



*La Sociedad Española de Fitopatología os desea
Feliz Navidad y prospero 2017
Bo Nadal
Bon Nadal
Zorionak eta Urte Berrion*



EDITORIAL3 **NOVEDADES****ACTUALIDAD**

- 4 **RESEÑA XVIII CONGRESO SEF, PALENCIA, SEPTIEMBRE 2016**
 6 **RESEÑA II SIMPOSIO GEDDI-SEF, PALENCIA, SEPTIEMBRE 2016**
 7 **IN MEMORIAM: JOSEPH MARIE BOVÉ (1929-2016)**

CURSOS DE ESPECIALIZACIÓN Y MÁSTER

- 9 **MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL**
 9 **PLANTHEALTH – EUROPEAN MASTER DEGREE IN PLANT HEALTH IN SUSTAINABLE CROPPING SYSTEMS ROYECTO PATHOGEN**
 9 **MASTER EN SANIDAD VEGETAL - 4ª EDICIÓN**
 9 **ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA Y FITOPATOLOGÍA DE ZONAS ÁRIDAS**

ACTIVIDADES DE LOS SOCIOS**TESIS DOCTORALES**

- 10 **MARTA BLANCO PÉREZ.** Análisis de procesos de transcripción, traducción y degradación del virus del arabesco del Pelargonium. IBMCP, CSIC-UPV, Valencia
 13 **CONCEPCIÓN MAGNO PÉREZ-BRYAN.** Análisis genómico y funcional de las singularidades de dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con capacidad de biocontrol. Universidad de Málaga
 16 **EZTER MAJER.** Metabolic engineering of plants using a disarmed potyvirus vector. IBMCP, CSIC-UPV, Valencia
 19 **JOSÉ MARÍA SANZ MARTÍN.** Estudio y caracterización funcional de efectores implicados en la interacción *Colletotrichum graminicola*-maíz. CIALE, Salamanca
 23 **JESÚS MARTÍNEZ CRUZ.** Análisis morfológico y funcional de la interacción *Podosphaera xanthii*-cucurbitáceas. Universidad de Málaga

LIBROS Y PUBLICACIONES26 **PUBLICACIONES SEF****NUEVAS DESCRIPCIONES DE PATÓGENOS EN ESPAÑA**

- 29 **HONGOS Y OOMICETOS**
 30 **BACTERIAS**
 30 **VIRUS Y VIROIDES**
 30 **NEMATODOS**

REUNIONES Y CONGRESOS

- 31 **3RD HEMIPTERAN-PLANT INTERACTIONS SYMPOSIUM**
 31 **15TH CONGRESS OF THE MEDITERRANEAN PHYTOPATHOLOGICAL UNION**
 31 **X CONGRESO NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA APLICADA - SEEA**
 31 **12TH EUROPEAN FOUNDATION FOR PLANT PATHOLOGY CONFERENCE**

EL ARTÍCULO DEL BOLETÍN

- 32 **INMUNIDAD BASAL Y DEFENSA ANTIVIRAL EN LAS PLANTAS** por Irene Guzmán-Benito, Laura Diezma, Livia Donaire, Virginia Ruíz-Ferrer, Andrzej T. Wierzbicki y César Llave
 32 **INFLUENCIA DE FACTORES DE SITIO EN LA DISTRIBUCIÓN DE ENDÓFITOS POTENCIALMENTE BENEFICIOSOS VS PERJUDICIALES EN RAMILLOS DE PINO ALBAR (*PINUS SYLVESTRIS*) DEL NORTE DE ESPAÑA** por Sanz-Ros, A.V., Müller, M.M., San Martín, R y Diez, J.J.

Novedades BOLETÍN y WEB SEF

Queridos Soci@s:

Os presentamos el último Boletín de 2016 con información muy diversa que esperamos os pueda interesar

En la sección de actualidad incluimos una reseña del pasado Congreso SEF de Palencia, así como del II Simposio GEDDI-SEF. En esta misma sección dedicamos unas páginas para recordar a quién fue uno de los fitopatólogos más destacados de la historia reciente de nuestra disciplina, Joseph M. Bové recientemente fallecido y que ha sido amablemente elaborado por Nuria Durán. En la sección del artículo del Boletín podréis encontrar dos artículos de gran interés y que corresponden a los premios SEF-Phytoma a la mejor comunicación oral, así como el Premio SEF a la mejor comunicación en Panel del XVIII Congreso SEF de Palencia.

Además, se incluyen como viene siendo habitual los nuevos patógenos descritos en España entre octubre y diciembre 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.

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.

Que en 2017 se cumplan todos vuestros deseos y venga lleno de nuevos proyectos ...

L@s Editor@s

XVIII CONGRESO DE LA SEF Palencia, 20 a 23 de septiembre de 2016

Después de varios intentos, por fin conseguimos organizar el congreso SEF en Palencia. Como sabéis se celebró en el centro de la ciudad, en tres salas diferentes (Teatro Principal, Diputación y Centro Abilio Calderón) con un resultado que consideramos aceptable. Durante el congreso hemos contado con la participación de 252 participantes, 10 de ellos extranjeros. Esta participación ha sido menor a la de anteriores congresos en Lleida (2014) y Malaga (2012), posiblemente debido al prolongado efecto de la crisis sobre los presupuestos y las plantillas de los laboratorios. El número de comunicaciones orales presentadas (78) ha sido similar al de anteriores congresos. El número de paneles presentados (201), que se distribuyeron en la sala de exposiciones de Abilio Calderón, fue algo inferior al de anteriores congresos.

Desde el comité organizador estamos muy satisfechos por el resultado del congreso. Pese a la difícil logística que presentaba (sesiones simultáneas en tres edificios, y cafés en los bares de la zona) el congreso transcurrió sin problemas. El nivel científico del congreso fue bueno en relación con las comunicaciones presentadas y los ponentes invitados. Hay que destacar también el resultado de los dos simposios realizados sobre *Xylella fastidiosa* e Inmunidad. Muchas gracias a los participantes y organizadores.

La visita técnica llevada a cumplió también con las expectativas. La zona de pino resinero afectada por decaimiento y que presentaba una gran mortalidad, fue un entorno excelente para la descripción de la enfermedad que se llevo a cabo a todos los asistentes. Por otra parte, las

explicaciones llevadas a cabo por el técnico de la Finca de la Ventosilla sobre las enfermedades de la vid y su manejo, fueron muy interesantes.

