Hidalgo Rodríguez, Fernando Manuel Álvés Santos

La sanidad forestal puede ser definida como un estado en el que la influencia biótica y abiótica (plagas, polución, tratamientos selvícolas, etc.) no amenacen los objetivos de manejo presentes y futuros. Esta Tesis trata de la influencia de los factores bióticos y abióticos en el estado

sanitario de los pinares en el norte de España, prestando especial atención a los factores a los que las masas de pino están sometidos de forma habitual, incluyendo el clima, suelo y características del rodal, y como componente biótico los habitantes ya presentes en los tejidos internos de los

árboles y su relación con sus hospedantes, los pinos. Los objetivos fueron: 1) Identificar los factores bióticos y abióticos que influyen en el estado sanitario de las masas de pino del norte de España; 2) Evaluar los daños más representativos y su comparación, tanto cualitativa como cuantitativamente, entre parcelas de *Pinus nigra*, *P. sylvestris* y *P. pinaster* en el norte de España, así como averiguar si el uso de esta información podría resultar útil como criterio que ayude a la decisión del uso de estas especies en futuras repoblaciones forestales en la zona; 3)

Explorar las relaciones entre la condición de copa y los parámetros climáticos a largo plazo, y contribuir al conocimiento de cómo estos parámetros influirán bajo escenarios futuros de cambio climático; 4) Identificar los factores de sitio que afectan a la condición de copa en rodales de pino carrasco (*Pinus halepensis* Mill.) en decaimiento; 5) Caracterizar la comunidad fúngica endófito de ramillos de *Pinus sylvestris* L., y determinar si la estructura de esta comunidad está relacionada con su tasa de crecimiento; y 6) Estudiar la influencia de los factores de sitio, incluyendo parámetros

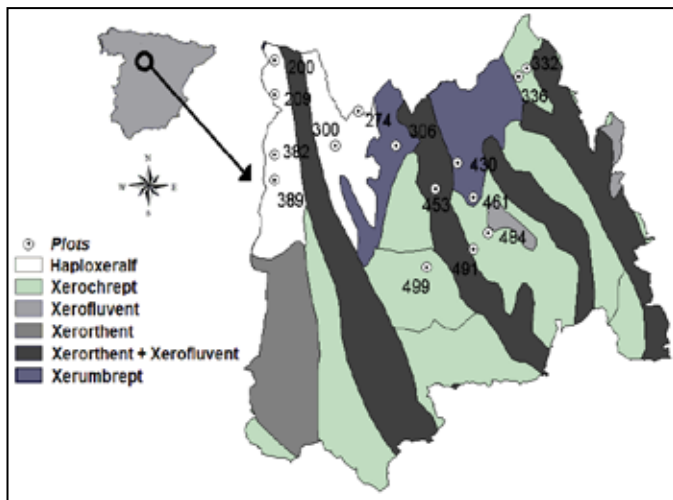


Figura 1. Localización de la zona de estudio, mostrándose las parcelas y los tipos de suelo

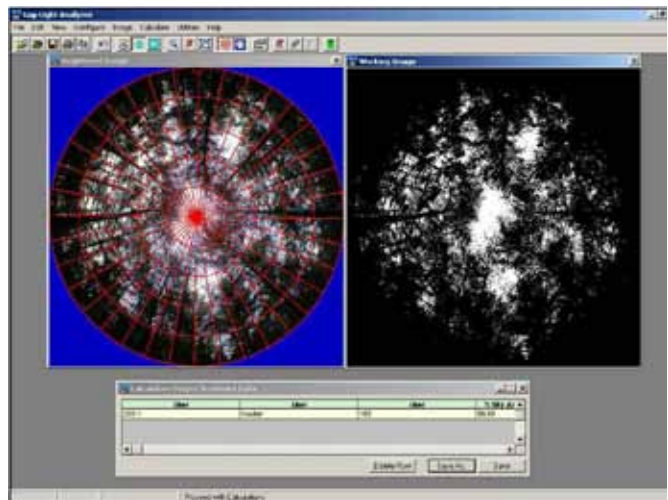


Figura 2. Análisis algorítmico de una fotografía hemisférica del dosel

climáticos, edáficos y dasométricos (del rodal), en la distribución de organismos endófitos de *P. sylvestris* (Figura 1). La Tesis consta de cinco estudios o capítulos, cuyas líneas generales son descritas a continuación.

El capítulo I se centra en los tipos de daños más frecuentes que nos podemos encontrar en los pinares de la zona de estudio, incluyendo *Pinus nigra*, *P. pinaster* y *P. sylvestris*. Es importante conocer esta información para llevar a cabo una correcta evaluación sanitaria de las masas y al mismo tiempo ver cuáles son los parámetros más apropiados para cuantificar el estado del dosel arbóreo. Los daños encontrados fueron principalmente defoliación, decoloración y bifurcaciones, siendo la defoliación el indicador que parece más adecuado para la evaluación de las masas, ya que es observable en todas

las parcelas y reproducible en su evaluación, siempre que se sigan los criterios y métodos descritos (Figuras 2, 3).

El capítulo II trata sobre la influencia de los factores climáticos en la condición de copa de los pinares. La condición de copa fue evaluada a lo largo de un gradiente climático, lo cual nos permite comparar dicho estado con el clima a largo plazo existente en cada punto. Se ha observado que existe una influencia de este clima a largo plazo en la condición de copa, de modo que pequeños aumentos de las temperaturas medias o reducciones de las precipitaciones medias provocan aumentos considerables de la defoliación, lo cual nos sugiere que la condición de copa podría empeorar bajo escenarios de cambio climático.

En el capítulo III se aborda la influencia

DE LOS SOCIOS

de las características del rodal sobre el estado sanitario de pinares en decaimiento, tomando como sistema de referencia la especie *Pinus halepensis*. En este caso, además de la cuantificación de la defoliación, fue usado un método óptico para la evaluación del índice de área foliar como medida del desarrollo de la copa. Se observó que hay ciertos parámetros que influyen en la condición de copa, como son la edad, la altura de copa, el área basimétrica y la elevación. La presencia de organismos patógenos primarios y secundarios en esta zona, junto con las pobres condiciones del suelo, la sequía y los parámetros del rodal, los cuales están directamente influenciados por el manejo que se hace de éste, son los factores que se discuten para intentar describir el proceso observado del decaimiento del pino carrasco, que viene produciéndose desde hace bastantes años en el norte de España para sugerir líneas de gestión con el fin de minimizar el impacto

del decaimiento.

El capítulo IV trata sobre los organismos endófitos que habitan en los tejidos vegetales y su relación con el hospedador, en este caso el pino silvestre (*P. sylvestris*). Se estudió la diversidad y equitatividad de la comunidad fúngica endófito, así como su composición de especies y abundancia en árboles con diferentes tasas de crecimiento, para dilucidar si existía alguna diferencia en la comunidad fúngica endófito. Se observaron diferencias entre árboles que crecen rápido y los que crecen lento en cuanto a la composición de especies fúngicas, su abundancia y la equitatividad de su distribución, sin embargo no fueron encontradas diferencias en su diversidad. Ciertos hongos endófitos fueron asociados a altas o a bajas tasas de crecimiento, lo cual hace interesante su estudio para evaluar cuales son los mecanismos por lo que estos

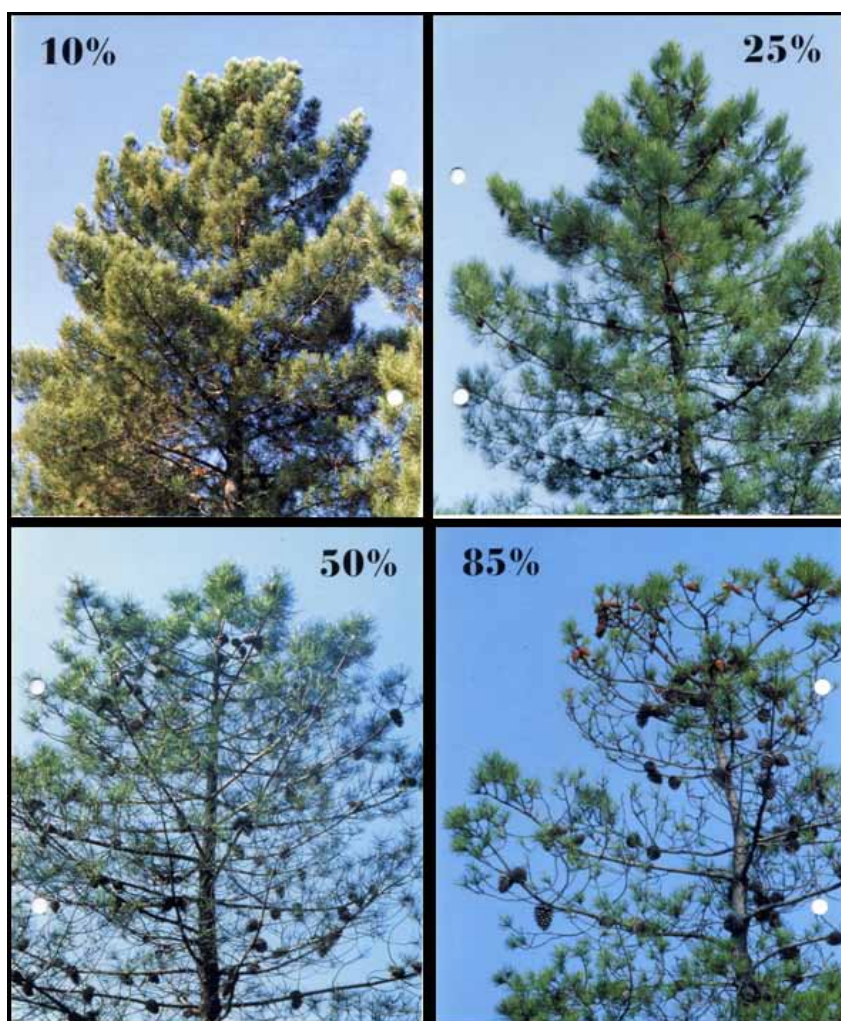
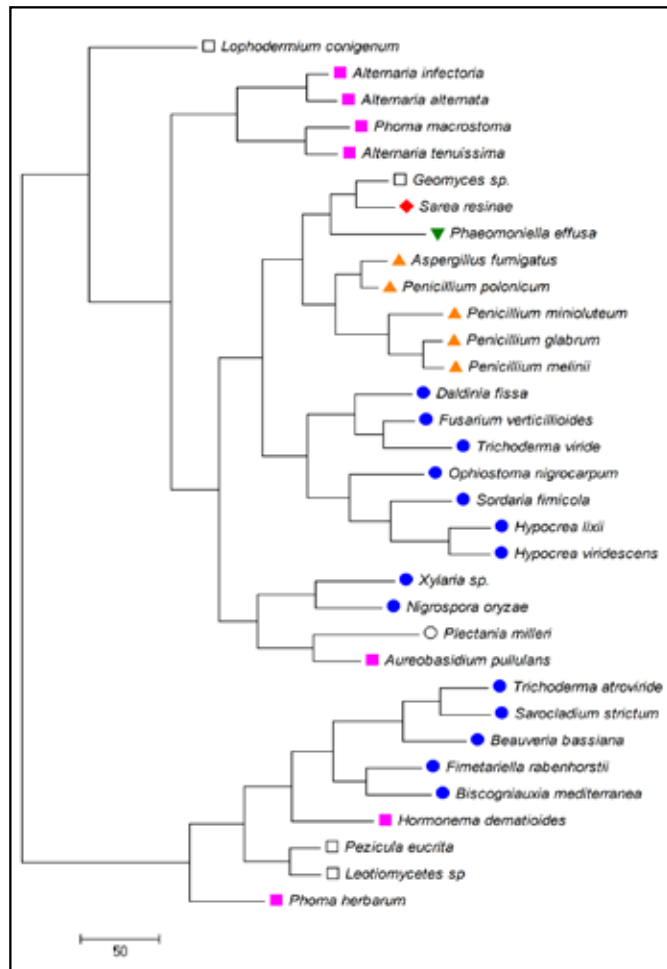


Figura 3. Fotografías de referencia para la evaluación visual de la defoliación en copas de pino

hongos pueden influir sobre el crecimiento vegetal y sus posibles aplicaciones. Además se describen tres nuevas especies fúngicas endófitas para la familia Pinaceae, y seis nuevas para el pino silvestre, lo cual nos recuerda que desconocemos a día de hoy una gran parte de la diversidad fúngica endófito (Figura 4).



El capítulo V trata la influencia de los factores de sitio sobre la distribución de hongos endófitos en ramillos de pino silvestre. Los factores ambientales bajo los cuales crecen los pinos podrían influir en la distribución de hongos endófitos, ya que influyen sobre el desarrollo de su hospedador. Estos factores de sitio incluyen el suelo, el clima y las características del rodal, las cuales van a estar determinadas por la gestión forestal realizada. Los resultados indican que la presencia y abundancia de algunas especies endófitas está ligada a ciertas combinaciones de factores ambientales, con lo cual se confirma la influencia de dichos factores sobre la distribución de endófitos. Además se observa que especies endófitas que tienen un efecto positivo sobre el árbol, bien a través de la mejora de su crecimiento o bien como protector ante patógenos, aparecen más abundantemente cuando las condiciones climáticas y edafológicas son favorables, mientras las especies que ejercen una influencia negativa o patogénica están asociadas a suelos pobres y ambientes estresantes.

Figura 4. Dendrograma de máxima parsimonia mostrando la diversidad fúngica encontrada en ramillos de pino silvestre, caracterizada morfológica y molecularmente.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Sanz-Ros, A. V., Valladares, F., Diez, J. J. 2016. Stand factors influencing *Pinus halepensis* decline in north-western Spain. Forest Pathology. DOI: 10.1111/efp.12257.

Sanz-Ros, A., Müller, M., San Martín, R., Diez, J. 2015. Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. Fungal Biology 119 (10): 870-883.

Sanz-Ros, A.V., Pajares, J.A., Diez, J.J. 2008. Influence of climatic variables on crown condition in pine forest of northern Spain. In: Bravo, F., LeMay, V., Jandl, R., Gadow, K.V. (Eds.) Managing Forest Ecosystems: The Challenge of Climate Change (1st Edition). Springer, Netherlands, pp. 103–115. ISBN 978-1-4020-8432-6.

Sanz-Ros, A.V., Pajares Alonso, J.A., y Diez, J.J. 2008. Comparación de daños forestales entre especies de pino en repoblaciones del norte de España. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 26: 91-96.

Yazmín Mónica Landeo Rios



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Estudio del mecanismo de acción y efecto sinérgico de la proteína supresora de silenciamiento p22 del crinivirus *Tomato chlorosis virus*” en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC) en Algarrobo-Costa, Málaga, que se ha llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. M. Carmen Cañizares y el Prof. Enrique Moriones. El tribunal estuvo constituido por los doctores Vicente Pallás Benet (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas-CSIC-UPV), Ana Grande Pérez (IHSM-UMA-CSIC), Carmelo López del Rincón (Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana-UPV), Elvira Fiallo Olivé (IHSM-UMA-CSIC) y M. Leticia Ruiz García (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Junta de Andalucía). La Tesis recibió la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



De Izquierda a Derecha: Ana Grande, Carmelo López, Enrique Moriones, Yazmín Landeo, M. Carmen Cañizares, Elvira Fiallo, Vicente Pallás, M. Leticia Ruiz

Tomato chlorosis virus (ToCV) pertenece al género Crinivirus dentro de la familia Closteroviridae donde se engloban los virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de mayor tamaño y complejidad entre los virus de RNA de plantas. ToCV posee un genoma bipartito, donde el RNA1 codifica las proteínas implicadas en replicación viral y el RNA2 las implicadas en encapsidación, movimiento y transmisión. Aunque ambos RNAs son necesarios para obtener una

infección productiva en planta, el RNA1 puede replicarse independientemente. En contraste, el RNA2 es completamente dependiente de las proteínas codificadas en el RNA1 para su replicación. Como ha sido descrito para otros miembros de esta familia, ToCV codifica en su genoma hasta tres proteínas con actividad supresora del silenciamiento por RNA. Así, mientras que en el RNA2 esta función supresora del silenciamiento es llevada a cabo por las proteínas estructurales CP y CPM, en el

RNA1 esta actividad supresora es realizada por una proteína que parece específicamente dedicada a ello, la proteína p22. La proteína p22, codificada en el extremo 3' del RNA1 de ToCV, ha sido descrita como una de las proteínas cuya actividad supresora del silenciamiento por RNA es de las más duraderas a lo largo del tiempo, en ensayos de expresión transitoria en planta (Cañizares, et al., 2008). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de esta proteína, donde la finalidad última ha sido conocer el modo en que, por mediación de p22, ToCV es capaz de hacer frente a una respuesta defensiva por parte de la planta basada en el silenciamiento por RNA, estando interesados en conocer también el papel de p22 cuando es expresada a partir de virus heterólogos.

Para todo ello, en primer lugar, ya que en este grupo de virus la región del genoma donde

se localiza p22 tiene implicaciones evolutivas, hemos realizado un estudio de la variabilidad genética de la región del RNA1 que codifica p22 en aislados de ToCV de tomate y pimiento. Estos resultados han mostrado que se trata de secuencias muy conservadas, en donde la poca variabilidad existente se concentra en la región carboxilo terminal de la proteína. Aunque altamente conservadas, el análisis filogenético mostró una clara separación de las secuencias de p22 en 2 grupos, llamados tipo I y tipo II (Figura 1). Ensayos de supresión de silenciamiento realizados con proteínas del tipo I y II, mostraron una similar duradera actividad supresora de silenciamiento a lo largo del tiempo en ambos casos. Parece, por tanto, que la presencia de un supresor de silenciamiento con actividad supresora de larga duración es una característica conservada entre los aislados de ToCV.