En relación con las actividades lúdicas del congreso, tanto la recepción, como las comidas, y sobre todo la cena de clausura, constituyeron una buena oportunidad para el “networking”. Durante la cena, y como ya suele ser tradicional se entregaron los premios SEF-Phytoma a las mejores comunicaciones orales, y el premio SEF a los mejores paneles. Un momento entrañable fue el reconocimiento de la sociedad a los socios salientes de la Junta Directiva, así como a los organizadores del congreso.

Damos el relevo a nuestros compañeros de Toledo, quienes sin duda trabajarán para conseguir un estupendo y cálido congreso, que sin duda y como todos los anteriores, quedará grabado en nuestra memoria.

Por último, agradecer una vez más el apoyo de todas las instituciones colaboradoras, Universidad de Valladolid, Fundación General e Instituto de Gestión Forestal Sostenible, a la Diputación Provincial y al Ayuntamiento de Palencia, por su gran apoyo, y a todas las empresas patrocinadoras que contribuyeron de una u otra forma a que el congreso se llevara a cabo. Y sobre todo, a los participantes en el congreso, que han logrado que SEF Palencia 2016 se llevase a cabo.

¡SEF Palencia 2016, ya es historia!

EL COMITE ORGANIZADOR



Acto de apertura del XVIII Congreso SEF, Palencia 2016



Ponencia plenaria en el Teatro Principal



Visita técnica en la Finca "La Ventosilla"

II SIMPOSIO GEDDI-SEF

Palencia, 20 de septiembre de 2016

El día 20 de septiembre de 2016 se celebró en Palencia el II Simposio del GEDDI-SEF, titulado “*Xylella fastidiosa*: una nueva especie compleja causante de enfermedades emergentes en Europa”. El Simposio, coordinado por M^a Milagros López González, contó con la presencia de expertos nacionales y extranjeros, como Blanca Landa (IAS-CSIC, Córdoba), Aranzazu Moreno (ICA-CSIC, Madrid), Juan Antonio Navas (IAS-CSIC, Córdoba), M^a Milagros López (IVIA, Valencia) y Françoise Poliakoff (ANSES, Angers, Francia).

Asistieron al Simposio más de 100 personas que participaron activamente durante la Mesa Redonda donde se debatió sobre la prevención de *Xylella fastidiosa* en España, los planes de contingencia, las prospecciones y los análisis realizados.

Ponencias del II Simposio GEDDI-SEF:

- *Xylella fastidiosa*, un problema global: enfermedades que causa. María Milagros López. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Moncada, Valencia (disponible en <http://geddisef.blogspot.com.es>)
- *Xylella fastidiosa*, características bacterianas, biología y ecología de la bacteria. Blanca Landa, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba.
- Vectores de *Xylella fastidiosa* y mecanismos de transmisión. Estrategias de control. Aranzazu Moreno, Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC), Madrid.
- Evaluación del riesgo de *Xylella fastidiosa* en la Unión Europea. Juan A. Navas, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba.
- Situación de *Xylella fastidiosa* en Francia: intercepciones, prospecciones, metodología de análisis y diversidad de cepas. Françoise Poliakoff, Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), Angers, Francia. (disponible en <http://geddisef.blogspot.com.es>)



Cartel II Simposio SEF-GEDDI y ponentes participantes del Simposio, de izquierda a derecha: Juan A. Navas, Blanca B. Landa, M^a Milagros López, Françoise Poliakoff y Aranzazu Moreno

Joseph Marie Bové (1929-2016)

El día 2 de junio de 2016, nos dejó un excepcional colega y amigo: Joseph Marie Bové (Josy para los amigos).

Josy nació en Luxemburgo el 5 de mayo de 1929, por lo que siendo niño vivió y sobrevivió los avatares de la Segunda Guerra Mundial. Ello hizo que sus padres decidieran abandonar Luxemburgo en busca de un lugar tranquilo donde reanudar la vida familiar y su actividad profesional como floricultores. Después de intentarlo en Bélgica y Holanda se establecieron en la región de Aquitania, cerca de Burdeos. Estos continuos desplazamientos cuando Josy era todavía un niño, probablemente marcaron su personalidad de “ciudadano del mundo” visitando, trabajando y estableciendo colaboraciones en los cinco continentes del mundo global actual.

En 1950, después de completar la educación secundaria en el liceo de Burdeos, estudió en la escuela de agronomía de la Universidad de la Sorbona en París donde se graduó en 1955. La formación de postgrado la realizó juntamente con su esposa y colega Colette Bové en la Universidad de California en Berkeley bajo la dirección de reconocidos científicos con quienes realizó trabajos de investigación en fosforilación fotosintética con D.I. Arnon, enzimología con P.K. Stumpf y virología con W.M. Stanley y R.L. Steere. En 1967 recibió el título de doctor en el instituto Pasteur donde había caracterizado la RNA replicasa y la síntesis in vitro del Turnip Yellow Mosaic Virus bajo la dirección de Jacques Monod.

Sus inicios como investigador independiente tuvieron lugar en una época en que a todas las “enfermedades transmisibles por injerto” se les atribuía una etiología viral. Su dedicación en el ámbito de la virología le conllevó a dedicar esfuerzos al estudio de ciertas enfermedades que no se comportaban como era de esperar. Ello le llevó a logros tan

importantes como el establecimiento de la etiología de varias enfermedades causadas por bacterias un tanto peculiares (lo que hoy se conoce como bacterias endógenas y que se encuentran ya sea en el floema o en el xilema de sus huéspedes). Dentro de las bacterias restringidas al floema hay que resaltar las aportaciones en lo que hoy conocemos como Spiroplasmas, Phytoplasmas y Liberibacters, y *Xylella* en el caso de bacterias restringidas al xilema.

J.M. Bové tenía un conocimiento amplio en fitopatología que se extendía desde los resultados de la aplicación de las últimas técnicas moleculares en el laboratorio hasta el reconocimiento del efecto de distintos patógenos en el campo. Su deseo de compartir conocimientos y establecer colaboraciones le llevó a investigar, descubrir y asesorar.

Sus mayores logros científicos se pueden resumir como sigue:

- Descubrimiento, identificación, caracterización, taxonomía, y detección por PCR de ***Candidatus Liberibacter africanus* (1994)**, y ***Candidatus Liberibacter americanus* (2005)** bacteria causal del huanglongbing (ex-greening) en Asia, Africa, y America.
- Descubrimiento, identificación, caracterización, taxonomía, patogenicidad, secuenciación y detección por PCR de ***Spiroplasma citri***, el agente causal del stubborn.
- Identificación de ***Circulifer haematocaps*** como el vector de *Spiroplasma citri* en la Cuenca del Mediterranean, y en el próximo y medio Oriente.
- Descubrimiento, identificación, caracterización, taxonomía, y detección por PCR de ***Candidatus Phytoplasma aurantifolia***, el agente causal de la enfermedad de las escobas de bruja de la lima en Oman, los Emiratos Árabes e Irán.

- Identificación de *Hishimonus physitis* como el vector de *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*.

- Descubrimiento e identificación de *Xylella fastidiosa* como el agente causal restringido al xilema de la clorosis variegada de los cítricos (CVC) en Brasil.

- Identificación de la “**muerte súbita de los cítricos**” (“**citrus sudden death**”), una enfermedad transmissible por injerto, similar a la tristeza, y desarrollo de métodos de control.

Los objetivos propuestos, los resultados alcanzados y su experiencia en campo le llevaron, primero a establecer numerosas colaboraciones en el ámbito internacional, y posteriormente a ejercer como consultor. Ello se puede resumir como sigue:

- Prospecciones, a propuesta de F.A.O., para determinar la presencia de enfermedades causadas por virus y similares (virus and virus-like diseases) en las plantaciones de cítricos en la región que se extiende desde Marruecos a Pakistan (1981- 1992).

- Identificación de *Circulifer haematoceps* como el vector de *Spiroplasma citri* en **Syria** (1979-1986).

- Estudio de la enfermedad de “escoba de brujas” de la lima en **Oman** (1986, 1987, 2003), los **Emiratos Árabes** (1992), e **Iran** (1997), e identificación de su vector, *Hishimonus physitis*, en **Oman** (1991).

- Estudios del Huanglongbing (HLB) en **Sudáfrica** (1967-1972, 1998) **Madagascar** (1967), **Reunion** (1970-1995), **Mauricio** (1992-1998), **India** (1990-1992), **Bali (Indonesia)** (1996-1998), **Vietnam, Cambodia, Laos, Myanmar** (1995, 2000, 2002), **China (Behai)** (1999, 2005), **Nepal** (1992, 1994, 2000, 2002, 2004), **Bhutan** (2002, 2004), y **Brasil** (2004, 2005, 2006).

- Puesta en marcha de laboratorios de diagnóstico por PCR de *Candidatus*

Liberibacter africanus en **Indonesia (Malang, Java)** (1996-1998), **Vietnam (Long Dinh)** (2000-2002), **Nepal (Katmandu)** (2002-2004), y **Bhutan** (2004, 2005, 2006).

- Recomendaciones para la mejora de un laboratorio de diagnóstico de enfermedades causadas por virus y similares en cítricos (Fundecitrus, Araraquara, Estado de São Paulo, **Brasil**) (1997-1999).

- Rehabilitación de cítricos en **Nepal**: de árboles de semilla a árboles propagados por injerto (2004, 2005, 2006).

- Puesta a punto de medidas de control del Huanglongbing en el Estado de São Paulo y en Florida (Estado de Southern Gardens).

El Prof. Bové ha sido consultor científico de Fundecitrus (Brasil) donde ha realizado una inestimable actividad científico-técnica en las dos últimas décadas. Como ha manifestado en repetidas ocasiones su director científico, A. J. Ayres, el éxito alcanzado en el control del HLB en Brasil no hubiera sido posible sin la inigualable maestría del Prof. Bové para generar conocimientos básicos y utilizarlos para definir estrategias para el control de enfermedades en el campo.

El último año de su vida y debido a sus limitaciones para viajar, su preocupación científico/técnica se centró en la reciente identificación del efecto de *Xylella fastidiosa* en los olivos del sur de Italia, y en la constatación de la presencia de *Trioza erytreae* en la península ibérica. Nos ha dejado con la preocupación acerca del futuro de estos dos cultivos de gran importancia en la cuenca del Mediterráneo. ¡Nos ha dejado una gran responsabilidad para los fitopatólogos!

Por Nuria Durán Vila

CURSOS DE ESPECIALIZACIÓN

MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL

Fechas: 2016 y 2017



INFORMACIÓN: <http://www.bit.etsia.upm.es/master.php>

PlantHealth – European Master Degree in PLANT HEALTH IN SUSTAINABLE CROPPING SYSTEMS

Fechas: 2016 y 2017



Preinscripción: 27 de octubre de 2016 a 31 de enero de 2017

INFORMACIÓN: <http://www.planthealth.upv.es>

MÁSTER EN SANIDAD VEGETAL - 4ª EDICIÓN

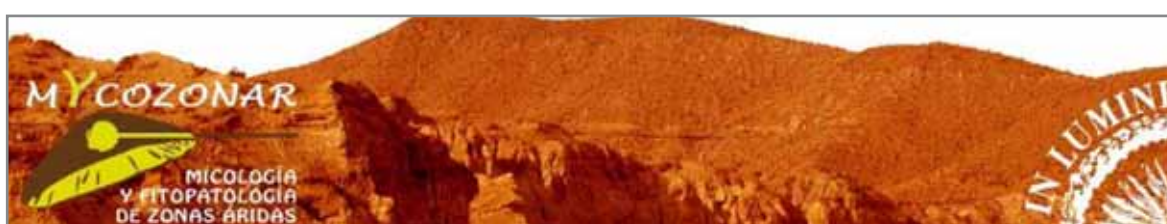
Fechas: 2016 y 2017



INFORMACIÓN: <http://mastersanidadvegetal.es>

ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA Y FITOPATOLOGÍA DE ZONAS ÁRIDAS

Fechas: 3 noviembre 2016 a 28 febrero 2017



INFORMACIÓN: www2.ual.es/mycozonar/especialista.html

Marta Blanco Pérez



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Análisis de procesos de transcripción, traducción y degradación del virus del arabesco del *Pelargonium*” en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV) de Valencia. La Tesis ha sido dirigida por la Dra. Carmen Hernández del IBMCP. El tribunal estuvo constituido por los doctores Ricardo Flores (IBMCP), M^a Ángeles Ayllón del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA) y Francesco di Serio del Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR, Bari). La Tesis Doctoral obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.