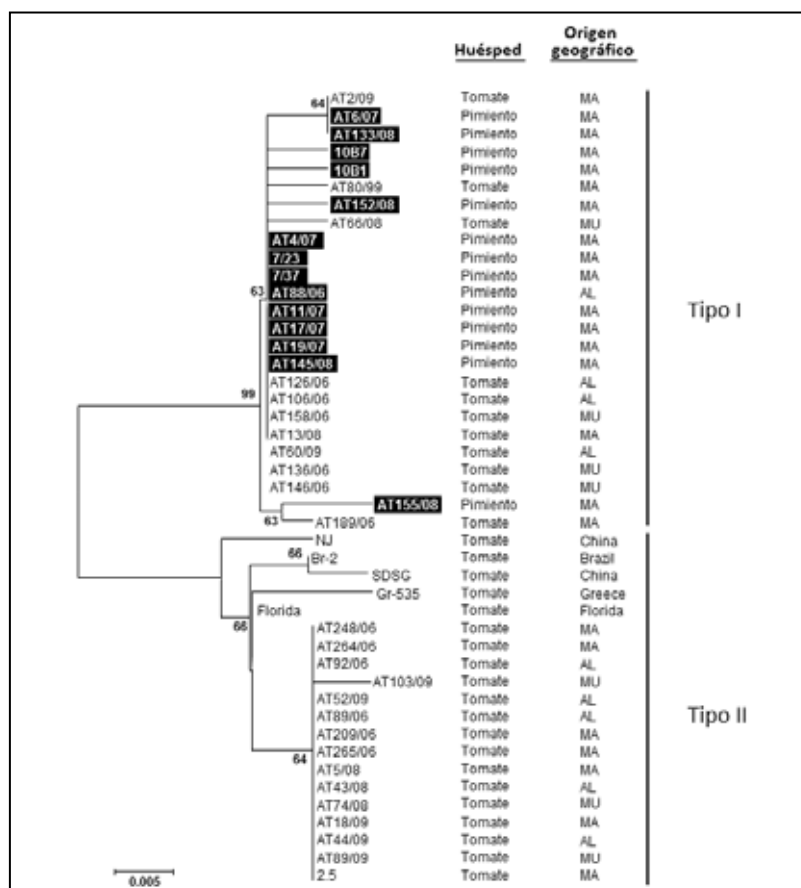


Figura 1. Árbol filogenético basado en las secuencias aminoacídicas de p22 de los aislados de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) analizados en este trabajo usando el programa MEGA 5.0 obtenido mediante el método del vecino más próximo. Se muestran los valores del Bootstrap mayores del 50% en los nodos. Para cada aislado de ToCV se indican la planta huésped y el origen geográfico del que procede (MA=Málaga, AL=Almería, MU=Murcia). Los aislados provenientes de pimiento se resaltan en cajas negras. También se han incluido las secuencias de p22 de los aislados de Florida, Grecia, Brasil y China disponibles en las bases de datos (Números de acceso en GenBank: AY903447, EU284745, JQ952600, KC709509, KF018289, respectivamente).

Una vez confirmado que codificar una proteína con actividad supresora de larga duración parecía ser importante para las poblaciones de ToCV, el siguiente objetivo consistió en conocer el posible mecanismo de acción responsable de la misma. Así, la realización de ensayos de unión *in vitro* mostró que p22 une preferentemente RNAs de doble hebra (dsRNAs) de tamaño largo, interfiriendo con la acción de corte de Dicer, inhibiéndose de este modo la generación de RNAs pequeños (sRNAs) (Figura 2). La actuación de p22 en este punto temprano de la cascada de silenciamiento, podría ser una de las razones de esta actividad supresora de larga duración, ya que se bloquearía desde un primer momento la generación de sRNAs. Estos resultados *in vitro* se correlacionaron con los obtenidos en ensayos de supresión de silenciamiento inducidos por construcciones en horquilla *in planta*.

Una vez conocido uno de los posibles mecanismos de acción de p22 cuando ésta se encontraba aislada de su contexto viral, el siguiente objetivo consistió en conocer cómo p22, durante el ciclo de infección viral, mediaba frente a una respuesta defensiva de la planta basada en el silenciamiento por RNA. Ya que, entre los componentes de la cascada de silenciamiento, RDR6 juega un papel fundamental en defensa antiviral, se comenzó estudiando si RDR6 tenía algún papel en defensa frente a ToCV. El notable

incremento en los niveles de acumulación de ToCV observado en plantas defectivas para la expresión de RDR6 (plantas RDR6i), comparado con los de plantas silvestres, indicaban que éste era el caso. Para conocer si durante el proceso de infección viral, p22 tenía algún papel frente a este componente de la cascada de silenciamiento, se creó un mutante de delección de p22 de ToCV (ToCV Δ p22). En primer lugar se estudió el papel de p22 durante el ciclo de infección viral en ensayos a nivel local. Curiosamente, los resultados mostraron que la ausencia de p22, además de no afectar a la replicación del RNA1, estaba asociada con la desregulación del ratio de cadenas positivas y negativas del virus, aumentando estas últimas, no teniendo RDR6 ningún efecto apreciable a este nivel. En el caso de ToCV Δ p22 el incremento en cadenas negativas correspondientes al RNA1, que resulta en un incremento en los niveles de acumulación de cadenas positivas a partir de las cuales las proteínas requeridas para la replicación podrían traducirse, no se correlacionó con un incremento en los niveles de acumulación del RNA2. Por otra parte, los ensayo a nivel sistémico mostraron que aunque el mutante ToCV Δ p22 tenía reducida la capacidad de infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana* silvestres, esta capacidad era rescatada en plantas RDR6i, lo que indicaba la existencia de una conexión entre p22 y RDR6.

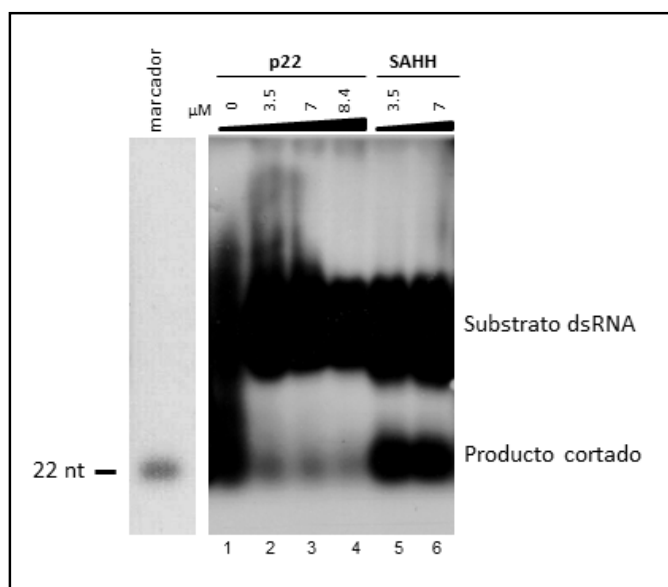


Figura 2. La proteína p22 de Tomato chlorosis virus protege al dsRNA de mayor tamaño de la acción de corte mediada por la enzima RNasa III (homóloga a Dicer). El dsRNA de 562 pb marcado con digoxigenina (DIG) fue incubado con la proteína p22 (calles 2, 3 y 4) o la proteína S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH) (calles 5 y 6) antes de ser cortado por la RNasa III. Las concentraciones de proteína utilizadas se indican en cada calle. Los productos cortados fueron separados en gel de agarosa al 1%. Como marcador se usó un RNA de 22 nt de tamaño sin marcar que corrió en una calle paralela y que fue teñido con bromuro de etidio antes de la transferencia y corte (izquierda). Los productos cortados marcados con DIG fueron transferidos a una membrana de nylon y detectados usando un anticuerpo frente a digoxigenina y un sustrato quimioluminiscente. Se indican las posiciones del dsRNA precursor y del producto cortado.

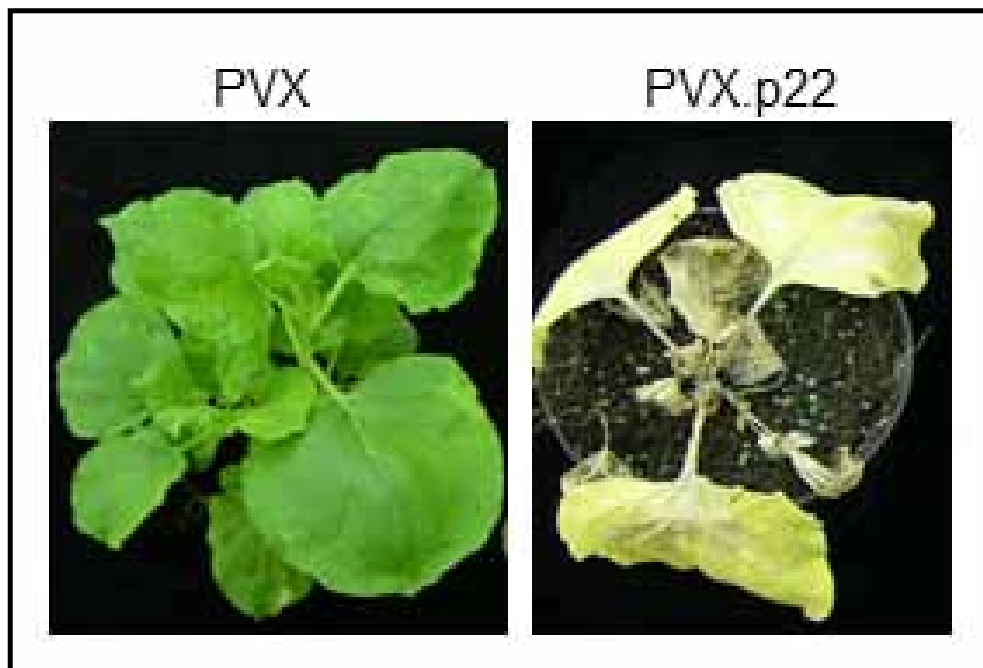


Figura 3. Sintomatología observada a 15 días post-infiltración en plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con un vector PVX vacío (PVX) o conteniendo la proteína p22 de ToCV (PVX.p22).

Por último, y ya que las proteínas supresoras de silenciamiento están frecuentemente asociadas a interacciones de tipo sinérgico, el último objetivo de esta tesis consistió en estudiar el efecto de la expresión de p22 a partir de los virus heterólogos Tobacco rattle virus (TRV) y Potato virus X (PVX). Estos resultados mostraron que, aunque se produjo un fuerte sinergismo en síntomas que

conducía a la muerte de la planta cuando p22 se expresaba a partir de ambos virus (Figura 3), sólo en el caso de TRV, éste iba acompañado de un aumento en los niveles de acumulación viral. La expresión heteróloga de p22 no era capaz, sin embargo, de complementar a mutantes de virus defectivos en la expresión de proteínas con actividad supresora.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Landeo-Ríos, Y.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Cañizares, M.C. 2015. Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of *Tomato chlorosis virus* isolates from tomato and sweet pepper. *Virus Genes* 51: 283-289.

Landeo-Ríos, Y.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Cañizares, M.C. 2016. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNA preventing them from cleavage. *Virology* 488: 129-136.

Y otorgado el siguiente reconocimiento:

Premio SEF 2013 por el trabajo: “Papel de la proteína supresora p22 del crinivirus Tomato chlorosis virus durante el proceso de infección viral y efecto sinérgico”, durante el Congreso Latinoamericano y XXII Congreso Peruano de Fitopatología, Lambayeque, 2013, Perú (Boletín SEF n°84, pag. 24, Diciembre 2013).

C

arolina Martínez Moncayo



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada: “Virus del moteado de la parietaria (PMoV): mecanismos de interacción del virus con la planta y caracterización de aislados virales” en el Dpto. Biología Animal Biología Vegetal y Biotecnología dentro del Programa de Doctorado en Biología y Biotecnología Vegetal de la Universitat Autònoma de Barcelona. La tesis ha sido realizada en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) (Cabrils, Barcelona), Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC, Valencia) e Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Valencia) y ha sido dirigida por los Drs. Luis Galipienso Torregrosa (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Valencia) y Frederic Aparicio Herrero (Instituto de Biología Molecular y celular de Plantas, UPV-CSIC). El tribunal lo constituyeron el Dr. Juan José López-Moya Gómez (Crag, Centre de Recerca en Agrigenòmica CSIC-IRTA-UAB-UB), Dr. Antonio Olmos Castelló (IVIA, Valencia) y Dr. Leonardo Velasco Arjona (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Málaga). La Tesis Doctoral obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



De Izquierda a Derecha: Leonardo Velasco Arjona, Juan José López-Moya Gómez, Cristina Martínez Moncayo y Antonio Olmos Castelló

Las enfermedades producidas por virus causan daños e importantes pérdidas económicas en los principales cultivos. Para poder implementar estrategias de control y minimizar las pérdidas, es necesario profundizar en el conocimiento sobre la variabilidad genética y evolución de las poblaciones virales, sobre todo para poder establecer programas adecuados de búsqueda de fuentes de resistencias que puedan ser incorporadas a variedades comerciales. Por otra parte, también es muy importante incrementar el conocimiento sobre los mecanismos que desencadenan los procesos patológicos una vez han infectado el hospedador.

En el presente trabajo se han realizado estudios dirigidos a caracterizar molecular y biológicamente el virus del moteado de la parietaria (PMoV). Este virus pertenece al género de los Ilarvirus dentro de la Familia Bromoviridae, y se han identificado diversos aislados que infectan y causan daños en

cultivos de tomate y pimiento.

Se ha realizado un estudio de la variabilidad genética y evolución del PMoV mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes 2b y la proteína de cubierta (CP) a partir de aislados recogidos en diferentes países. El análisis filogenético mostró que los aislados de PMoV se agruparon en diferentes clados. La diversidad nucleotídica de los genes 2b y CP fue baja ($0,062 \pm 0,006$ y $0,063 \pm 0,006$ para 2b y CP, respectivamente), aunque más alta que la observada en otros ilarvirus. La distribución de las sustituciones sinónimas y no sinónimas revelaron que las proteínas 2b y CP se encontraban bajo selección purificadora con algunas posiciones bajo selección diversificadora. También se detectaron fenómenos de intercambio genético entre aislados españoles.

Asimismo se ha caracterizado biológica y molecularmente un aislado del

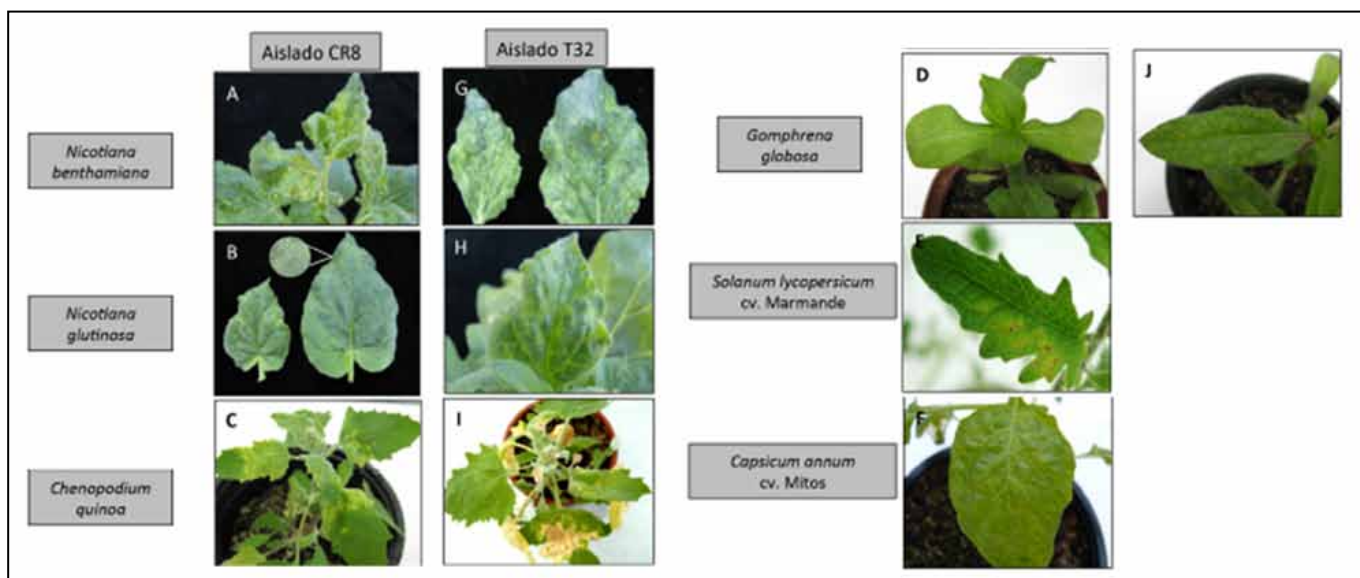


Figura 1. Síntomas inducidos por los aislados CR8 y T32 del virus del moteado de la parietaria (PMoV) en diferentes especies hospedadoras. Los paneles A y G muestran los síntomas de mosaico y deformación foliar inducidos en plantas de *N. benthamiana* por los aislados CR8 y T32, respectivamente. El panel B muestra los síntomas de mosaico, aclaramiento nervial y necrosis inducidos por el aislado CR8 en plantas de *N. glutinosa* mientras que el panel H muestra los síntomas de mosaico y aclaramiento nervial (no se aprecian lesiones necróticas) en esta especie inducidos por el aislado T32; El panel C muestra los síntomas de mosaico y deformación foliar inducidos por el aislado CR8 en plantas de *C. quinoa* mientras que el panel I muestra los síntomas descritos anteriormente pero con necrosis inducidos por el aislado T32 en esta especie; Los paneles D y J muestran síntomas de mosaico y necrosis inducidos en plantas de *G. globosa* por los aislados CR8 y T32, respectivamente; El panel E muestran los síntomas de mosaico y necrosis en tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Marmande) inducidos por el aislado CR8 y el panel F los síntomas de mosaico inducidos en pimiento (*Capsicum annuum* cv. Mitos) por este mismo aislado.