El virus del arabesco del *Pelargonium* (PLPV) es uno de los agentes virales más frecuentes en especies del género *Pelargonium*. Se trata de un virus con partículas isométricas de 30 nm de diámetro que pertenece a un nuevo género (*Pelarspovirus*) dentro de la amplia familia *Tombusviridae*. Su genoma está constituido por un único RNA genómico (gRNA) de simple cadena y polaridad positiva que contiene cinco pautas abiertas de lectura (ORFs) que codifican dos proteínas implicadas en replicación (p27 y p87), dos proteínas implicadas en movimiento (p7 y p9.7), y una proteína de cubierta (p37) que funciona, además, como supresor del silenciamiento por RNA. El pequeño tamaño de su genoma (~4 kb) unido a su organización genómica sencilla y a su capacidad para infectar huéspedes experimentales diversos (incluyendo *N. benthamiana*, una especie modelo dentro de la Biología Vegetal), convierten al PLPV en un sistema muy adecuado para estudiar aspectos básicos de la interacción virus-planta a nivel molecular. Las infecciones causadas por el PLPV son normalmente sistémicas, frecuentemente asintomáticas y se caracterizan, además, por un bajo título viral. La acumulación del virus en la planta debe estar condicionada por numerosos factores, incluyendo su tasa de replicación, su nivel de expresión génica y los procesos degradativos a los que se



La autora Marta Blanco Pérez

encuentra sometido. En esta Tesis se ha pretendido profundizar en algunos de estos aspectos, por una parte, continuando con el estudio de la regulación de la expresión génica en el PLPV y, por otra, analizando el papel de este virus como inductor y diana de la respuesta defensiva del huésped basada en silenciamiento por RNA, uno de los principales mecanismos que conducen a la degradación de su genoma.

Trabajos previos habían indicado que la regulación de la expresión génica del PLPV tiene lugar tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Ilustrando el primer nivel de regulación, el PLPV produce un RNA subgenómico (sgRNA) en el curso

de la infección que sirve como mRNA para la traducción de las tres ORFs 3'-proximales. Cómo se sintetiza este sgRNA era una incógnita de modo que el primer objetivo de esta Tesis fue determinar el mecanismo y los elementos del RNA viral implicados en su generación. Mediante predicciones de conformación del RNA *in silico* y el diseño y bioensayo de mutantes del virus en plantas de *Nicotiana benthamiana*, se identificó una interacción entre segmentos alejados del gRNA de polaridad positiva, que actúa en *cis* y que media la producción de la cadena negativa del sgRNA, un tipo de molécula

fácilmente detectable en tejido infectado. Estos resultados junto con la posibilidad de desacoplar la síntesis de cadenas negativas y positivas del sgRNA y con la observación de similitud de secuencia entre el extremo 5' del gRNA y del sgRNA (con una función promotora en las cadenas complementarias), sugieren que el PLPV sigue un modelo de terminación prematura para la formación de su único sgRNA.

Otra cuestión que se desconocía del esquema de expresión génica del PLPV, era cómo los RNA virales (g y sg) podían atraer a la

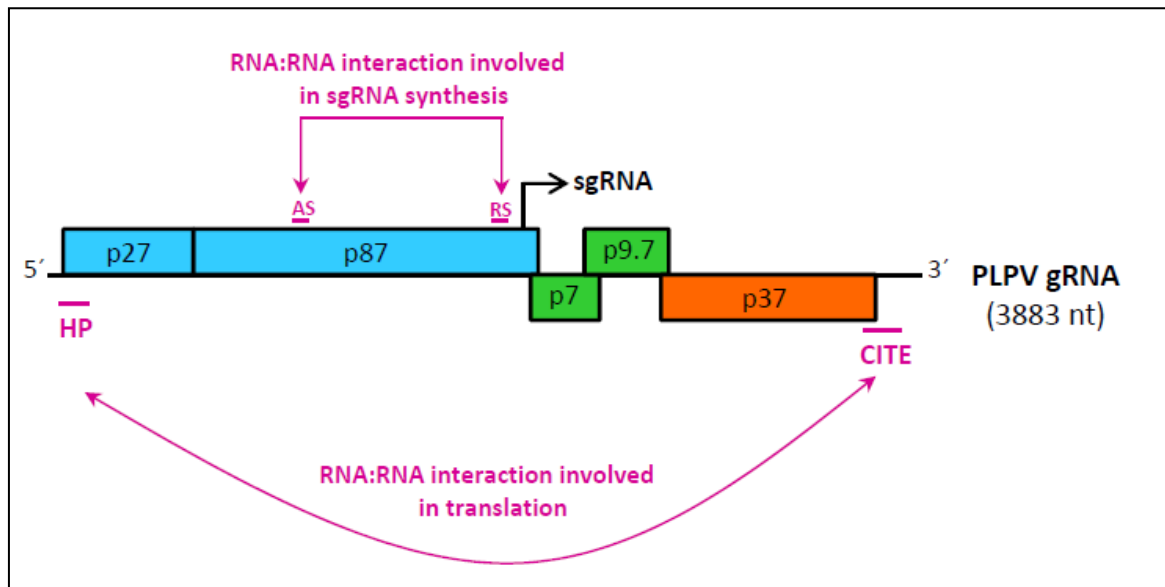


Figura 1. Representación esquemática de dos interacciones RNA:RNA a larga distancia identificadas en el gRNA del PLPV con un papel esencial en: a) la síntesis del sgRNA mediante un mecanismo de terminación prematura (interacción entre los elementos AS y RS) y, b) la traducción mediante un mecanismo independiente de cap (interacción entre el estimulador de la traducción, CITE, y una horquilla 5'-proximal, HP).

maquinaria traduccional a pesar de carecer de un cap (5') y de una cola poli(A) en 3', dos estructuras presentes en mRNAs celulares típicos que desempeñan un papel fundamental en el inicio de la traducción. Análisis *in silico* previos habían sugerido la presencia de un estimulador traduccional (CITE) en la región 3' del genoma viral capaz, presumiblemente, de mediar una traducción desligada de cap. Mediante trasfección de protoplastos de *N. benthamiana* con construcciones deladoras, en este trabajo se corroboró la funcionalidad del CITE tanto en el contexto del gRNA como del sgRNA. Adicionalmente, se constató que

este elemento establece una interacción RNA-RNA a larga distancia con la región 5' del RNA correspondiente que es esencial para su actividad. Asimismo, se recabaron datos que apoyan la relevancia del CITE durante el ciclo infeccioso del virus y que, además, sugieren que la doble función, reguladora y codificante, de las secuencias 5'-proximales con las que interacciona, impone fuertes restricciones a la estructura de las poblaciones virales.

Por último, se caracterizaron los pequeños RNAs virales (vsRNAs) presentes en plantas de *N. benthamiana* infectadas por

el PLPV y que son el resultado del proceso de silenciamiento antiviral disparado por el huésped para bloquear la infección. Mediante secuenciación masiva, análisis computacionales e hibridación molecular, se pudo determinar que: a) los vsRNAs del PLPV se acumulan en proporciones extraordinariamente elevadas en tejido infectado, b) los vsRNAs de 21 y 22 nt son los mayoritarios, c) los vsRNAs de polaridad positiva y negativa están en proporciones

similares, y d) existe variabilidad en el nucleótido 5'-proximal de los vsRNAs. Estos resultados, junto con otros obtenidos con posterioridad, permitieron obtener pistas acerca de las moléculas virales que deben actuar como sustratos para la formación de los vsRNAs y, también, acerca de los componentes de la maquinaria de silenciamiento del huésped que deben participar en la respuesta del mismo frente al virus.

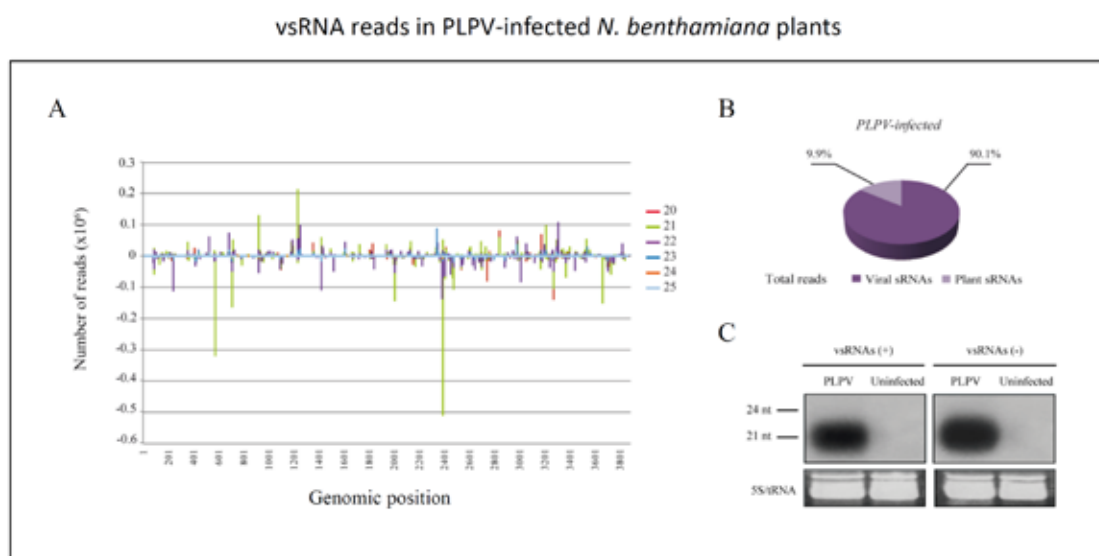


Figura 2. Algunas características y detección de pequeños RNAs virales (vsRNAs) presentes en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas por el PLPV. (A) Distribución por tamaño y polaridad (positiva y negativa por encima y por debajo del eje de las x, respectivamente) de vsRNAs a lo largo del genoma viral. (B) Porcentaje relativo de vsRNAs en plantas infectadas. (C) Northern blot para la detección de PLPV sRNAs de polaridad positiva y negativa.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Blanco-Pérez, M., Pérez-Cañamás, M., Ruiz, L., Hernández, C. (2016). Efficient translation of *Pelargonium line pattern virus* RNAs relies on a TED-Like 3'-translational enhancer that communicates with the corresponding 5'-region through a long-distance RNA-RNA interaction. *PLOS ONE* 11: e0152593.

Blanco-Pérez, M., Hernández, C. (2016). Evidence supporting a premature termination mechanism for subgenomic RNA transcription in *Pelargonium line pattern virus*: identification of a critical long-range RNA-RNA interaction and functional variants through mutagenesis. *Journal of General Virology* 97: 1469-1480

Pérez-Cañamás, M.¹, Blanco-Pérez, M.¹, Forment, J., Hernández, C. Unusually high accumulation of viral small RNAs in *Nicotiana benthamiana* plants asymptotically infected by *Pelargonium line pattern virus* that is neither dependent on DCL induction nor RDR6 activity. ¹Misma contribución. *Virology* 501: 136-146.

Concepción Magno Pérez-Bryan



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Análisis genómico y funcional de las singularidades de dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con capacidad de biocontrol” el pasado 24 de junio de 2016 en la Universidad de Málaga, bajo la dirección del Dr. Diego F. Romero Hinojosa y Dr. Alejandro Pérez García. El tribunal estuvo constituido por los doctores Emilio Montesinos Seguí (Universidad de Girona), Francisco M. Cazorla López (Universidad de Málaga) y Jesús Mercado Blanco (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC). La Tesis fue calificada por unanimidad con Sobresaliente *Cum laude*.



De izquierda a derecha: Jesús Mercado Blanco, Emilio Montesinos Seguí, Alejandro Pérez García, Concepción Magno Pérez-Bryan, Diego Romero Hinojosa y Francisco M. Cazorla López

Algunos miembros del género *Bacillus* representan una fuente potencial de cepas bacterianas que se pueden emplear como agentes de control biológico, debido a su capacidad para inducir el crecimiento y los mecanismos de defensa de la planta hospedadora, así como producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se demostró que las cepas de *Bacillus* spp. CECT 8237 y

CECT 8238 muestran una eficaz capacidad de biocontrol, en comparación con otras cepas relacionadas, frente a agentes patógenos causantes de enfermedades en cucurbitáceas, de ahí que se esté trabajando en su formulación de cara a su utilización como agentes de control biológico en programas de control integrado.