PMoV (aislado T32) obtenido de plantas de tomate. Para ello, se analizó su infectividad en diferentes especies hortícolas (Figura 1) y se obtuvo la secuencia completa de su genoma.

Los resultados demostraron que T32 era un patotipo diferente al aislado CR8, otro aislado de PMoV obtenido de tomate. El análisis de la secuencia genómica permitió identificar diferentes motivos conservados en otros virus de RNA como los dominios metiltransferasa y NTPasa/helicasa en la proteína p1 y el dominio RNA polimerasa en la p2. Además, también se predijeron estructuras en tallo-bucle en las regiones terminales no traducidas, con potencial capacidad de interaccionar con proteínas. Finalmente se observó que el aislado T32 presentaba la delección de un nucleótido en el inicio del ORF que codifica para la CP, al igual que la detectada para otros aislados de PMoV, dando lugar a una CP 16 aminoácidos más corta que el aislado de parietaria secuenciado inicialmente. Finalmente, los análisis de sustituciones N y S indicaron una presión de selección negativa o purificadora para todas las regiones genómicas.

Por otro lado, se ha estudiado la implicación de la proteína de movimiento (MP) en el transporte célula a célula del virus. Mediante análisis bioinformático se identificaron dos regiones hidrófilas no contiguas (R1 y R2) ricos aminoácidos básicos lisinas y argininas, con una estructura secundaria en α -hélice. Además, se utilizaron diferentes aproximaciones para determinar la implicación de las regiones R1 y R2 en la unión al RNA, localización en plasmodesmos (PDs) y movimiento célula a célula. Mediante ensayos de retardo en gel se demostró que ambas regiones tienen actividad de unión al RNA, mientras que mediante un análisis mutacional se observó que la pérdida de los aminoácidos básicos de estas regiones, interfería con el movimiento intercelular

del virus. Los estudios de localización subcelular mostraron que la MP de PMoV se localizaba en los PDs. Los mutantes diseñados para impedir el movimiento célula a célula no pudieron acumularse en los PDs, lo que indicaba que los residuos básicos en las regiones R1 y R2 eran críticas para la acumulación de la MP en los PDs.

Finalmente, se ha analizado la implicación de las proteínas 2b, MP y CP en la patogenicidad del virus y el posible mecanismo de inducción de síntomas. Para esto, se utilizó un vector viral basado la secuencia del virus X de la patata (PVX) modificado (pGR107) que permitía la expresión transitoria de estas proteínas en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Los resultados mostraron que la proteína CP inducía fuertes síntomas de enanismo, mosaico, enrollado foliar. En el caso de la MP y la 2b, estas indujeron síntomas de mosaico foliar y enrollamiento en hojas muy similares a los observados en las plantas control aunque más intensos y duraderos que estas últimas. Asimismo, se descartó que las diferencias de sintomatología observadas en las plantas se debieran a diferencias en el nivel de multiplicación viral. Considerando que en algunos casos las proteínas virales que actúan como determinantes de patogenicidad, también son supresores de silenciamiento (VSR), se analizó si la CP, MP y 2b presentaban esta actividad. Para esto, utilizamos una versión modificada del virus del arrugamiento del nabo (TCV) que permite determinar la actividad VSR de una proteína. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las proteínas estudiadas presentaba actividad VSR, ya que no se vio aumentada el área de los focos de infección tras la expresión transitoria de dichas proteínas (Figura 2). Estos resultados indicaban que esta actividad no sería necesaria para la inducción de los síntomas mostrados por las tres proteínas virales.

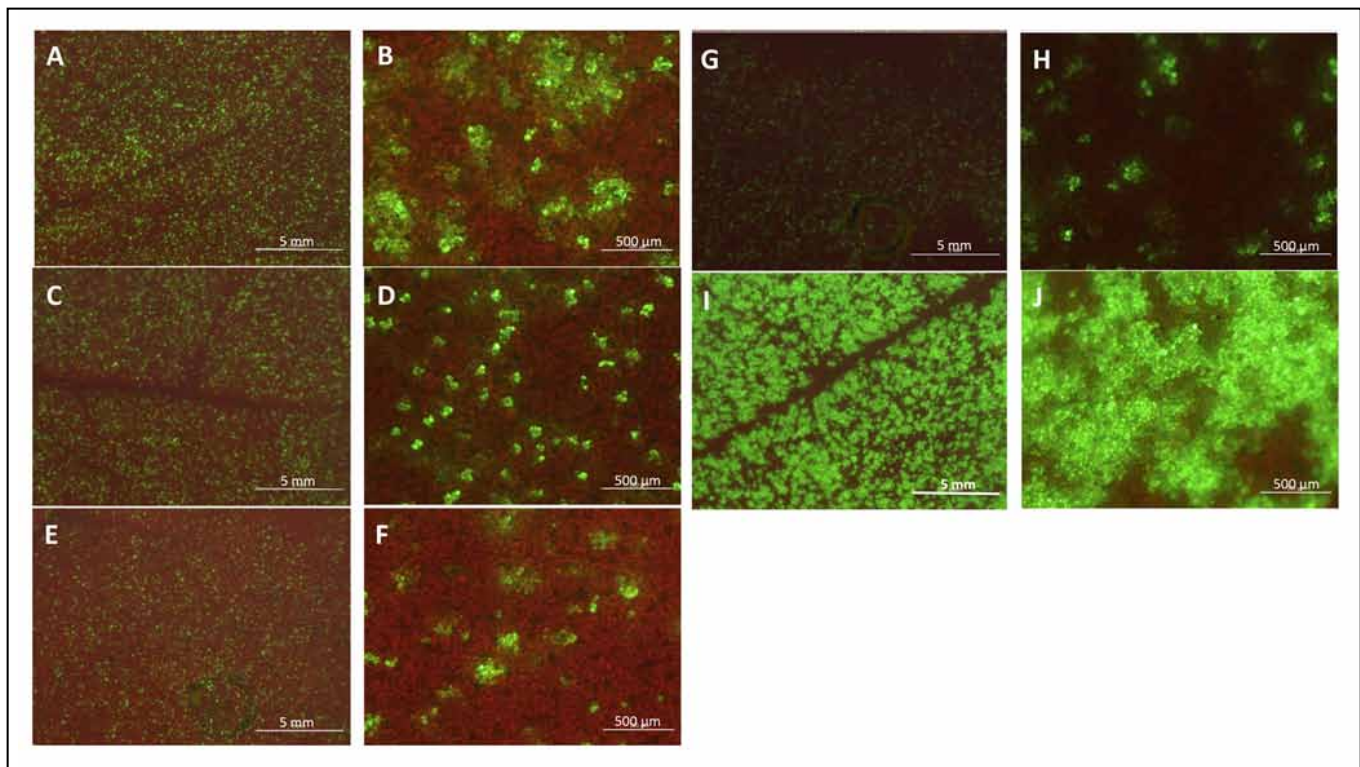


Figura 2. Imágenes de fluorescencia de los focos de infección producidos por transcritos de TCV-GFP en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas previamente con las construcciones pMOG:CP (paneles A y B), pMOG:MP (paneles C y D), pMOG:2b (paneles E y F) y los respectivos controles pMOG:Θ (paneles G y H) y pMOG:HC-Pro (paneles I y J).

Publicaciones derivadas la Tesis Doctoral:

Martínez, C., Coll, N. Aramburu, J., Pallás, V., Aparicio, F., Galipienso, L. 2014. Two basic (hydrophilic) regions in the movement protein of Parietaria mottle virus have RNA binding activity and are required for cell-to cell transport. *Virus Research* 184:54-61.

Galipienso, L., Martínez, C., Willemsen, A., Alfaro-Fernández, A., Font-San Ambrosio, I., Davino, S., Rubio, L. 2015. Genetic variability and evolutionary analysis of Parietaria mottle virus: role of selection and genetic exchange. *Archives of Virology* 160: 2611- 261.

Martínez, C., Aramburu, J., Rubio, L., Galipienso, L. 2015. Complete genome sequence of a tomato isolate of Parietaria mottle virus from Italy. *Genome Announcements*. 3(6): e01452-15. doi:10.1128/genomeA.01452-15.

Jaime Carrasco Carrasco



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Study of cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum* in Spanish mushroom crops” en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM) de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, que se ha llevado a cabo bajo la dirección del Dr. Francisco José Gea Alegría y la Dra. María Jesús Navarro Lozano en el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), Quintanar del Rey (Cuenca). La investigación ha sido financiada mediante una beca FPI-INIA concedida por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) a través del Sistema INIA-CCAA. El trabajo ha incluido estancias internacionales del doctorando en el Teagasc Food Research Centre, Ashtown (Irlanda) y en el Department of Biology de la Universidad de Utrecht (Holanda). El tribunal estuvo constituido por los doctores Milagrosa Santos Hernández (Departamento de Agronomía, Universidad Almería), José Emilio Pardo González (Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria, Universidad de Castilla-La Mancha) y Luis G. Lugones (Department of Biology, Universidad de Utrecht). La Tesis, con mención de doctorado internacional, obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



De izquierda a derecha: José Emilio Pardo, Luis G. Lugones, Milagrosa Santos, Jaime Carrasco, M^a Jesús Navarro, Francisco José Gea.

En los últimos años se ha observado una presencia generalizada de la enfermedad de la telaraña en cultivos españoles de champiñón [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach]. De hecho,

desde 2008 la presencia de la enfermedad ha aumentado notablemente generando importantes pérdidas para el sector productivo (Figura 1).

Con el objetivo de aportar una perspectiva global sobre el impacto de la enfermedad, en este estudio se muestrearon cultivos comerciales españoles de champiñón situados en la comarca productora de La Manchuela (Castilla-La Mancha) durante un período de dos años para estimar la incidencia y la severidad de la telaraña a lo largo del ciclo de cultivo, analizando la estacionalidad de la infección y el material de cobertura empleado por el cultivador. La telaraña, detectada en el 32% de las visitas realizadas, puede aparecer en cualquier momento durante el año, aunque su presencia y severidad es mayor en otoño e invierno que en primavera y verano. La enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia al avanzar el ciclo de cultivo. Los cultivos en tercera flor son mucho más propensos a mostrar síntomas que los de segunda y primera flor (Figura 2).

Veinticinco cepas de *Cladobotryum* spp. fueron aisladas de cultivos comerciales con síntomas de la enfermedad. Se estudió el crecimiento y evolución in vitro de las colonias, que fueron también caracterizadas taxonómica, molecular y filogenéticamente. Inicialmente blancas, las colonias segregan un pigmento rojo oscuro y carecen del olor a alcanfor característico de *C. mycophilum*. Los conidios son grandes, baciloformes y principalmente uniseptados, y las fiáldes son subuludas, afiladas hacia la punta que es simple y regular. A temperatura ambiente, las esporas germinaron dos horas después de sembrarlas en PDA y los tubos germinativos muestran una alta tasa de crecimiento. El análisis de las secuencias extraídas revela un mayor porcentaje de similitud de pares

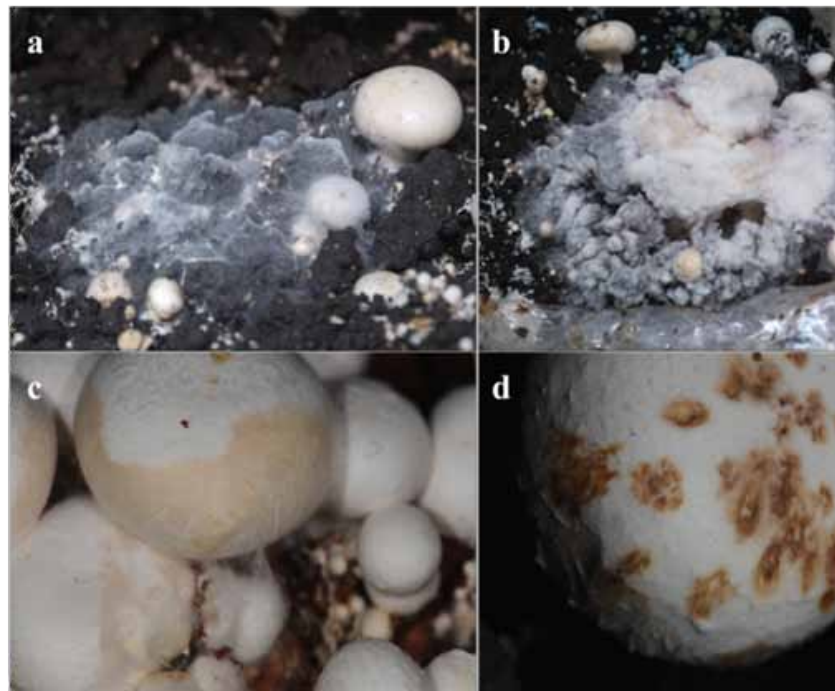


Figura 2. Symptoms of mushroom cobweb disease. a) Fluffy mycelium growing over the casing layer and carpophores. b) Mass of conidia as a result of a profuse sporulation. c) Regular grey-yellow spots or decoloration. d) Brown spots with an ill defined edge.

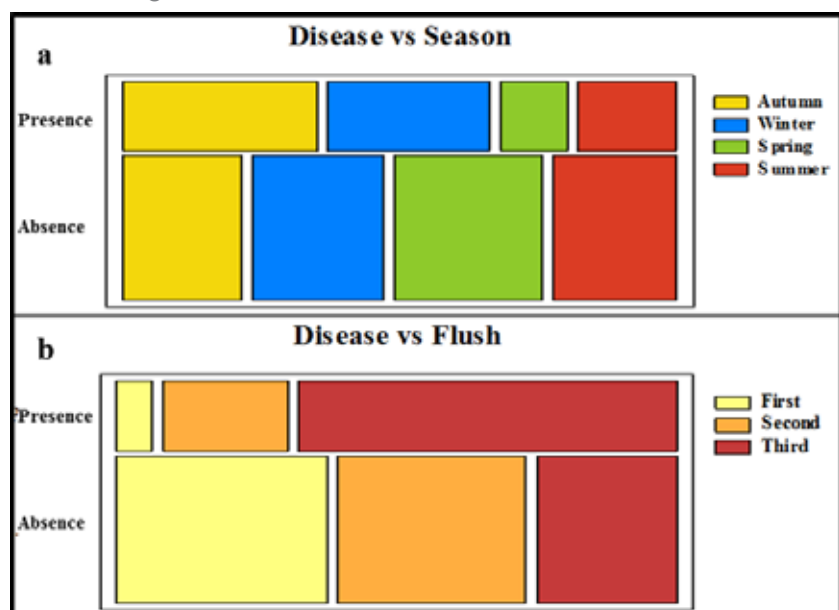


Figura 2. Incidence of cobweb disease in commercial button mushroom crops: a) Season; b) Flush.

de bases con cuatro secuencias de *C. mycophilum* depositadas en la base de datos de GenBank. El análisis filogenético mostró también la mayor proximidad evolutiva a varias secuencias de *C. mycophilum* depositadas en el GenBank. Por lo tanto, el agente causal de la enfermedad de la telaraña en cultivos españoles de champiñón es *Cladobotryum mycophilum* (Oudem). W. Gams y Hoozem.

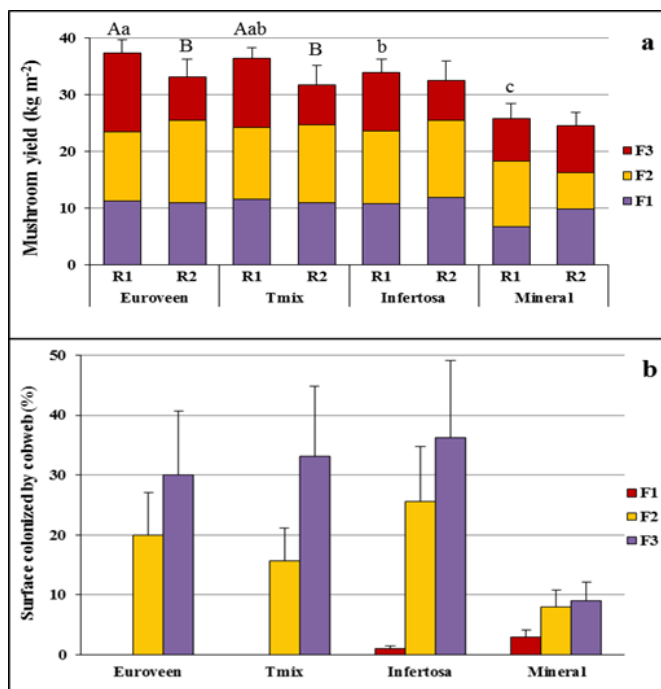


Figure 3. Pathogenicity of cobweb disease in *Agaricus bisporus* mushroom crops artificially inoculated. a) Mushroom yield (kg m⁻²); b) Crop surface colonized by cobweb along the crop cycle. R1: Control room. R2: Inoculated room. F1: first flush; F2: second flush; F3: third flush. Different letters over the bars, lowercase between rooms, show significant differences by Fisher's LSD.

Se evaluó la patogenicidad de *C. mycophilum* inoculando artificialmente un cultivo de *Agaricus bisporus* con diferentes materiales de coberturas. Tres materiales de cobertura tipo turba y uno mineral han sido evaluados. La patología se detectó en los bloques inoculados, mientras que bloques control permanecieron asintomáticos. Los bloques cubiertos con turba mostraron mayor infección que los de cobertura mineral.