Con el fin de conocer la maquinaria génica relacionada con esta actividad, en esta tesis doctoral se ha llevado a cabo

la secuenciación y anotación de las secuencias de los genomas completos de estas dos cepas de *Bacillus*, y se ha demostrado la funcionalidad de algunas de las regiones genómicas contenidas en dichas secuencias.

En primer lugar, mediante análisis filogenéticos multigénicos, se han identificado ambas cepas como pertenecientes a la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, más concretamente, relacionadas con cepas asociadas al entorno de la planta, es decir, aislados procedentes de rizosfera o filosfera.

En segundo lugar, se ha hecho un estudio exhaustivo de los genes potencialmente implicados en los diversos mecanismos de acción que llevan a cabo estas cepas en su actividad de biocontrol. Para ello, se ha realizado una búsqueda de: i) genes relacionados con la colonización y persistencia en la planta a proteger por parte de estas bacterias; ii) genes que participan en los fenómenos de promoción de crecimiento e inducción de la respuesta de defensa (ISR, del inglés Induced Systemic Resistance) de la planta hospedadora; iii) genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios. Como resultado de este análisis, obtuvimos que las secuencias de los genes relacionados con factores complementarios y rutas de regulación para la formación de biofilms en CECT 8237 y CECT 8238, están poco conservadas con respecto a las secuencias contenidas en otros genomas de *Bacillus* de especies relacionadas, lo que podría explicar, en cierta medida, los diferentes fenotipos observados en cuanto a morfología de colonia. En relación a los genes que participan en los fenómenos de ISR y fitoestimulación, no se han observado diferencias con respecto a otras cepas del género *Bacillus* en cuanto al contenido génico; además, se ha demostrado la funcionalidad de los genes relacionados con la

producción de los compuestos volátiles acetoina y 2,3-butanodiol, así como las cinéticas de producción asociadas a dichas moléculas, las cuáles si difieren con respecto a otras cepas de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. Además, se han identificado grupos de genes para la síntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios implicados tanto en la actividad antimicrobiana desempeñada por estas cepas, como en su fisiología. En concreto, mediante análisis químicos, detectamos en los sobrenadantes asociados a las células de estas bacterias, las masas moleculares correspondientes a los poliquétidos macrolactina, difididina y bacillaene, así como al dipéptido bacilisina y al sideróforo bacilibactina.

En tercer lugar, se consideró de gran relevancia la detección de regiones genómicas exclusivas o poco conservadas en los genomas de CECT 8237 y CECT 8238, con respecto a otras cepas de la misma especie, o incluso del mismo género; para ello, se llevó a cabo un análisis genómico comparativo con un gran número de cepas pertenecientes a dicho género y cuyas secuencias estaban disponibles en las bases de datos. Se retuvieron aquellas regiones del genoma que comprendían un mínimo de siete genes consecutivos cuya medida de conservación era inferior o igual al percentil treinta. Entre estas regiones se detectaron principalmente grupos de genes potencialmente implicados en la síntesis de nuevos metabolitos secundarios, cuya funcionalidad y estructura asociada se estudiará en próximos trabajos.

Por último, se ha caracterizado una de las regiones genómicas identificadas como exclusivas dentro de la especie y presente en la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT 8237. Esta región parece haberse adquirido por transferencia horizontal, dado su presencia únicamente en

otra cepa de distinta especie, *Bacillus licheniformis* 9945A. Se ha probado la implicación de este grupo de genes en la síntesis de un nuevo lantibiótico, demostrando la funcionalidad de los genes a nivel transcripcional, así como la presencia de los péptidos asociados a dicho lantibiótico

en los lavados de células y sobrenadantes de cultivos de CECT 8237. Además, se ha estudiado la producción de este compuesto en condiciones estáticas de crecimiento, tanto *in vitro* como *in planta*, en relación a otros metabolitos cuya funcionalidad ya había sido demostrada previamente.

Como conclusión general, se puede decir que se ha conseguido profundizar más en los diversos mecanismos de acción desempeñados por estas cepas que son los que desencadenan esa remarcable actividad de biocontrol; pero sobre todo, se ha abierto un gran abanico de posibilidades de cara a futuros estudios para resolver algunas de las cuestiones que aún desconocemos, como son la funcionalidad de nuevas regiones que podrían estar relacionadas con la adaptabilidad al entorno y/o contribución a la mejora de la salud de la planta por parte de estas bacterias.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Magno-Pérez-Bryan, M.C., Martínez-García, P.M., Hierrezuelo, J., Rodríguez-Palenzuela, P., Arrebola, E., Ramos, C., de Vicente, A., Pérez-García, A., and Romero, D. 2015. Comparative genomics within the *Bacillus* genus reveal the singularities of two robust *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:1102-1116. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-02-15-0023-R>.





Ezter Majer

Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Metabolic engineering of plants using a disarmed potyvirus vector” el 14 de Julio de 2016 para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia. La Tesis se realizó en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (centro mixto del CSIC y la Universidad Politécnica de Valencia), bajo la dirección del Dr. José Antonio Darós Arnau. El Tribunal estuvo presidido por el Dr. Fernando Ponz Ascaso, y actuaron como vocal y secretaria, respectivamente, el Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano y la Dra. Carmen Hernández Fort. La Tesis recibió la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.

Los virus de plantas son parásitos intracelulares obligados que tienen la capacidad de forzar a las células del huésped a sintetizar cantidades importantes de algunas de sus proteínas. Esta propiedad ha sido utilizada para desarrollar vectores virales y expresar proteínas recombinantes en plantas biofactoría. La principal limitación de los sistemas de expresión basados en virus de plantas es la dificultad de coexpresar diversas proteínas heterólogas en la misma célula con la localización subcelular apropiada, lo cual es una cuestión crucial, por ejemplo, en investigaciones de ingeniería metabólica. Esta Tesis abordó este problema mediante el uso de un vector viral derivado de un potyvirus, el virus del grabado del tabaco (TEV, de *Tobacco etch virus*). Los potyvirus (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) son virus de RNA de cadena positiva simple, cuya estrategia de expresión genética les permite la producción de la mayoría de sus proteínas en cantidades equimolares. El genoma codifica una poliproteína principal que es procesada por proteasas virales en, aparentemente, once proteínas maduras. Los cDNAs de las proteínas heterólogas se pueden insertar en el genoma viral flanqueados por secuencias correspondientes a sitios de procesamiento proteolítico de una de las proteasas virales, que liberará estas proteínas heterólogas durante el procesamiento de la poliproteína.