Todos los materiales de cobertura ensayados expresaron la infección. Los bloques inoculados con la enfermedad sufrieron pérdidas entre 1% y 13% debido a la telaraña. Cuanto mayor fue la precocidad de la infección, mayores pérdidas de rendimiento fueron registradas. La superficie de cultivo colonizada por la enfermedad aumentó al avanzar el ciclo de cultivo, una temprana infección supuso una mayor área de cultivo colonizada (Figura 3).

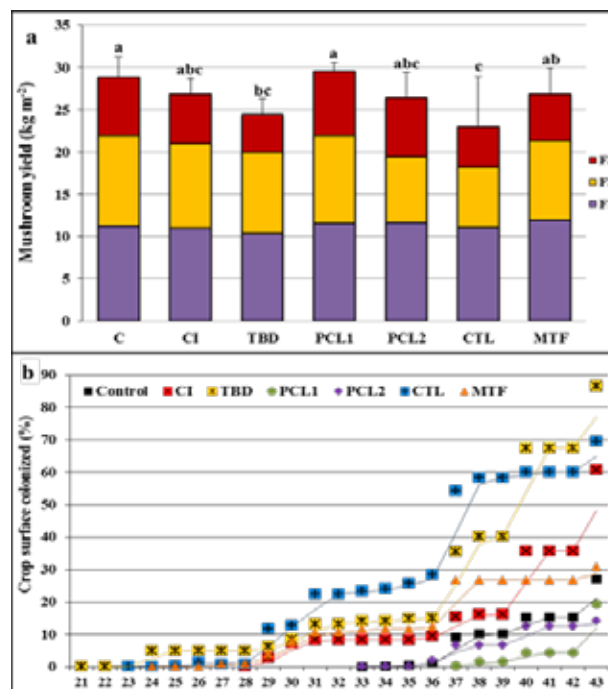


Figure 4. Cobweb control in *Agaricus bisporus* mushroom crops artificially inoculated. a) Mushroom yield (kg m⁻²); b) Crop surface colonized by cobweb along the crop cycle (days after casing). C: Control; C1: Control inoculated; TBD: Thiabendazole; PCL1: Prochloraz-Mn 1 dosis; PCL2: Prochloraz-Mn 2 dosis; CTL: chlorothalonil; MTF: thiophate-methyl. F1: first flush; F2: second flush; F3: third flush. Different letters over the bars, lowercase between casing materials and upper case between rooms, show significant differences by Fisher's LSD.

Es necesario tratar los brotes de enfermedad localizados sobre la cobertura antes de la esporulación. Esto se debe hacer cubriendo con papel húmedo las manchas localizadas sobre la cobertura para evitar la liberación de conidios. Los métodos de control, descritos en el trabajo, deben prevenir la dispersión de las esporas patógenas, que son secas, fáciles de liberar y de movilizar. Cuando no se tratan correctamente, los conidios se dispersarán en los cultivos generalizando la infección y provocando mayores pérdidas.

Varios fungicidas químicos utilizados en la industria mundial del champiñón han sido analizados en el trabajo, con el fin de valorar su eficacia frente a la enfermedad de la telaraña. Se evaluaron fungicidas con diferentes modos de acción: clorotalonil, procloraz-Mn, metiltiofanato y tiabendazol, valorando la

sensibilidad in vitro de *C. mycophilum* y *A. bisporus*, analizando toxicidad y selectividad de los fungicidas seleccionados. La dosis media efectiva (ED50) calculada para los dos fungicidas tipo benzimidazoles (metiltiofanato y tiabendazol) fue mayor que la de procloraz-Mn y clorotalonil. Dos de las cepas analizadas mostraron síntomas de resistencia a los fungicidas tipo benzimidazoles. Procloraz-Mn fue el fungicida más tóxico y selectivo entre patógeno y huésped. Por contra, clorotalonil mostró la peor selectividad entre las sustancias evaluadas.

El control de la telaraña en cultivo mediante fungicidas también se estudió, tratando el cultivo con los fungicidas seleccionados y posteriormente inoculando artificialmente *C. mycophilum*. La telaraña se generalizó en la tercera florada en todos

los tratamientos. La superficie de cultivo colonizada creció a lo largo del ciclo de cultivo. Una mayor precocidad supuso mayor superficie colonizada por el patógeno. La telaraña provocó descensos de rendimiento de hasta un 17%. La superficie de cultivo colonizada en el control sin inocular fue significativa debido a la dispersión conidial desde bloques inoculados. Un control muy pobre se logró en los ensayos mediante el uso de tiabendazol. Metiltiofanato también demostró ser ineficaz. Los tratamientos de procloraz-Mn fueron los más efectivos para controlar la enfermedad, mientras que clorotalonil registró la menor eficiencia biológica de cultivo entre los tratamientos fungicidas; por lo tanto puede concluirse que la baja especificidad de este producto podría haber condicionado la producción.

Publicaciones derivadas la Tesis Doctoral:

Carrasco, J., Navarro, M. J., Santos, M., Diáñez, F., Gea, F.J. 2016. Incidence, identification and pathogenicity of *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on *Agaricus bisporus* mushroom crops in Spain. *Annals of Applied Biology*. 168 (2): 214–224.

Carrasco, J., Navarro, M. J., Santos, M., Gea, F.J. 2016. Efficacy of fungicides with different modes of action for the control of mushroom cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum*. (en preparación).

Gea, F.J., Carrasco, J., Santos, M., Diáñez, F., Navarro, M.J. 2014. *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on commercial *Agaricus bisporus* and *Pleurotus eryngii* crops in Spain. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)*. Vol.: 2. 523-529. New Delhi (India).

Gea, F.J., Navarro, M.J., Carrasco, J., González, A.J., Suz, L.M. 2012: First Report of Cobweb on White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) in Spain Caused by *Cladobotryum mycophilum*. *Plant disease*. 96(7). 1067.

Congresos:

Parte de los resultados de la Tesis Doctoral se presentaron como comunicaciones orales en el 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), New Delhi (India) y en las II Jornadas Argentinas sobre Biología y Cultivo de Hongos Comestibles y Medicinales, San Martín (Argentina). Se presentaron también comunicaciones en el XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología celebrado en Málaga y en las VI Jornadas técnicas del champiñón y otros hongos cultivados en Castilla-La Mancha, Casasimarro (Cuenca).

Javier Cabrera Chaves



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Gene expression reprogramming during the formation of feeding sites induced by plant endoparasitic nematodes” en la Universidad de Castilla-La Mancha, que ha llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Carolina Escobar en el Departamento de Ciencias Ambientales, Grupo de Biotecnología y Biología Molecular de Plantas de la Universidad de Castilla-La Mancha. El tribunal estuvo constituido por los doctores Carmen Fenoll Comes (Universidad de Castilla-La Mancha), Luis Eduardo Hernández Rodríguez (Universidad Autónoma de Madrid) y Bruno Favery (Institut Sophia Agrobiotech, INRA, Francia). La Tesis obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



Autor de la Tesis: Javier Cabrera Chaves

Los nematodos parásitos de plantas constituyen una de las principales plagas para la agricultura, causando pérdidas en la producción estimadas en un 12-15% a nivel mundial cada año. Entre ellos, los nematodos endoparásitos sedentarios, establecen una relación altamente sofisticada con la planta, induciendo sus propias células de alimentación en el interior de las raíces, las células gigantes (CGs) y

los sincitios en el caso de los nematodos formadores de agallas o formadores de quistes, respectivamente. En el caso de los nematodos formadores de agallas del género *Meloidogyne* spp., el estadio de vida libre, juveniles (J2), penetran en la raíz por la zona subapical y migran intercelularmente hacia el ápice radicular donde giran para introducirse en el cilindro vascular. Una vez en el cilindro vascular,

el nematodo se establece y selecciona entre 5 y 8 células para diferenciarlas en sus células alimentación, las CGs (Figura 1). Las CGs son de un tamaño alrededor de cien veces mayor a sus células vecinas del cilindro vascular. Son células de transferencia que actúan como sumidero de nutrientes de la planta para alimentar al nematodo, causando síntomas como enanismo o marchitamiento en la parte aérea de las plantas.

El objetivo general de esta Tesis fue el de entender los cambios en la expresión génica que permiten la diferenciación de células vasculares de la raíz en células altamente especializadas como las CGs. Con este objetivo, en nuestro grupo de investigación se obtuvieron previamente los transcriptomas de los sitios de alimentación (las CGs microdiseccionadas por láser y las agallas) inducidas por *M. javanica* en dos plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* y tomate. Durante la realización de esta tesis se realizó el estudio comparativo de estos transcriptomas. En primer lugar, pudimos observar en ambas especies que los transcriptomas de las CGs y de las agallas son muy diferentes ya que la mayoría de los genes diferencialmente expresados en CGs no se encuentran diferencialmente expresados en las agallas que contienen estas CGs, reforzando la idea de la necesidad del estudio de estas células de alimentación aisladas del resto de tejidos para conocer sus marcas moleculares. Cuando realizamos un estudio de expresión diferencial de los transcriptomas de CGs en un estadio temprano de desarrollo, 3 días post-infección, observamos una masiva represión génica en ambas especies. Además, en un análisis de ortología con un blast recíproco, pudimos observar que esta represión génica parece estar conservada en ambas especies, pudiéndose detectar más de cien genes con posibles ortólogos, reprimidos ambos en las CGs de las dos especies por sólo un



Figura 1. Imagen de las células gigantes inducidas por *Meloidogyne javanica* en la línea usada como sensor de respuesta a auxinas, DR5::GUS en *Arabidopsis* a los 4 días post- infección. La actividad GUS es muy fuerte en las células gigantes y en las células vecinas en el cilindro vascular. El nematodo ha sido coloreado en rosa para facilitar su visualización.

gen comúnmente inducido. Entre los genes comúnmente reprimidos se encuentran significativamente enriquecidos aquellos que codifican genes de defensa, enzimas del metabolismo secundario o peroxidasas. Entre estas peroxidasas, el gen TPX1 reprimido en las CGs de líneas susceptibles de tomate y en sus agallas, mientras que está altamente inducido en agallas de plantas resistentes. Además, la sobreexpresión de esta peroxidasa en la línea susceptible conlleva una reducción en los parámetros de infección y en el tamaño de las CGs desarrolladas. Parece por tanto que esta masiva represión génica en los sitios de alimentación de los nematodos, pueda tener un papel relevante para el correcto desarrollo de la infección. Muchos mecanismos de represión de genes están mediados por small RNAs (sRNAs), por ello, se estudió la regulación y el posible papel de los RNAs de pequeño tamaño (sRNAs) en la masiva represión génica encontrada en CGs. Se generaron seis librerías de sRNAs que se secuenciaron, tres de ellas muestras independientes de agallas a 3 días post infección y las otras tres de segmentos de raíces control. Las principales diferencias se encontraron en las secuencias

de 21 y 24 nucleótidos, correspondientes a miRNAs y rasiRNAs respectivamente. En el primer caso, tras un análisis de expresión diferencial, se obtuvieron 51 mRNAs reprimidos y 11 inducidos. Entre los inducidos se encontraba el miRNA390a, que en colaboración con otro sRNA intermediario, el tasiRNA3a, participa en la cascada de señalización mediada por auxinas para la formación de las raíces laterales. Mediante el uso de líneas deladoras y líneas sensoras, líneas con pérdida de función, PCR cuantitativa y ensayos de infección, pudimos demostrar que ambos sRNAs, el miRNA390a y el tasiRNA3a, se encontraban inducidos y eran funcionales en las agallas y CGs inducidas por *M. javanica*, ya que líneas de pérdida de función tenían reducidos los índices de infección y el tamaño de las CGs era menor que en las líneas control. Tras esta masiva generación de datos mediante estudios holísticos, decidimos crear una

base de datos de los transcriptomas de los sitios de alimentación de nematodos fitoendoparásitos inducidos en *Arabidopsis* a la que llamamos “NEMATIC”. Además, añadimos otras bases de datos y otros transcriptomas de relevancia para el estudio de esta interacción con el fin de facilitar la selección de genes para posteriores estudios funcionales. NEMATIC se usó para la comparación de los genes inducidos en CGs y agallas con aquellos enriquecidos en los diferentes tipos celulares de la raíz. Se observó un enriquecimiento de los genes característicos de tipos celulares indiferenciados de la raíz como el centro quiescente o las células fundadoras del periciclo asociado al xilema que originan los primordios de raíz lateral. Pudimos demostrar que uno de los genes marcadores de estas células fundadoras, el LBD16, se induce específicamente en las agallas inducidas por el nematodo (Figura 2) y por sus secreciones.

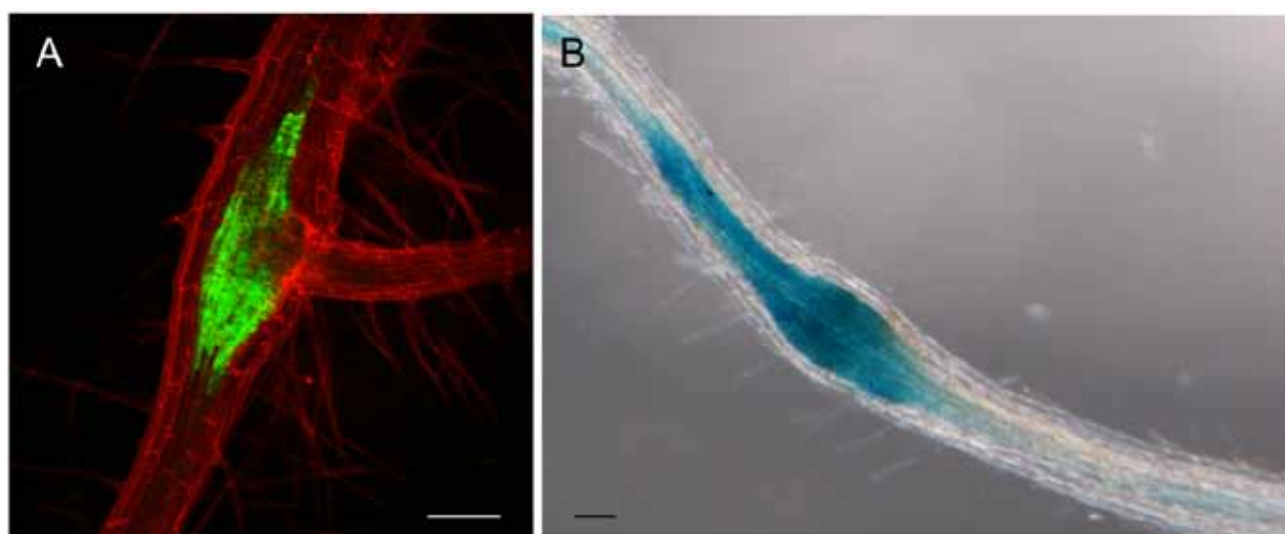


Figura 2. A) Agalla de 4 días post infección en la línea transgénica de trampa de promotores J0192 en la que la expresión de la GFP está dirigida por el promotor del gen LBD16. B) Agalla a 7 días post infección formada en la línea pLBD16:GUS.

Además, líneas mutantes para este gen mostraron una reducción en el índice de infección y en el tamaño de las CGs. Sin embargo, LBD16 no se induce en los sincitios inducidos por nematodos formadores de quistes de la especie *Heterodera schachtii*. Por último, hemos desarrollado un nuevo método de fenotipado en las CGs mediante reconstrucción

tridimensional. Tras seccionar una agalla completamente y tomar fotografías de todas las secciones seriadas, se utilizó el programa TrakEM2 para la alineación, por rotación y traslación, de las secciones y el posterior marcaje individual de cada CG. Esto nos permitió obtener reconstrucciones 3D de las CGs, observando por primera vez su morfología (Figura 3). Esto nos ha

permitido obtener datos cuantitativos de los volúmenes ocupados por CGs individuales y por todo el grupo de células en el interior de una agalla. A este respecto, observamos que el parámetro más relevante con una alta correlación con los tiempos de infección, es precisamente el volumen de todo el pool de células en la agalla. Además, proponemos su utilidad para evitar errores en el fenotipado de las mismas en cuanto a su número y posición debido a su morfología irregular.

Como conclusiones de esta tesis, hemos mostrado la existencia de una represión génica masiva en las CGs, conservada entre especies y necesaria para la progresión de la infección de los nematodos formadores de agallas. Esta represión está mediada en parte por miRNAs y tasiRNAs y posiblemente por rasiRNAs. Además, mostramos la importancia de las divisiones de las células fundadoras del periciclo para la formación de las CGs y las agallas, y el importante papel del LBD16 y del miRNA390a en este proceso. Todo ello indica un paralelismo con la ruta mediada por auxinas para la formación de la raíz lateral. También propusimos un método de fenotipado estandarizado para evaluar el tamaño de las CGs.

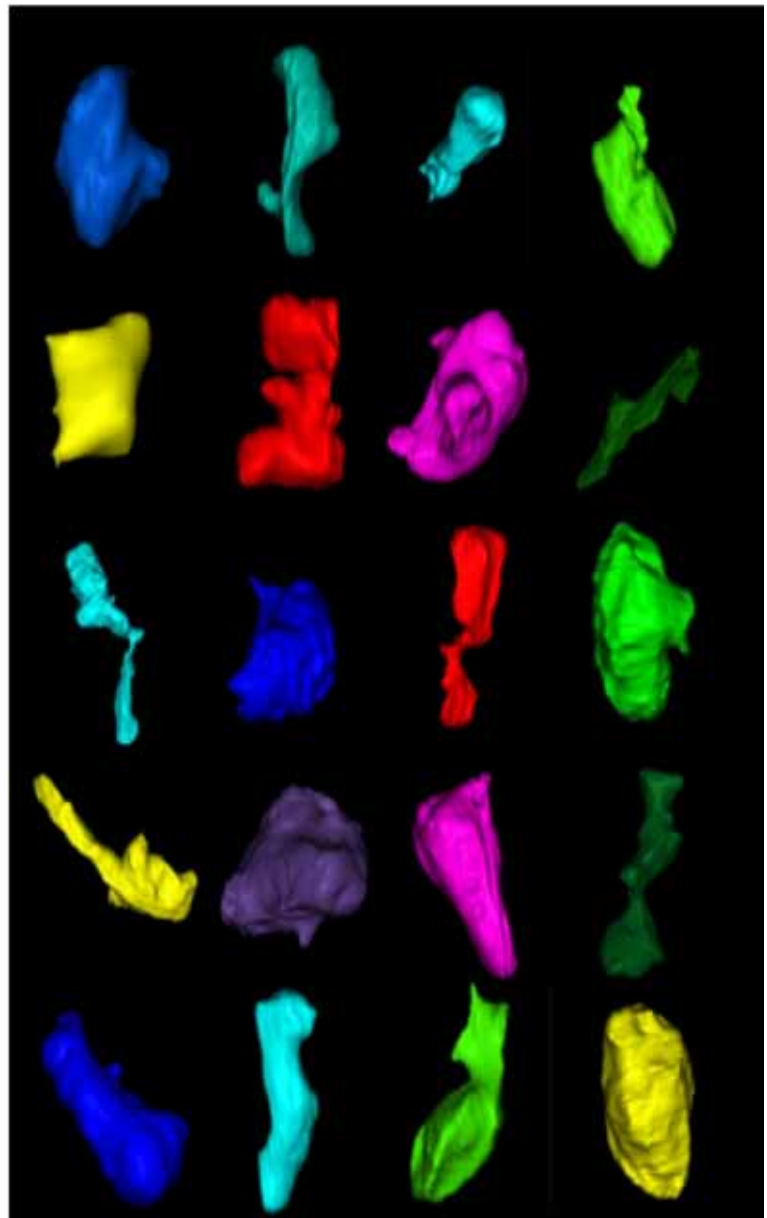


Figura 3. Imagen con la reconstrucción 3D de 20 células gigantes inducidas por los nematodos formadores de agallas en las raíces de *Arabidopsis*.

Publicaciones derivadas la Tesis Doctoral:

Cabrera, J., Bustos, R., Favory, B., Fenoll, C., Escobar, C. 2014. NEMATIC: a simple and versatile tool for the in silico analysis of plant-nematode interactions. *Mol. Plant Pathol.* 15(6): 627-636.

Cabrera, J., Díaz-Manzano, F.E., Sanchez, M., Rosso, M.N., Melillo, T., Goh, T., Fukaki, H., Cabello, S., Hofmann, J., Fenoll, C., Escobar, C. 2014. A role for LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16 during the interaction *Arabidopsis*–*Meloidogyne* spp. provides a molecular link between lateral root and root-knot nematode feeding site development. *New Phytol.* 203: 632–645.

Cabrera, J., Díaz-Manzano, F.E., Fenoll, C., Escobar, C. 2015. Developmental pathways mediated by hormones in nematode feeding sites. In: *Advances in Botanical Research. Plant*

nematode interactions: A View on Compatible Interrelationships. Edited by Carolina Escobar and Carmen Fenoll. Elsevier. Volume 73, March 2015, Pages 167–188.

Cabrera, J., Díaz-Manzano, F.E., Barcala, M., Arganda-Carreras, I., de Almeida-Engler, J., Engler, G., Fenoll, F., Escobar, C. 2015. Phenotyping nematode feeding sites: Three dimensional reconstruction and volumetric measurements of giant cells induced by root-knot nematodes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 206(2):868-80.

Cabrera, J., Fenoll, C., Escobar, C. 2015. Genes co-regulated with LBD16 in nematode feeding sites inferred from in silico analysis show similarities to regulatory circuits mediated by the auxin/cytokinin balance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* Feb 9:0.

Cabrera, J., Barcala, M., Fenoll, C., Escobar, C.. 2015. The Power of Omics to Identify Plant Susceptibility Factors and to Study Resistance to Root-knot Nematodes. *Curr Issues Mol Biol.* 11(19):53-72.

Cabrera, J., Barcala, M., García, A., Rio-Machín, A., Medina, C., Jaubert-Possamai, S., Favory, B., Maizel, A., Ruiz-Ferrer, V., Fenoll, C., Escobar, C. 2016. Differentially expressed small RNAs in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs. *New Phytol.* 209(4):1625-1640.

Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., Fenoll, C. 2015. Overview of root-knot nematodes and giant cells In: *Advances in Botanical Research. Plant nematode interactions: A View on Compatible Interrelationships*. Edited by Carolina Escobar and Carmen Fenoll. Elsevier. Volume 73, March 2015, Pages 1–32.

Portillo, M., Cabrera, J., Lindsey, K., Topping, J., Andres, M.F., Emiliozzi, M., Oliveros, J.C., Garcia-Casado, G., Solano, R., Koltai, H., Resnick, N., Fenoll, C., Escobar, C. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with *Arabidopsis*: a functional role for gene repression. *New Phytol.* 197(4): 1276-1290.

Clara Montesinos Herrero



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada: “Evaluation of alternatives to synthetic fungicides to control citrus postharvest diseases” en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universitat Politècnica de València (UPV). La tesis ha sido realizada en el Laboratori de Patologia del Centre de Tecnologia Postcollita (CTP) del Institut Valencià d’Investigacions Agràries (IVIA) bajo la dirección científica del Dr. Lluís Palou y la tutoría académica en la UPV de la Dra. Nuria Martínez Navarrete. El tribunal estuvo formado por el Dr. Josep Usall, Jefe del Programa Postcollita del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Lleida; el Dr. Gianfranco Romanazzi, del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia; y el Dr. Pau Talens, del Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPV. La Tesis recibió la calificación de Sobresaliente Cum Laude con Mención Internacional.



De izquierda a derecha, Gianfranco Romanazzi, Josep Usall, Clara Montesinos, Pau Talens y Lluís Palou.

DE LOS SOCIOS

Mediante las investigaciones de esta tesis doctoral se han evaluado nuevos tratamientos de poscosecha con soluciones acuosas de preservativos alimentarios, como el sorbato potásico o el benzoato sódico, choques breves de dióxido de carbono y oxígeno, fumigaciones con amoníaco, y combinaciones de algunos de estos tratamientos para el control de las podredumbres verde y azul de los cítricos, causadas respectivamente por los hongos patógenos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. La implementación potencial de alguna de estas tecnologías novedosas podría contribuir a la necesaria reducción del uso de fungicidas químicos contaminantes en poscosecha de frutos cítricos. Por otra parte, se ha determinado el efecto de la especie y cultivar del fruto huésped en su susceptibilidad a las mencionadas podredumbres y se ha relacionado esta susceptibilidad con ciertos atributos de calidad del fruto.

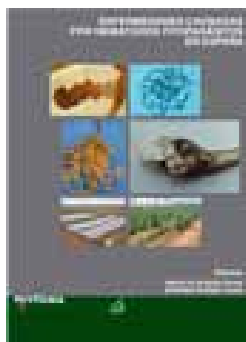
También se ha elaborado un ranking de las variedades comerciales de naranja y mandarina más importantes en España en función de su susceptibilidad a las podredumbres verde y azul. Estas investigaciones han dado lugar a una revisión invitada y cinco artículos científicos en revistas indexadas en el Journal Citation Reports (JCR®, WOK), seis comunicaciones a congresos científicos internacionales y dos a congresos nacionales, y cuatro artículos técnicos de divulgación en castellano.



ENFERMEDADES CAUSADAS POR NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN ESPAÑA

Editado por: María Fe Andrés Yeves y Soledad Verdejo Lucas

Publicado por: Phytoma-España. ISBN: 978-84-935247-6-0

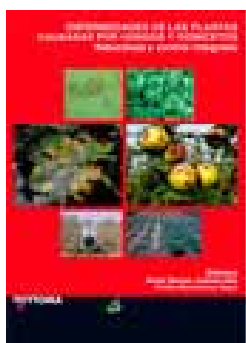


CONTENIDO: Nematodos fitoparásitos. Detección, extracción y diagnóstico de nematodos fitoparásitos. Interacción planta-nematodo: Mecanismos de patogénesis celular. Interacciones planta-nematodo: Resistencia vegetal. Dinámica de poblaciones, epidemiología y umbrales de daño. Estrategias de control integrado de nematodos fitoparásitos. Nematodos de cuarentena en España. Nódulos en las raíces de tomate (*Meloidogyne* spp.). Quistes en las raíces de la patata (*Globodera* spp.). Quistes en las raíces de los cereales (*Heterodera avenae*). Decaimiento de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*). Lesiones en las raíces de frutales (*Pratylenchus vulnus*). Deformación de bulbos de ajo y cebolla (*Ditylenchus dipsaci*). Manchas foliares en el arroz y la fresa (*Aphelenchoides* spp.). Ápice blanco de las hojas del arroz. Rizado de las fresas. Marchitamiento de los pinos (*Bursaphelenchus xylophilus*). Transmisor del virus del entrenudo corto de la vid (*Xiphinema index*)

ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS CAUSADAS POR HONGOS Y OOMICETOS. NATURALEZA Y CONTROL INTEGRADO

Editado por: R. M. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí

Publicado por: Phytoma-España. ISBN: 978-84-935247-5-3



CONTENIDO: Los Hongos y Oomicetos Fitopatógenos. Infección y Patogénesis en las Micosis Vegetales. Manejo Integrado de Enfermedades Causadas por Hongos. Muerte de Plántulas. Podredumbre Radical de la Encina y el Alcornoque. Colapso del Melón Asociado a Hongos Fitopatógenos. Enfermedades Fúngicas de la Madera de la Vid. Mildiu del Girasol. Tizones de los Cereales. Fusariosis Vascular del Garbanzo. Verticilosis del Olivo. Oídio de las Cucurbitáceas. Repilo del Olivo. Rabia del Garbanzo. Moteado del Manzano. Podredumbre Parda del Melocotonero.

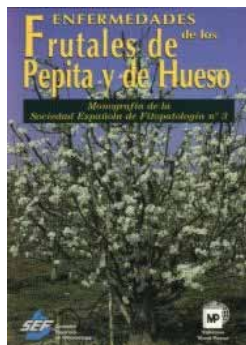
HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS EN FITOPATOLOGÍA

Editado por: V.Pallás, C.Escobar, P.Rodriguez-Palenzuela, J.F.Marcos

Publicado por: Mundi Prensa Libros SA-SEF. ISBN: 978-84-847631-9-2



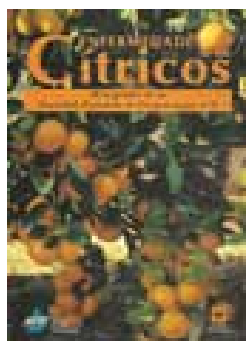
CONTENIDO: Aislamiento e identificación de genes de fitopatógenos. Cambios en la expresión génica. Transcriptómica. Proteómica. Herramientas bioinformáticas. Análisis de la variabilidad de los virus de plantas. Estrategias moleculares en el diagnóstico y análisis de la diversidad bacteriana en plantas. Estimación de la diversidad genética en hongos fitopatógenos. Utilización de marcadores moleculares en el estudio de nematodos fitoparásitos. Plásmidos y transposones para la manipulación de fitobacterias gram negativas. Transformación genética aplicada al estudio de la patogénesis fúngica. Tecnología de proteínas fluorescentes. Análisis de promotores mediante el uso de genes delatores. Aplicación de la biotecnología al control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. Hidrolasas y genes fúngicos. Identificación y diseño de péptidos antimicrobianos y su aplicación en protección. Interferencia por RNA (RNAi) en el control de virosis. RNAs autocatalíticos: ribozimas de cabeza de martillo. Genes de resistencia a virus fitopatógenos en especies de interés agronómico. Anticuerpos recombinantes.

ENFERMEDADES DE LOS FRUTALES DE PEPITA Y HUESO**Editado por:** E.Montesinos, P.Melgarejo, M.A.Cambra, J.Pinochet**Publicado por:** Mundi Prensa Libros SA-SEF. ISBN: 84-7114-916-8

CONTENIDO: Introducción. Enfermedades causadas por viroides, virus, fitoplasmas o transmisibles por injerto. Enfermedades causadas por bacterias. Enfermedades causadas por hongos. Enfermedades causadas por nematodos. Enfermedades de replantación en frutales. Anejos. Relación de patógenos citados en este libro. Glosario. Fotos en color.

PATOLOGÍA VEGETAL (2 VOLUMENES)**Editado por:** G.Llácer, M.M.López, A.Trapero, A.Bello**Publicado por:** Mundi Prensa Libros SA - Phytoma. ISBN: 84-921910-5-8

CONTENIDO: Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas. Patogenésis de virus de plantas. Resistencia a virus de plantas. ARNs satélites y ARNs defectivos interferentes. Viroides. Diagnóstico de virosis: técnicas clásicas. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales. Transmisión de virus de plantas por insectos vectores. Epidemiología de las viroides. Métodos de control de las virosis. Lista de virosis descritas en los distintos. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. Biología molecular de las interacciones entre plantas y bacterias fitopatógenas. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas. Epidemiología de las bacterias. Métodos de control de las bacterias. Los hongos fitopatógenos. Principios generales de epidemiología y control de las micosis. Mildius. Oídios. Royas. Carbones. Micosis foliares: necrosis, agallas y podredumbres. Micosis: Chamcros. Micosis vasculares. Micosis radicales. Micosis de la madera. Micosis de los productos cosechados. Las angiospermas parásitas. Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. Aplicación de técnicas moleculares a la caracterización de nematodos fitoparásitos. Interacción nematodos-virus. La transmisión de nematodos a través de semillas y bulbos: consecuencias epidemiológicas. Selección de patrones de frutales de hueso frente a nematodos.

ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS**Editado por:** N. Durán, P. Moreno**Publicado por:** Mundi Prensa Libros SA. ISBN: 84-7114-86:

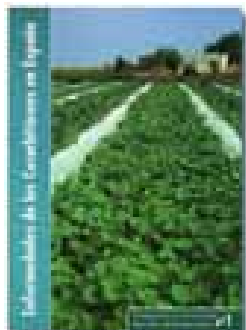
CONTENIDO: En este libro se describen las distintas enfermedades que afectan a los cítricos en España. Se ha dedicado un capítulo a describir las medidas generales de prevención y control de enfermedades, como al saneamiento, cuarentena y certificación que completan las medidas específicas recomendadas para cada una de ellas. El libro presenta la información puesta al día, en un lenguaje sencillo, aun para cualquier lector no especializado en el tema.



ENFERMEDADES DE LAS CUCURBITÁCEAS EN ESPAÑA

Editado por: J.R. Díaz-Ruíz, J. García-Jiménez

Publicado por: Phytoma-España. ISBN: 84-605-0858-7



CONTENIDO: Introducción. Enfermedades producidas por bacterias y fitoplasmas. Enfermedades producidas por hongos (enfermedades de raíz y cuello, enfermedades vasculares, enfermedades de la parte aérea). Enfermedades producidas por virus (virus transmitidos por pulgones, virus transmitidos por hongos, virus transmitidos por mosca blanca, virus transmitidos). Enfermedades producidas en condiciones especiales. Plantas parásitas. Fisiopatías. Anejos .