A pesar de la aparente simplicidad de la estrategia de expresión génica de los potyvirus, la inserción de un cDNA foráneo es una tarea compleja, ya que estas secuencias pueden interrumpir algunas funciones



Ezter Majer, el día de la defensa de su Tesis Doctoral

virales e influir negativamente en la viabilidad del virus recombinante. Por lo tanto, el primer objetivo de la Tesis fue analizar el efecto del sitio de inserción en la estabilidad del genoma del TEV. Para ello se estudió el efecto de reubicar el cistrón viral N1b, que codifica la RNA polimerasa RNA dependiente, en todas las posibles posiciones intercistrónicas del genoma. Los resultados mostraron la posibilidad de utilizar una nueva posición de

inserción para expresar proteínas recombinantes en el extremo más amino terminal de la poliproteína viral. Esta posición, que no había sido descrita hasta el momento, permitió explorar una nueva cuestión como es la localización subcelular de las proteínas recombinantes producidas a través del vector viral. Dado que las rutas metabólicas en las plantas están muy compartimentalizadas, la adecuada localización subcelular de las enzimas es una tarea esencial en ingeniería metabólica. Por ello, el segundo objetivo se centró en el análisis de la distribución de las proteínas heterólogas a diferentes

compartimentos subcelulares utilizando el vector derivado del TEV. Los resultados mostraron que desde la nueva posición amino terminal se pueden enviar las proteínas recombinantes al cloroplasto, mitocondria, núcleo y citosol, mientras que desde las posiciones clásicas en el interior de la poliproteína solo se pueden enviar las proteínas al núcleo y citosol. Tomando como base estos resultados, se construyó un vector viral capaz de expresar dos proteínas fluorescentes distintas y distribuirlas separadamente al cloroplasto y núcleo (Fig. 1).

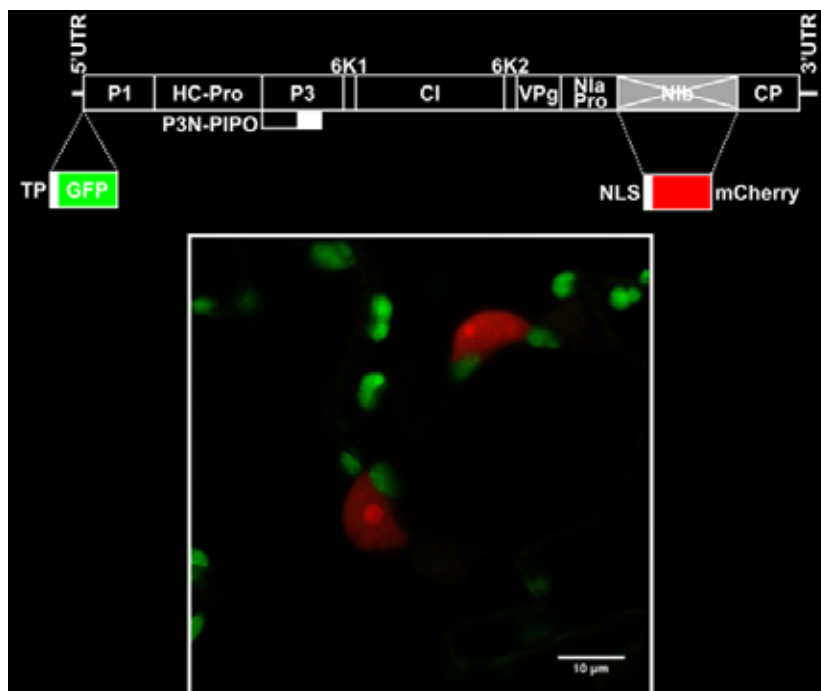


Figura 1. Coexpresión de GFP con péptido de tránsito (TP) al cloroplasto y de mCherry con secuencia de localización nuclear (NLS) al núcleo a partir de un único vector viral derivado del TEV.

Como tercer objetivo se investigó la posibilidad de utilizar el vector derivado del TEV para expresar una ruta metabólica heteróloga completa en plantas. Se escogió una ruta bacteriana de producción de licopeno, un pigmento carotenoide con propiedades beneficiosas para la salud humana. En plantas, el licopeno se sintetiza en los cloroplastos y cromoplastos a partir de precursores de isoprenoides, el pirofosfato de isopentenilo y el pirofosfato de dimetilalilo, a través de la ruta del metileritriol 4-fosfato. Sin embargo, estos precursores también se sintetizan fuera de los plastos a través de la ruta del mevalonato. La expresión, a través del vector viral, de la geranilgeranil pirofosfato sintasa, la fitoeno sintasa y la fitoeno desaturasa de *Pantoea ananatis* en el citosol de las células de tabaco permitió la producción de licopeno en el tejido infectado y se observó que se acumulaba

en forma de cristales en el citosol (Fig. 2).

Los resultados también ilustraron el papel central del fitoeno sintasa en la ruta biosintética de los carotenoides y mostraron como la sola expresión citosólica de la fitoeno sintasa (crtB) de *P. ananatis* es suficiente para inducir la acumulación de carotenoides hasta el punto que el tejido infectado adquiere pigmentación amarilla. Este resultado propició el cuarto objetivo de la Tesis en el que se analizaron las posibilidades de crtB como marcador visual de la infección de virus en plantas. Los resultados mostraron que crtB es un marcador amarillo muy genérico (Fig. 3), y que funciona perfectamente en combinación con el marcador rojo Rosea1, previamente descrito, permitiendo la monitorización visual de dos poblaciones virales al mismo tiempo.