INFORMACIÓN, DISTRIBUCIÓN y VENTA:

<http://www.phytoma.com/tienda/category/12-libros>

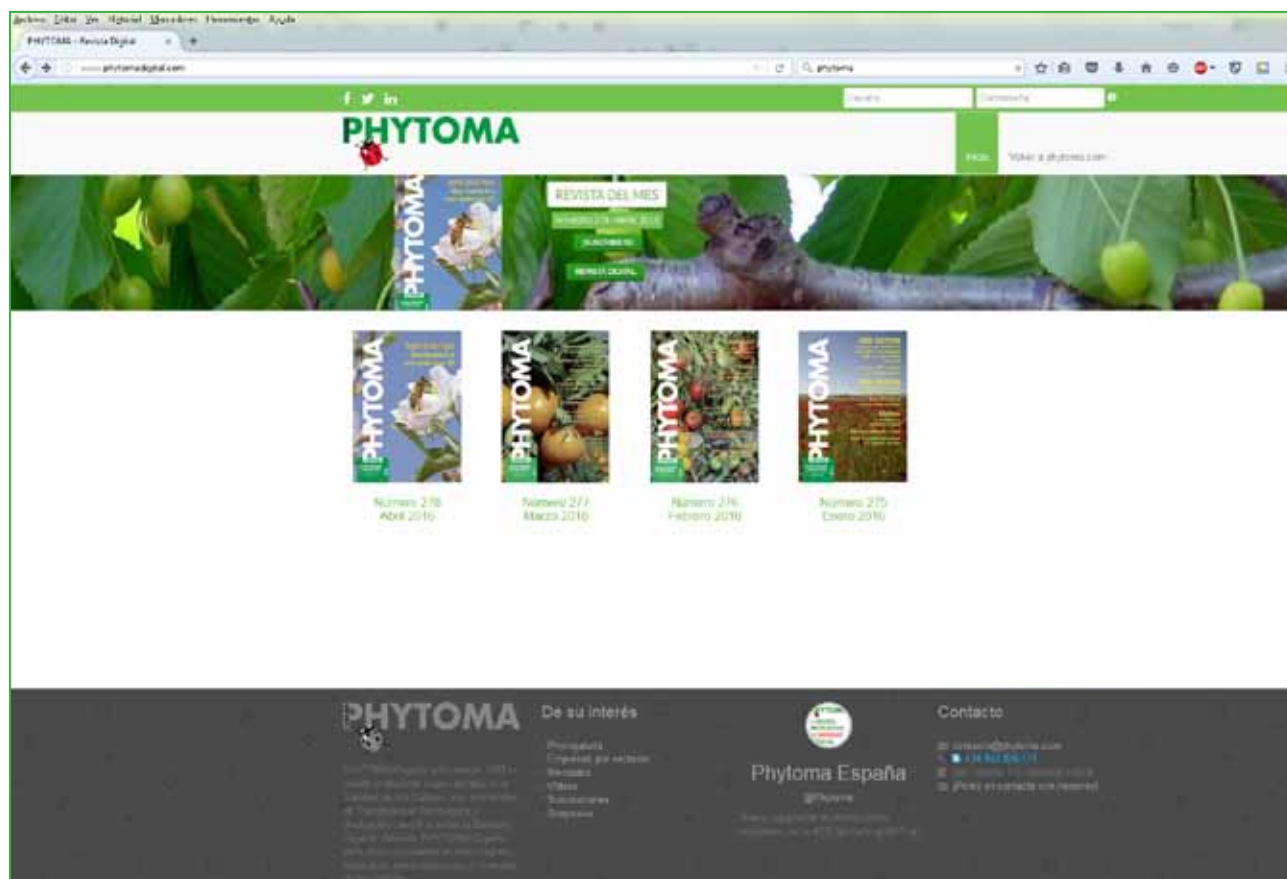
OTROS LIBROS DE INTERÉS EN WEB-SEF:

Podéis encontrar una completa y actualizada relación de libros de interés fitopatológico publicados por diferentes Sociedades Científicas o Editoriales en la web-SEF en:

http://sef.es/libros.php?id_aplic=32&id_area=2

PHYTOMA-ESPAÑA EN VERSIÓN DIGITAL:

<http://www.phytomadigital.com>





HONGOS y OOMICETOS

First report of *Neofabraea vagabunda* causing branch cankers on olives in Spain. Romero, J., Raya, M.C., Roca, L.F., Moral, J., & Trapero, A. 2016. Plant Disease 100 (2):527, DOI: 10.1094/PDIS-06-15-0657-PDN

Characterization of *Cylindrodendrum*, *Dactylonectria* and *Ilyonectria* isolates associated with loquat decline in Spain, with description of *Cylindrodendrum alicantinum* sp. nov. Agustí-Brisach, C., Cabral, A., González-Domínguez, E., Pérez-Sierra, A., León, M., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Oliveira, H., & Armengol, J. 2016. European Journal of Plant Pathology 145: 103-118, DOI: 10.1007/s10658-015-0820-7

First report of *Pythium spiculum* causing root rot on wild-olive in Spain. Gonzalez, M., Serrano, M.S., & Sanchez, M.E. 2016. Plant Disease 100 (5): 1023, DOI: 10.1094/PDIS-10-15-1133-PDN

First report of Root and Crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on Strawberry in Spain. Chamorro, M., Aguado, A., and De los Santos, B. Plant Disease, *First look*, DOI: 10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN

First report of *Phaeoacremonium minimum* causing Wood decay in nursery plants of almond in Spain. Marín-Terrazas, M., Ramos-Sáez de Ojer, J.L., López-Manzanares, B. & Gramaje, D. Plant Disease, *First look*, DOI: 10.1094/PDIS-11-15-1310-PDN

First report of *Phytophthora pseudosyringae* causing Stem canker on *Fagus sylvatica* in Spain. Redondo, M.A., Oliva, J. Plant Disease, *First look*, DOI: 10.1094/PDIS-12-15-1497-PDN

First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea*, the causal agent of Gray mold, from strawberry fields in Spain. Fernandez-Ortuno, D., Tores, J.A., Perez-Garcia, A., and de Vicente, A. Plant Disease, *First look*, DOI: 10.1094/PDIS-02-16-0172-PDN

First report of Black heart of pomegranate caused by *Alternaria alternata* in Spain. Vicent, A., Mira, J.L., Bartual, J., Beltran, V., Taberner, V. & Palou, L. Plant Disease, *First look*, DOI: 10.1094/PDIS-03-16-0265-PDN

PATÓGENOS EN ESPAÑA

BACTERIAS

***Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolated from weeds in bean crop fields.** Fernández-Sanz, A.M., Rodicio, M.R., and González, A.J. 2016. Letters in Applied Microbiology 62: 344-348. DOI: 10.1111/lam.12556.

VIRUS y VIROIDES

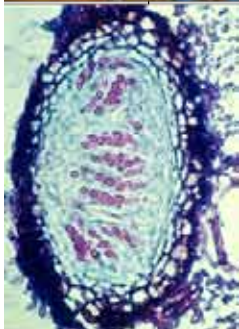
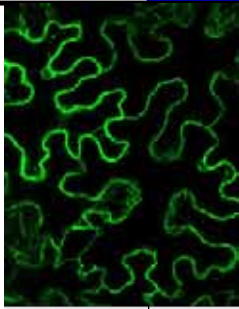
Natural infection of *Stevia rebaudiana* by *Cucumber Mosaic Virus* in Spain and by *Sclerotium rolfsii* in Greece. Chatzivassiliou, E.K., Giakountis, A., Testa, A., Kienle, U., & Jungbluth, T. 2016. Plant Disease 100 (5): 1029, DOI: 10.1094/PDIS-10-15-1149-PDN

First report of a novel *Melon necrotic spot virus* watermelon strain in Spain. Ruiz, L., Crespo, O., Simon, A., Gomez, J., and Janssen, D. 2016. Plant Disease 100 (5): 1031. DOI: 10.1094/PDIS-11-15-1261-PDN

NEMATODOS

***Longidorus indalus* sp. nov., *Longidorus macrodorus* sp. nov., *Longidorus onubensis* sp. nov., *Longidorus silvestris* sp. nov., *Longidorus vallensis* sp. nov., and *Longidorus wicuoalea* sp. nov., *L. lusitanicus*, *L. vinearum* en: Unravelling the biodiversity and molecular phylogeny of needle nematodes of the genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) in olive and a description of six new species.** Archidona-Yuste, A., Navas-Cortés, J.A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J.E., Castillo, P. 2016. PLoS ONE 11, e0147689. DOI: 10.1371/journal.pone.0147689

***Xiphinema plesiopachtaicum* sp. nov., *Xiphinema vallense* sp. nov., and *Xiphinema astaregiense* sp. nov., *Xiphinema luci*, *Xiphinema madeirense* en: Cryptic diversity and species delimitation in the *Xiphinema americanum*-group complex (Nematoda: Longidoridae) as inferred from morphometrics and molecular markers.** Archidona-Yuste, A., Navas-Cortés, J.A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J.E., Castillo, P. 2016. Zoological Journal of the Linnean Society 176: 231-265. DOI: 10.1111/zoj.12316



5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASES

Fechas: 13 a 16 de junio 2016, Málaga



INFORMACIÓN: <http://www.tomatodiseases2016.es/web/>

1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FIRE BLIGHT OF ROSACEOUS PLANTS

Fechas: 5 a 8 de julio 2016, Girona



INFORMACIÓN: <http://www.intea.udg.edu/ISFB2016/>

8th IOBC/WPRS WORKING GROUP: INTEGRATED PROTECTION IN OAK FORESTS

Fechas: 23 a 27 de octubre de 2016, Córdoba



INFORMACIÓN: <http://www.iobcquercus2016.com/>

3rd HEMIPTERAN-PLANT INTERACTIONS SYMPOSIUM

Fechas: 4 a 8 de junio 2017, Madrid



INFORMACIÓN: <http://www.hpis2017.csic.es/>

OTRAS REUNIONES Y CONGRESOS DE INTERÉS EN WEB-SEF:

Podéis encontrar una completa y actualizada relación de Reuniones y Congresos de interés fitopatológico en la web-SEF

RESPUESTAS A PREGUNTAS DE EXÁMENES DE PATOLOGÍA VEGETAL

Pregunta: Control de virosis en producción de patata para consumo:

Respuesta: Uso de semilla pitorrada.

Pregunta: Fitoplasma:

Respuesta: agente patógeno que destruye o infecta el líquido o material celular de una planta.

Respuesta: Parte de una célula que causa toxicidad a las plantas.

Pregunta: *Forma specialis*:

Respuesta: La forma specialis puede afectar a varias plantas susceptibles de su ataque y el patovar solo a una.

Respuesta: Es una subclasificación entre patógenos que se diferencia uno de otro de la misma especie y estructura por tener patogenicidad sobre estructura botánica u otros seres.

Respuesta: Es una adaptación dentro de la especie patogénica hacia la especificidad de infección a una especie vegetal.

Pregunta: Patovar:

Respuesta: Es una subclasificación entre patógenos en el que siendo iguales estructuralmente, de la misma especie y patogénicos, pueden infectar a estructura distinta.

Respuesta: Se refiere a la biología de la especie patogénica.

Pregunta: Oospora y ascospora:

Respuesta: Diferentes estructuras de dispersión para diferentes situaciones ambientales (humedad, temperatura) y producidas en ascas y esclerocios.

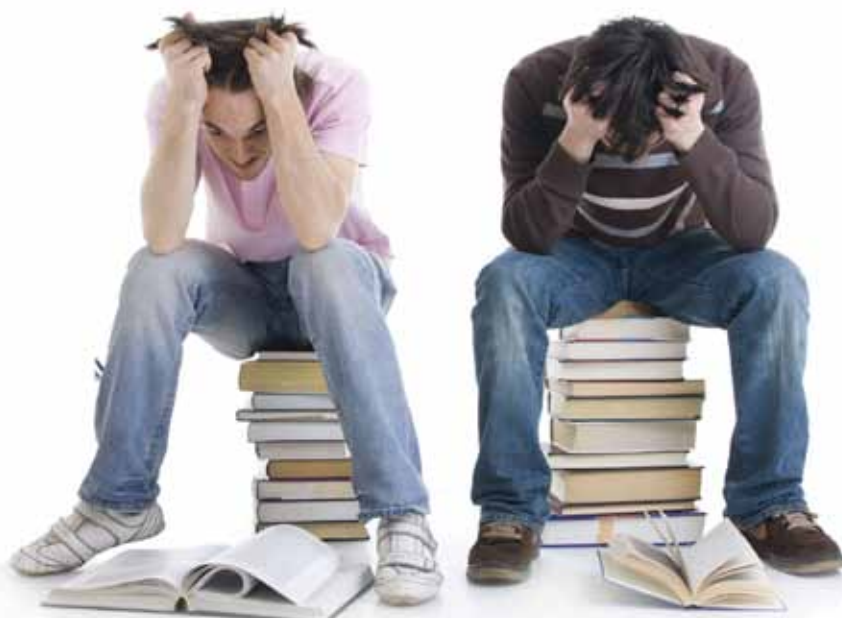
Respuesta: Son hifas las cuales tienen diferentes naturaleza.

Pregunta: *Pratylenchus* y *Heterodera*

Respuesta: Las características de estos dos organismos está en la forma de nutrición de cada uno, siendo diferente.

Pregunta: Tipos de ascas y conidiomas en los hongos fitopatógenos

Respuesta: Los ascas son esporas producidas por los hongos ascomicetos de las cuales provienen del asca.



CRISPR/Cas9 COMO HERRAMIENTA EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

Sarah B. LADE, Vicente MEDINA

Grupo “Interaccio Planta-Microorganisme-Vector” (IMPLAMIC) y centro AGROTECNIO Universidad de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida

Parece que, gracias a una tecnología revolucionaria, ha llegado el momento para los fitopatólogos de descubrir con más facilidad el misterio que envuelve la genómica de la co-evolución planta/patógeno, así como los factores del huésped que controlan la resistencia de las plantas o vulnerabilidad a la infección. Desde que fuera identificado y reproducido el sistema inmunitario adaptativo de los procariotas, basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (“clustered regularly interspaced short palindromic repeats”), también llamado sistema CRISPR, y, concretamente, el Tipo II asociado a una nucleasa (“CRISPR-associated nuclease 9”), o CRISPR/Cas9, son muchos los grupos de investigación que han empezado a utilizarlo y perfeccionarlo como una técnica de mutación génica. Este sistema se compone básicamente de una enzima de restricción, diseñada a partir de las CRISPR, que induce una mutación dirigida en el ADN gracias a un ARN sintético quimera que actúa como guía (sgRNA¹) y a la secuencia específica de una nucleasa, Cas9, que le acompaña. La Cas9 es guiada de una forma muy precisa por el sgRNA hacia la secuencia diana del ADN adyacente a un protoespaciador (PAM, “protospacer adjacent motif NGG”)². Una vez localizado el locus, la Cas9 actúa sobre el ADN causando roturas en sus dos cadenas (“double strand breaks” o DSBs), que son reparadas por una de las dos rutas intracelulares existentes: unión no homóloga (“non homologous joining” o NHEJ), produciendo pequeñas inserciones/

delecciones (“indels”) y desplazamientos (“frameshifts”), o reparación homóloga directa (“homology-directed repair” o HDR) provocando mutaciones puntuales específicas o inserción de secuencias (Van der Oost et al., 2014; Jian, 2015) (**Figura 1**).

La tecnología CRISPR/Cas9, en el caso de su aplicación a plantas³, se ha aplicado tanto en plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*) como en plantas cultivadas (trigo, sorgo, arroz, soja) y con diferentes planteamientos (Belhaj et al., 2013, 2015; Jiang et al., 2013; Shan et al., 2013) (ver explicación esquemática del proceso en **Figura 2**). La mayoría de los proyectos que utilizan esta herramienta de edición del genoma van dirigidos a obtener y conocer los efectos de mutaciones inducidas. Así, mediante el sistema CRISPR/Cas9 se han planificado mutaciones que modifican uno o varios genes (“knock out”), pero también se producen otras fuera del objetivo (“off-target” o “target out”)⁴; se buscan métodos para evitar ésta últimas (Schiml et al., 2014); o se silencian rutas y/o activan genes (Bortesi & Fischer, 2015), explorando así aspectos nuevos de la genómica funcional de las plantas con lo que su desarrollo está creciendo exponencialmente. En todos los trabajos, se destaca la importancia de CRISPR/Cas9 dentro del campo de la ingeniería genética, o en su marco actual más amplio, la llamada biología sintética, llegando a considerarla incluso como una tecnología revolucionaria (Doudna & Charpentier, 2014).

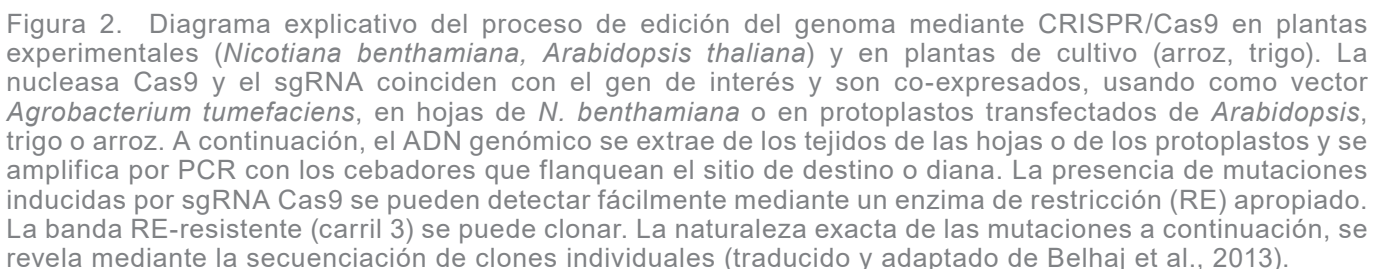
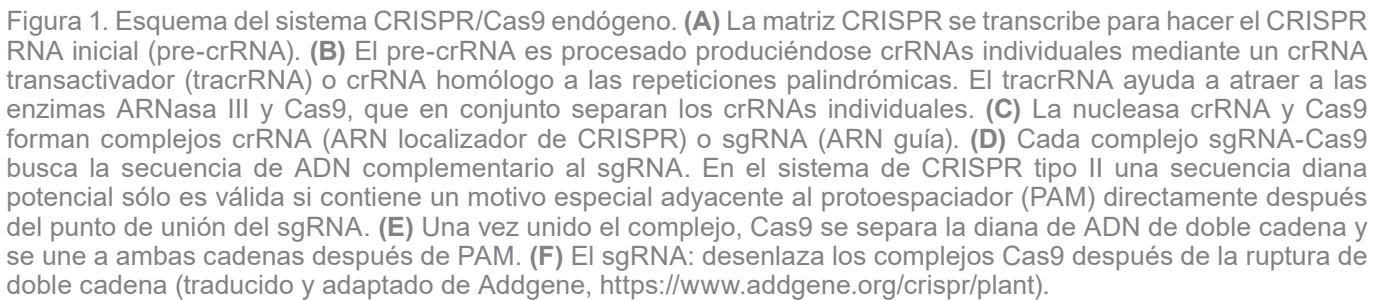
¹ sgRNA supone la fusión sintética de dos ARNs no codificantes: Crispr RNA (crRNA) y un ARN trans-activador (tracrRNA) (Jinek et al., 2012). El sgRNA está formado por 20-22 nucleótidos diseñados y sintetizados como oligonucleótidos. Lei et al., (2014) han desarrollado diseños de sgRNAs para más de 20 especies de plantas. También se han desarrollado muchos vectores y “kits” para la edición, mediante CRISPR-Cas9, de genomas de (Xing et al., 2014; Kumar and Jain, 2015).

² El motivo adyacente pro-espaciador (PAM; NGG/NAG) se sitúa en el extremo 3' inmediatamente después del punto diana.

³ Ver revisión de Hsu, Lander & Zhang (2014) sobre otras aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9.

⁴ Ver revisión de Endo (2015) sobre el significado e importancia de tales mutaciones.

--	--



Este artículo no pretende ser una revisión completa sobre el uso del sistema CRISPR/Cas9, pues sólo comenta algunos trabajos recientes y relacionados con Patología Vegetal, concretamente aquellos implicados en el control de fitopatógenos o estrés biótico. No se resumen, pues, publicaciones más centradas en el estudio del genoma de los microorganismos que pueden incluir fitopatógenos como, por ejemplo, el realizado por Louwen et al. (2014) sobre el papel que tiene el sistema CRISPR-Cas en la virulencia de las bacterias patógenas, y que recoge entre otras informaciones, su aplicación en la caracterización de tres grupos de cepas de *Erwinia amylovora* según su distribución geográfica (Rezzonico et al., 2011). Ni tampoco los relacionados con el estrés abiótico, aunque éstos se superpongan algo en esta revisión, porque, hasta la fecha, no se han llevado a cabo estudios precisos que relacionen CRISPR/Cas9 y el control de la respuesta abiótica. No obstante, como la modulación de la tolerancia al estrés abiótico está gobernada por múltiples genes implicados en la señalización y regulación de rutas metabólicas, y el sistema CRISPR/Cas9 puede actuar sobre genes múltiples y funcionalmente redundantes, seguramente pronto se publicarán trabajos que los relacionen (Jain, 2015). También se dejan a un lado las importantes implicaciones que tiene el sistema CRISPR/Cas9 en terapia génica humana y/o animal⁵, así como la terapia general en plantas, entendiendo que este artículo divulgativo es sólo una contribución más para destacar la relevancia del sistema CRISPR/Cas9 también en Patología Vegetal.

Así, pues, y como ejemplos, nos centramos sólo en cuatro trabajos o líneas e investigación. El primer trabajo a comentar es el de Fang y Tilere (2016), que añade información sobre la genómica funcional de *Phytophthora sojae* y el posible uso de tal información en el control de la enfermedad que induce. El segundo es el logro conseguido por Wang et al. (2014),

al obtener una cepa de trigo resistente a oídio usando el sistema CRISPR/Cas9. Un tercer bloque de estudios supone el control de enfermedades inducidas por infecciones simples y múltiples de geminivirus, concretamente del complejo viral relacionado con el virus del rizado amarillo del tomate o virus de la cuchara, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y de la cepa severa del virus de las puntas rizadas de la remolacha, *Beet severe curly top virus* (BSCTV) (Ali et al., 2015; Ji et al., 2015; Zaidi et al., 2016). Por último, se resume, el reciente trabajo de Chandrasekaran et al. (2016) en el que se consigue utilizando esta tecnología, conferir una amplia resistencia a diferentes géneros de virus fitopatógenos de la familia *Potyviridae* en pepino “no transgénico”. A partir de ellos se comentarán ciertos avances en el uso del sistema CRISPR, y el prometedor futuro que plantea su uso en Patología Vegetal⁶.

Genómica funcional de *Phytophthora sojae*

En este estudio, se usó el sistema CRISPR/Cas9 para editar de forma sencilla y eficiente el genoma del eucarionte *Phytophthora sojae*. Para ello, Fang y Tilere (2016) utilizaron como diana, el gen efector Avr4/6 para la secuencia consenso RXLR (Arg-X-Leu-Arg), observando que en ausencia del patrón homólogo, la reparación de las roturas de dobles cadenas (DSBs) inducidas por Cas9 en *P. sojae* están mediadas por extremos no homólogos (NHEJ), dando como resultado, principalmente, a pequeñas inserciones/delecciones. La mayoría de los mutantes que obtuvieron fueron homocigotos, presumiblemente debido a la modificación de genes provocada por la escisión mediada por Cas9 de alelos no mutantes. Cuando estaba presente el ADN de los donantes, observaron reparación dirigida homóloga (HDR), que dio como resultado la sustitución del gen diana por el ADN de los donantes.

Al probar la virulencia específica de varios mutantes obtenidos mediante NHEJ

⁵ Con importantes resultados, por ejemplo, en el control del virus del SIDA (Liao et al., 2015) y en la cura del cáncer (Kim et al., 2015).

⁶ Para revisión del concepto y metodología relacionada con los diferentes sistemas CRISPR, incluso productos relacionados, disponibles ya en el mercado visitar, por ejemplo, http://www.scbt.com/crispr-cas9_system.html, o, <http://onlinedigeditions.com/publication/frame.php?i=223322&p=&pn=&ver=flex>.

y HDR, los autores no sólo confirmaron la contribución de AVR4/6 en el reconocimiento de los loci del gen R, Rps4 y Rps6 de soja, sino que también descubrieron la relación de estos dos loci con la resistencia. Así, concluyeron que el sistema CRISPR/Cas9 es una poderosa herramienta para el estudio de la genómica funcional en *P. sojae*, lo que puede proporcionar nuevas vías para un mejor control de este patógeno.

Resistencia a oídio en trigo harinero

Mediante las tecnologías TALEN (transcription activator-like effector nuclease) y CRISPR/Cas9, Wang et al. (2014) realizaron mutaciones en un genoma poliploide, como es el del trigo harinero (*Triticum aestivum*), concretamente mutaciones en tres homóalelos que determinan locus de resistencia a oídio (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) (Mildew-resistance Locus, MLO) (Elliot et al., 2002),

lo que supone la primera cita de modificación múltiple y simultánea de homóalelos. En el trabajo, se demuestra que la mutación inducida por TALEN de los tres homólogos TaMLO en la misma planta confiere amplia resistencia al oídio. Por otra parte, se utiliza la tecnología CRISPR/Cas9 para generar plantas transgénicas portadoras de mutaciones en el alelo TaMLO-A1, con lo que se concluye que la ingeniería dirigida a la inserción de ADN en el genoma de trigo harinero, a través de la recombinación no homóloga mediada por TALEN es viable, y proporciona un marco metodológico para mejorar cultivos poliploides.

Resistencia a geminivirus

Son dos los trabajos publicados (Ali et al., 2015; Ji et al., 2015) sobre el uso del sistema CRISPR/Cas9 para el control de geminivirus, el primero sobre el complejo viral del begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*

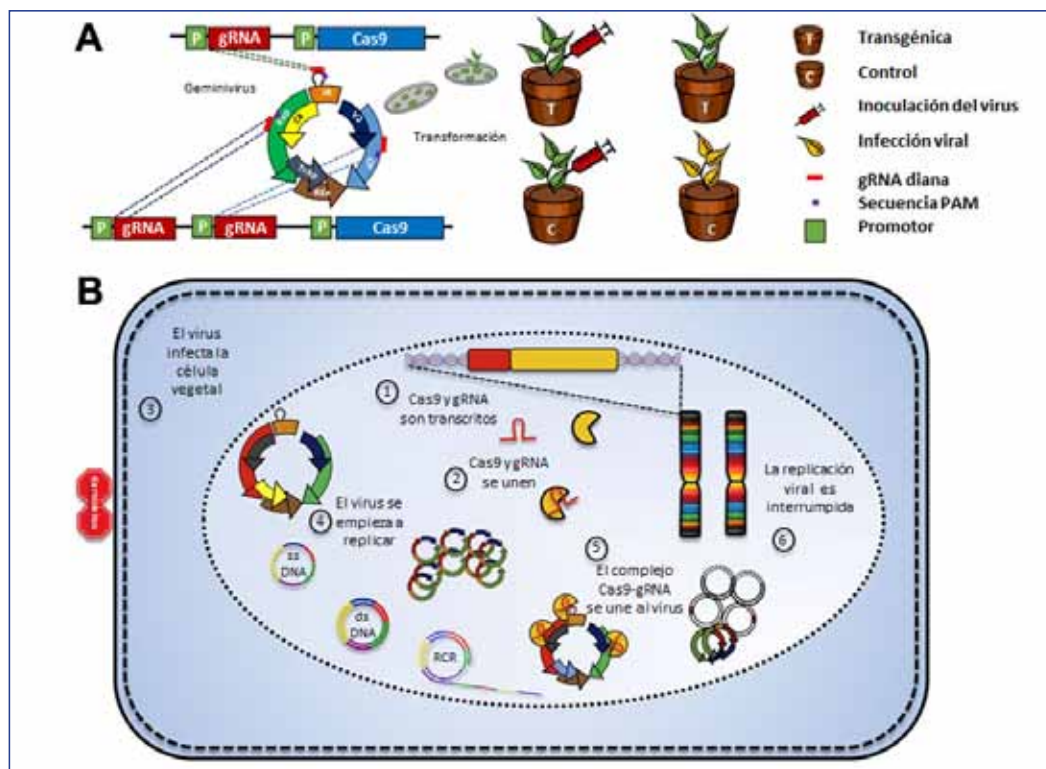


Figura 3. Sistema CRISPR/Cas9 utilizado para generar resistencia a virus fitopatógenos (A) Representación gráfica del genoma de un geminivirus y arquitectura molecular de los componentes del complejo CRISPR/Cas9 adaptado a las dianas del virus. Transformación estable del sistema CRISPR/Cas9 en plantas. Las plantas que expresan CRISPR/Cas9 son inoculadas con el virus (jeringa roja) y en condiciones controladas se observa si aparece resistencia. Las plantas transgénicas CRISPR/Cas9 (T) muestran resistencia al virus tras la agroinfección, mientras que las plantas no transgénicas inoculadas con el virus (C) desarrollan los síntomas típicos de la enfermedad, indicando susceptibilidad. (B) Interferencia de CRISPR/Cas9 con el virus en el núcleo celular. (1) Los componentes del complejo CRISPR/Cas9, gRNA y Cas9, se expresan a partir del genoma de la planta. (2) El complejo empieza a producir copias. (3) El virus infecta la célula. (4) El ADN de cadena sencilla (SSDNA) del geminivirus se replica y produce múltiples copias. (5) El complejo gRNA/Cas9 se une a los puntos diana de la doble cadena de DNA y (6) la rompe formando dobles roturas de la cadena (DSBs) que luego se reparan por unión no homóloga de los extremos (NHEJ). Las DSBs pueden conducir a la degradación del genoma viral (traducido de Zaidi et al., 2016).

(TYLCV), y el segundo sobre el curtovirus *Beet severe curly top virus* (BSCTV) (Figura 3).

Mediante la inserción de sgRNAs en *Tobacco rattle virus* (TRV) como plásmido vector y usando plantas de *Nicotiana benthamiana* que sobreexpresan la nucleasa Cas9 (Nb-Cas9OE), Ali et al. (2015) produjeron mutaciones y roturas en el fragmento de lectura abierta (ORF) y en la región intergénica (IR) de TYLCV. En primer lugar, diseñaron sgRNAs para modificar secuencias codificantes y no codificantes del genoma de TYLCV, que se insertaron en el genoma del vector TRV. Los

sgRNAs se introdujeron así en las plantas Nb-Cas9OE, que diez días más tarde se agroinfiltraron con clones infecciosos de TYLCV. Se comprobó que se impedía la replicación viral y se reducía la expresión de síntomas de forma significativa. Por tanto, el sistema de CRISPR/Cas9 conduce a la degradación viral, gracias a las mutaciones introducidas en las secuencias diana. Además de estos claros resultados, los autores detectaron que todos los sgRNA-Cas9 tenían actividad de interferencia, pero aquellos dirigidos a la secuencia origen de replicación en la región intergénica (IR) del genoma de TYLCV eran los más eficaces. Por último, también observaron que, al

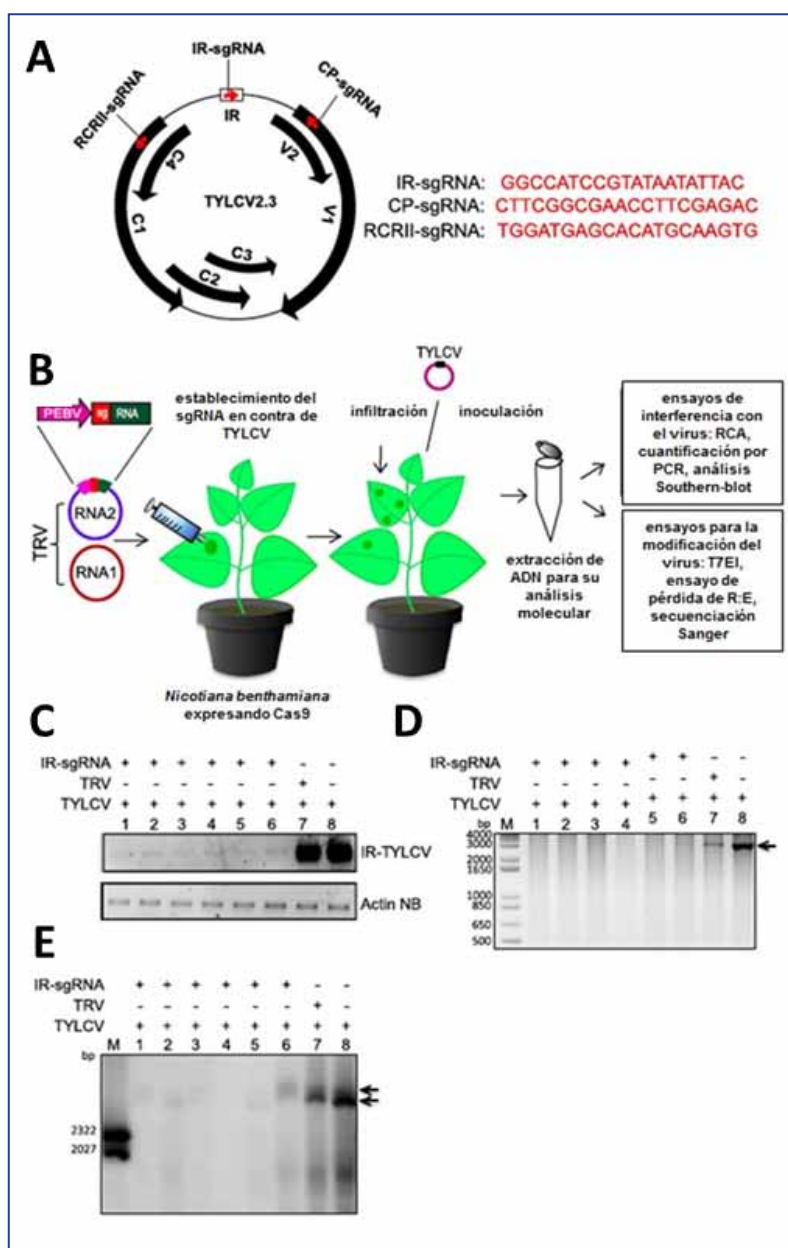


Figura 4. Interferencia mediada por CRISPR/Cas9 en la acumulación de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). (A) Diagrama de la organización del genoma de TYLCV. La secuencia diana se muestra en rojo a la derecha arriba. (B) Esquema del diseño experimental. Se agroinfiltra, en plantas que expresan Cas9, *Agrobacterium* conteniendo *Tobacco rattle virus* (TRV) como vector y con sgRNA específico para el genoma de TYLCV. TYLCV es infiltrado también en las plantas con Cas9OE establecida la infección con TRV. Las muestras fueron recolectadas para realizar los análisis moleculares a los 10–21 días post-infiltración (dpi). (C) El análisis por PCR semi-cuantitativa del DNA de TYLCV indica que la infiltración de TYLCV en las plantas Cas9OE acumula niveles más bajos que las plantas infiltradas con el vector TRV vacío. Se usa el genoma de *N. benthamiana* para normalizar. (D) Amplificación del genoma de TYLCV en los extractos vegetales. Las plantas con IR-sgRNA acumulan menos TYLCV-DNA que las que se inocularon con TYLCV y el vector TRV vacío. (E) Análisis mediante Southern blot de la acumulación de TYLCV-DNA en las plantas Cas9OE. EL TYLCV-DNA fue detectado mediante una sonda marcada con DIG ("DIG-labeled probe") contra una secuencia de 560-bp de la región IR. Las 6 plantas con IR-sgRNA que fueron infiltradas con TYLCV mostraron menor acúmulo de TYLCV-DNA que las que se inocularon con TYLCV y el vector TRV vacío. Las flechas en D y E indican la banda correspondiente a TYLCV-DNA (DIG: digoxigenina M: Marcador, NB: *N. benthamiana*, PEBV: promotor de Pea early browning virus, RE: enzima de restricción (autores: Ali et al., 2015).

programar un IR-sgRNA hacia la secuencia conservada (TAATATTAC) común a todos los geminivirus, se conseguía actuar sobre otros virus como *Merremia mosaic virus* (MeMV) (ver proceso experimental y resultados en **Figura 4**).

En el caso de BSCTV en *N. bethamiana* y, también, *Arabidopsis thaliana*, Ji et al. (2015) utilizaron una aproximación diferente para inhibir la replicación viral mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9 en el momento de la conversión del ADN de cadena sencilla (ssDNA) a ADN de cadena doble (dsDNA) durante el proceso de replicación. Para determinar si el complejo sgRNA/Cas9 podía inhibir activamente la replicación viral, en lugar de inducir roturas mediante plásmidos (p-Cambia T DNA llevando 1,8 copias del genoma de BSCTV), se seleccionaron sgRNA diseñados para llevar a cabo ensayos discriminatorios. Los resultados revelaron que no sólo el sistema CRISPR-Cas dirigido contra geminivirus se podía establecer en plantas creando plantas transgénicas inmunes al virus, sino que se podían identificar sgRNAs anti-virales que reconocieran lugares en cualquier región del genoma viral.

Recientemente, Zaidi et al. (2016) han realizado una revisión, examinando los anteriores estudios sobre geminivirus, considerando que quizás la rotura del genoma de los geminivirus puede acelerar la aparición de cepas que sean capaces de evadir el sistema Cas9. Lo que en principio sería posible, por ejemplo, vía mutagénesis de la secuencia PAM. Estos autores expresan esta preocupación por los efectos de las modificaciones en zonas no específicas del genoma ("off-target"), a pesar de que Baltes et al. (2015) demostraron que una Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) es también útil para mediar la interferencia del virus y eliminar las actividades inespecíficas en el genoma de la planta. Según estos autores, CRISPR/Cas9 se podría usar para descubrir cómo ha evolucionado el genoma viral para contrarrestar la inmunidad de la planta, o descubrir los factores del huésped que determinan la resistencia y vulnerabilidad a la infección.

Resistencia a ipomovirus y potyvirus (Familia Potyviridae)

En este trabajo se demuestra el desarrollo de resistencia a los virus en pepino (*Cucumis sativus* L.) mediante la utilización de la tecnología Cas9/sgRNA, al interrumpir la función del gen *elf4E* recesivo dirigiendo las construcciones Cas9/sgRNA a los extremos N' y C' de dicho gen. Los autores comentan que tras la aplicación de la tecnología Cas9/sgRNA, se observaron siempre pequeñas deleciones y SNPs ("single-nucleotide polymorphism") en las dianas de los genes *elf4E* en la generación T1 de plantas transformadas de pepino, y nunca fuera de ellos. Por otra parte, seleccionaron plantas heterocigóticas mutantes en *elf4E* no transgénicas para la producción de plantas de generación T3 homocigóticas. Estas plantas exhibieron inmunidad al ipomovirus *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) y a los potyvirus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Papaya ring spot mosaic virus-W* (PRSMV-W). Por el contrario, las plantas heterocigóticas mutantes y no mutantes fueron altamente susceptibles. Es, por tanto, por primera vez, a través de la tecnología CRISPR/Cas9, que se ha desarrollado resistencia a virus en el cultivo de pepino no transgénico, sin afectar visiblemente al desarrollo de las plantas, y sin retro-cruzamiento a largo plazo, lo que supone una nueva estrategia de control de virus fitopatógenos en una amplia gama de plantas de cultivo (**Figura 5**).

COMENTARIOS FINALES

El volumen de información generado alrededor del sistema CRISPR-Cas en los últimos años es tal, que es difícil resumirlo en un artículo divulgativo como este. Si se quiere tener una idea global de su historia, repercusión e importancia en general, se aconseja la lectura del artículo de Landers (2016) titulado "The Heroes of CRISPR". Este autor cita el año 1989 como el año en el que se observaron las secuencias repetidas palindrómicas en el ADN de la archaea *Haloferax mediterranei*, adaptada al ambiente extremófilo de las salinas de Santa Pola (Alicante), por parte de un joven investigador, el microbiólogo alicantino Juan Francisco Mojica, actual profesor titular de la Universidad de Alicante. A partir de tal hallazgo se descubrió el sistema complejo utilizado por la bacteria *Streptococcus thermophilus* para defenderse

de las infecciones por fagos y que ahora la ciencia utiliza con diferentes versiones para

modificar el genoma de plantas y animales (Tabla 1).

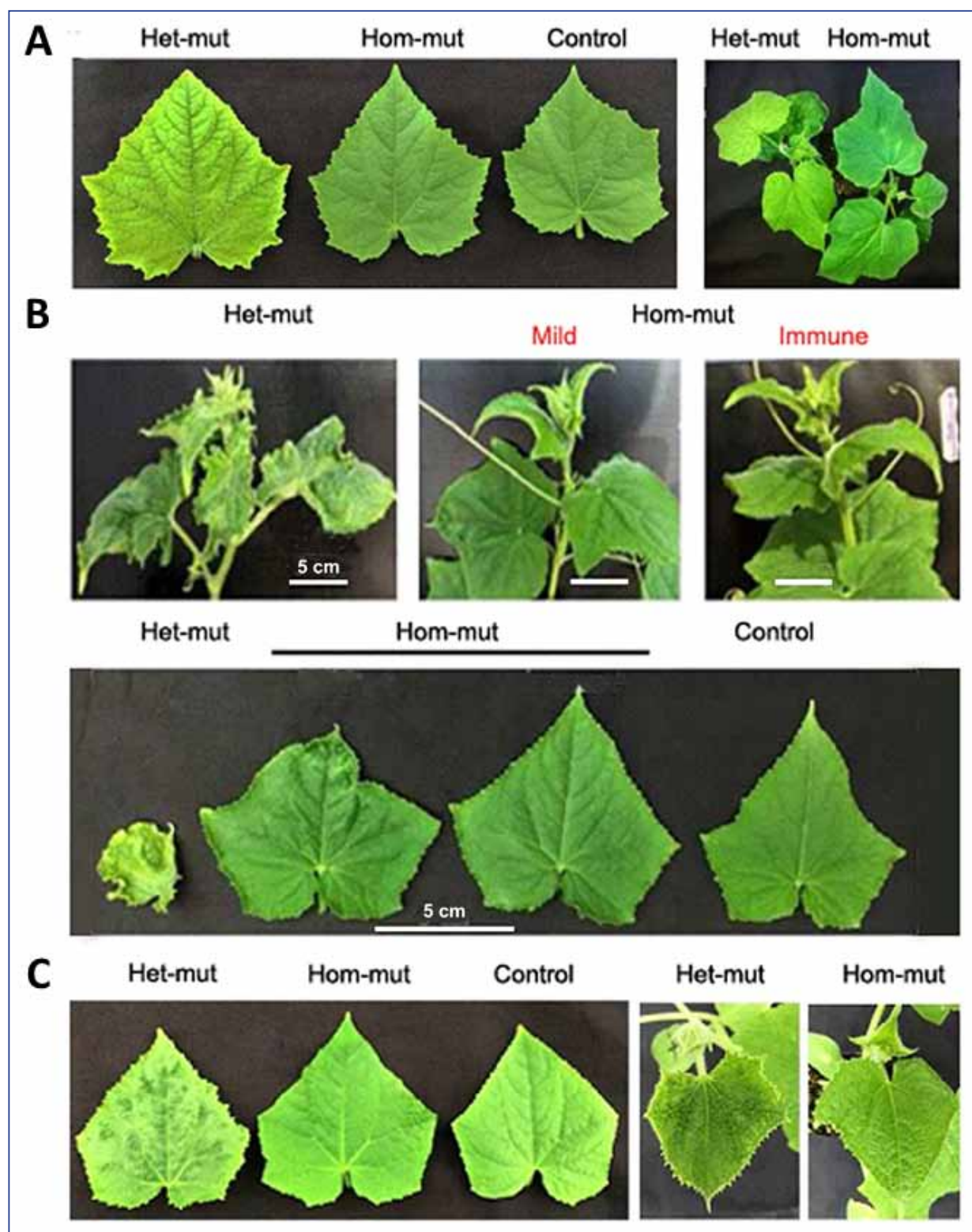


Figura 5. Mutantes eIF4E homocigóticos mostrando resistencia a la infección potyviral. (A) Síntomas inducidos por *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) en hojas y plantas de pepino mutantes heterocigóticas (Het-mut), mutantes homocigóticas (Hom-mut) y no inoculadas (control) de la generación T3, 10 dpi. (B) Síntomas inducidos por *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en hojas y plantas de pepino mutantes heterocigóticas (Het-mut), mutantes homocigóticas (Hom-mut) y no inoculadas (control) de la generación T3, 25 dpi. (C) Síntomas inducidos por *Papaya ring spot mosaic virus-W* (PRSV-W) en hojas y plantas de pepino mutantes heterocigóticas (Het-mut), mutantes homocigóticas (Hom-mut) y no inoculadas (control) de la generación T3, 21 dpi. (adaptado de Chandrasekaran et al., 2016).

Tabla 1. Clasificación y ejemplos de sistemas CRISPR (Landers, 2016)

Clase	Tipo	Subtipo	Atributos	Efector ejemplo	Organismo ejemplo	Referencias bibliográficas
Clase 1	Tipo I		Complejo efector con multisubunidades; Cas3	Cascade	<i>E. coli</i>	Brouns <i>et al.</i> , 2008
	Tipo III	III-A	Complejo efector con multisubunidades; Csm modulo efector, dirigido a ADN	Cas10-Csm	<i>S. epidermidis</i>	Marraffini and Sontheimer, 2008
		II-B	Complejo efector con multisubunidades; dirigido a ADN	Cmr	<i>P. furiosus</i>	Hale <i>et al.</i> , 2009
Clase 2	Tipo II		Efector sencillo; tracrRNA	Cas9	<i>S. thermophilus</i>	Bolotin <i>et al.</i> , 2005; Barrangou <i>et al.</i> , 2007; Sapranaukas <i>et al.</i> , 2011; Gasiunas <i>et al.</i> , 2012
					<i>S. pyogenes</i>	Deltcheva <i>et al.</i> , 2011; Jinek <i>et al.</i> , 2012; Cong <i>et al.</i> , 2013; Mali <i>et al.</i> , 2013
	Tipo V		Efector sencillo; Guiado por un ARN	Cpf1	<i>F. novicida</i>	Zetsche <i>et al.</i> , 2015

Los sistemas CRISPR se organizan principalmente en dos Clases: Clase 1, contiene efectores con multi-subunidades, y Clase 2, que contiene efectores de proteínas sencillos. Estas clases se subdividen en 5 (Makarova *et al.*, 2015), un tipo IV todavía es putativo y pertenece a la Clase 1. Aunque sólo la Clase 2 se ha podido usar en ingeniería genética, parece que hay diversos sistemas CRISPR (los sistemas tipo III-B se usan preferentemente para lograr mutaciones de ARN y no tanto de ADN [Hale *et al.*, 2009]).

La tecnología CRISPR/Cas9 (Clase 2, Tipo II) en sus diferentes versiones nos permite actualmente: generar dobles roturas en el ADN ("double strand breaks, DSBs), romper sólo una de las cadenas del ADN ("Nick") (mediante una Cas9 mutada), interferir con la transcripción (mediante una Cas9 catalíticamente inactiva o dCas9, que puede incorporar o no un péptido represor), activar o incrementar la expresión de un gen (mediante una Cas9 que incorpore un péptido activador), co-expresar dos ARNs guías (gRNAs) homólogos (mediante una dCas9 fusionada con una nucleasa FokI), aislar segmentos genómicos de interés (mediante una dCas9 fusionada con un epitopo "tag"), visualizar regiones específicas del genoma (mediante una dCas9 fusionada con una proteína fluorescente), seleccionar genes involucrados en diferentes procesos biológicos usando "pools" de librerías CRISPR, pre-validar experimentalmente plásmidos gRNAs y seleccionar un plásmido gRNA basado en una variedad de factores, tales como la presencia o ausencia de Cas9 y el número de genes. Es decir, ofrece un abanico de posibilidades lo suficientemente amplio y sencillo como para competir con otras técnicas de edición del genoma (TALEN y "Zinc finger nucleases") algo más complicadas y de difícil ejecución.

Según Barrangou (2015), aunque la

función principal de los sistemas establecidos CRISPR/Cas está en la defensa antiviral en las bacterias, un creciente grupo de evidencias indica que también desempeña papeles funcionales críticos más allá de la inmunidad, como pueda ser el control transcripcional endógeno. Además, los beneficios inherentes al mantenimiento de la homeostasis del genoma también vienen a costa de la reducción de la absorción de ADN beneficioso, y la prevención de adaptación estratégica para el medio ambiente. Esto abre nuevas vías para la investigación de los sistemas de CRISPR/Cas y su caracterización funcional más allá de la inmunidad adaptativa.

Para finalizar esta breve revisión, merece la pena repetir que el descubrimiento del sistema CRISPR, se debe al mencionado Juan Francisco Mojica, reivindicado por gran parte de la comunidad científica como su primer descubridor e incluso postulado como futuro premio Nobel español, aunque posiblemente comparta con otros científicos las primeras referencias (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005, 2009; Pourcel *et al.*, 2005). Y que las científicas que ratificaron la nomenclatura "CRISPR" y describieron la tecnología CRISPR/Cas9, la bióloga estadounidense Jennifer A. Doudna, de la Universidad de California en Berkeley y la microbióloga francesa Emmanuelle Charpentier, actualmente

investigadora, entre otros centros, del centro Helmholtz para la Investigación de la Infección, dependiente del Max Plank Institute, recibieron el Premio Príncipe de Asturias en 2015, entre otros muchísimos galardones y menciones honoríficas.

No obstante, al igual que en muchos proyectos de colaboración que han evolucionado con el tiempo, no hay un “padre” claro del sistema CRISPR, al que se le asigne de manera irrevocable el descubrimiento, que está redefiniendo la tecnología de la mutación genética como un axioma común. La controversia latente en materia de propiedad intelectual relacionada con la patente de CRISPR/Cas no ayuda en ese sentido⁷. Además, como la ciencia que rodea a este descubrimiento sigue a un ritmo que sobrepasa la burocracia, todavía

estamos sin una verdadera definición del proceso o producto a ojos de los organismos reguladores. Por tanto, el futuro derivado o asociado a esta tecnología va a ser muy emocionante, ya que con la tecnología de CRISPR/Cas se conocerán muchos de los detalles de los genoma de los organismos fitopatógenos en relación con sus plantas huéspedes y se establecerán probablemente nuevos métodos de control molecular de los mismos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la revisión del escrito realizada por Paul Christou, Lucía Pérez y Can Baysal. Sarah B. Lade tiene una beca predoctoral de la Universidad de Lleida asociada al proyecto BIO2014-54426-P del MINECO.

Bibliografía

- Ali A., Abulfaraj A., Idris A., Ali S., Tashkandi M., Mahfouz M.M. 2015. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biology* 16:238. 11 páginas
- Baltes N., Hummel A.W., Konecna E., Cegan R., Bruns A.N., Bisaro D. 2015. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants* 1(10): 15145.
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Nekrasov V. 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9:39.
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N.J., Nekrasov V. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology* 32:76-84.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151:2551–2561.
- Bortesi L., Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* 33: 41-52.
- Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., Sherman A., Arazi T., Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*, Early view, DOI: 10.1111/mp.12375.
- Doudna J.A., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR/Cas9. *Science* 346:1077-1086.
- Elliott C., Zhou F., Spielmeier W., Panstruga R., Schulze-Lefert P. 2002. Functional conservation of wheat and rice Mlo orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15: 1069–1077.
- Endo M., Mikami M., Toki S. 2015. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiology* 56: 41–47.
- Fang Y., Tyler B.M. 2016. Efficient

⁷ Dr. Zhang Feng, científico colaborador en el Instituto Broad del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) e investigador en el Instituto McGovern para la Investigación del Cerebro, que fue el primero en ganar una patente sobre la técnica después de la presentación de unos cuadernos de laboratorio suyos que parece demostraron que la inventó primero.

- disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular Plant Pathology* 17(1): 127–139.
- Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L., Terns R.M., Terns M.P. 2009. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell* 139(5): 945-56.
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. 2014. Development and applications of the CRISPR nuclease Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6):1262-1278.
- Jain M. 2015. Function genomics of abiotic stress tolerance in plants; a CRISPR approach. *Frontiers in Plant Science* 6:375. DOI: 10.3389/fpls.2015.00375.
- Ji X., Zhang H., Zhang Y., Wang Y., Gao C. 2015. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants* 1: 1-4.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgrRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41 (20): e188 12 páginas.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821.
- Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., Yu H-R., Hwang J., Kim J-II., Kim J-S. 2015. *Nature Methods*. DOI: 10.1038/nmeth.3284.
- Kumar, V., Jain, M. 2015. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany* 66: 47–57.
- Landers E.S. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell* 164 (1–2):18–28.
- Lei Y., Lu L., Liu H.Y., Li S., Xing F., Chen L.L. 2014. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular Plant* 7(9):1494–1496.
- Liao H-K, Gu Y., Diaz A., Marlett J., Takahashi Y., Li M., Suzuki K., Xu R., Hishida T., Chang C-J., Rodriguez-Esteban C., Young J., Izpisua Belmonte J.C. 2015. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications*. 6:6413 DOI: 10.1038/ncomms7413
- Liu L., Fan X-D. 2014. CRISPR–Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Molecular Biology* 85:209-218.
- Louwen R., Staals R.H.J., Endtz H.P., van Baarlen P., van der Oost J. 2014. The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78 (1):74-88.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 722–736. DOI:10.1038/nrmicro3569.
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* 60:174–182.
- Mojica, F. J. M.; Diez-Villasenor, C.; Garcia-Martinez, J.; Almendros, C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155 (3): 733–740.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151:653–663.
- Rezzonico F, Smits TH, Duffy B. 2011. Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied Environmental Microbiology* 77:3819 –3829.

Schimi S., Fauser F., Puchta H. 2014. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *The Plant Journal* 80: 1139–1150.

Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J-L, Gao C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31 (8):686-688.

Van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. 2014. Unraveling the Structural and Mechanistic Basis of CRISPR-Cas Systems. *Nature Reviews Microbiology* 12(7): 479-492.

Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Jin-Long Q.. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* 32 (9):947-952.

Xing H-L., Dong L., Wang Z-P., Zhang H-Y., Han C-Y., Liu B., Wang X-C., Chen Q-J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14:327 (12 páginas)

Zaidi S.S., Mansoor S., Ali Z., Tashkandi M., Mahfouz M.M. 2016. Engineering plants for geminivirus resistance with CRISPR/Cas9 System. *Trends in Plant Science* 21(4):279-281.

BOLETÍN DE LA SEF

Publicación trimestral **ISSN: 1998-513X**

Juan A. Navas-Cortés, IAS-CSIC (Córdoba), j.navas@csic.es

Inmaculada Viñas Almenar, UdL (Lleida) ivinas@tecal.udl.cat

La Sociedad Española de Fitopatología no se hace responsable de las opiniones expresadas en este boletín, que son responsabilidad exclusiva de los firmantes de los artículos.

SOCIOS PROTECTORES DE LA SEF