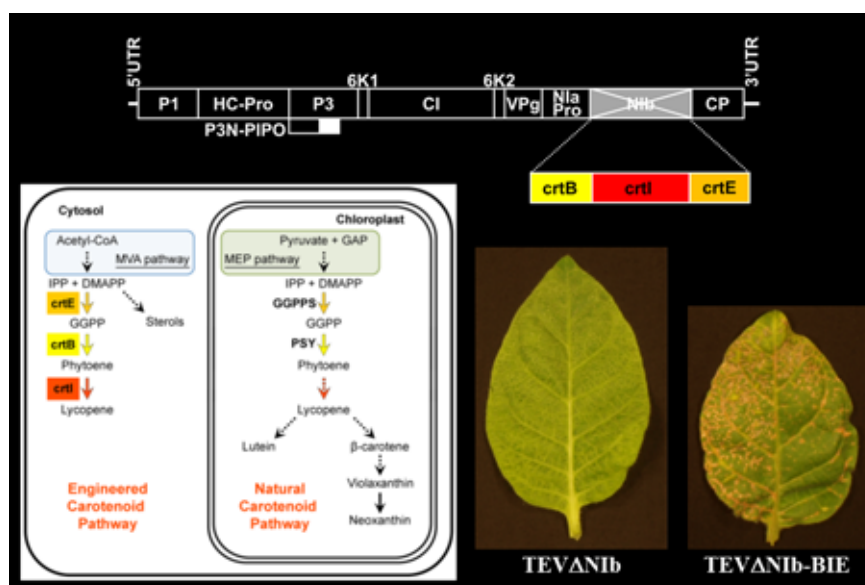


Figura 2. Producción de licopeno en el citosol de células de tabaco a través de un vector derivado del TEV que expresa una ruta metabólica completa de la bacteria *Pantoea ananatis*.

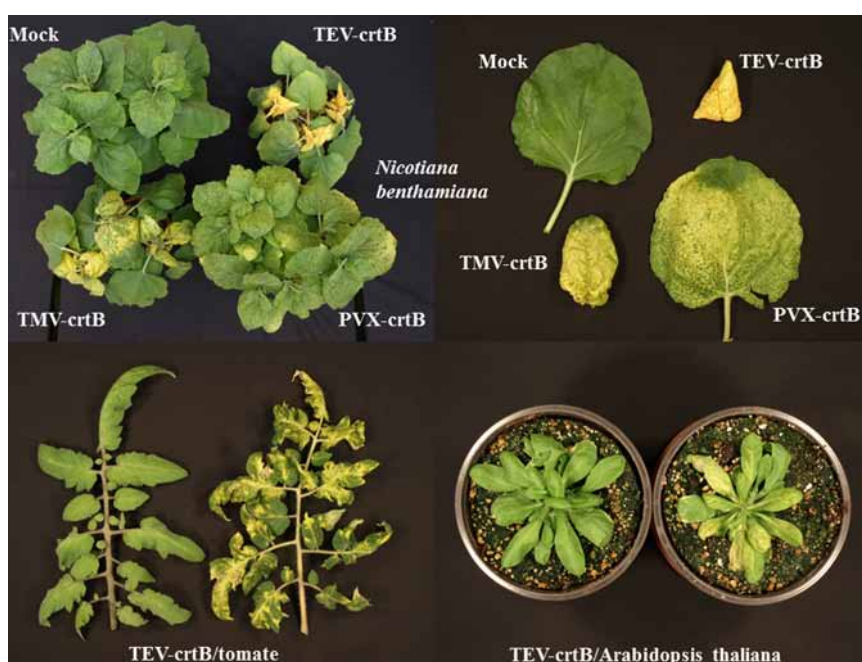


Figura 3. La crtB de *Pantoea ananatis* es un nuevo marcador visual amarillo de las infecciones virales en plantas. Fotos de plantas y hojas de *Nicotiana benthamiana*, tomate y *Arabidopsis thaliana* infectadas por clones del TEV, TMV y PVX etiquetados con crtB.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Majer E., Z. Salvador, M.P. Zwart, A. Willemsen, S.F. Elena and J.A. Daròs (2014). Relocation of the NIb gene in the tobacco etch potyvirus genome. *J. Virol.*, **88**: 4586-4590. DOI: 10.1128/JVI.03336-13.

Majer, E., J.A. Navarro and J.A. Daròs (2015). A potyvirus vector efficiently targets recombinant proteins to chloroplasts, mitochondria and nuclei in plant cells when expressed at the amino terminus of the polyprotein. *Biotechnol. J.*, **10**: 1792-1802. DOI: 10.1002/biot.201500042.

Majer, E., B. Llorente, M. Rodríguez-Concepción and J.A. Daròs (2016). Rewiring carotenoid biosynthesis in plants using a viral vector. *Sci. Rep.* (evaluado positivamente).

José María Sanz Martín



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Estudio y caracterización funcional de efectores implicados en la interacción *Colletotrichum graminicola*-maíz” el 7 de octubre de 2016 en la Universidad de Salamanca. La Tesis se realizó en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE)-Dpto. de Microbiología y Genética, bajo la dirección de los Dres. Michael R. Thon y Serenella A. Sukno. El tribunal estuvo constituido por la Dra. Lucía Ramírez Nasto (Universidad Pública de Navarra), el Dr. Ralph A. Dean (North Carolina State University (NCSU), Estados Unidos de América) y el Dr. Íñigo Zabalgogezcoa (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, IRNASA). La Tesis obtuvo la calificación Sobresaliente *Cum Laude* con mención de Doctorado Internacional.



El autor junto con el Tribunal y los Directores de la Tesis Doctoral. De izquierda a derecha: Íñigo Zabalgogezcoa González, Serenella A. Sukno, Lucía Ramírez Nasto, José María Sanz Martín, Ralph A. Dean y Michael R. Thon

Colletotrichum graminicola es el agente causal de la antracnosis del maíz, una de las enfermedades más devastadoras a nivel mundial que sufre este cultivo de enorme interés agroalimentario. Este hongo ascomiceto es un patógeno que desarrolla un estilo de vida hemibiotrofo. Su ciclo de infección comienza colonizando tejidos vivos de la planta y estableciendo una asociación en la cual forma hifas biotróficas. Posteriormente, estas hifas cambian a un estilo de vida necrotrófico, caracterizado por el colapso de la célula huésped y la aparición de los síntomas

de la antracnosis. Durante todo este proceso de infección, el hongo secreta de forma altamente regulada cientos de proteínas efectoras que se encargan de modular o suprimir las respuestas defensivas del huésped.

El objetivo de esta Tesis consistió en caracterizar funcionalmente dos proteasas y una proteína específica de *C. graminicola*, las cuales fueron seleccionadas como presumibles efectores putativos, en base a la información obtenida en análisis previos realizados por nuestro grupo de investigación.

En primer lugar se llevó a cabo el estudio y caracterización de una metaloproteasa fungalisina (Cgfl) de la familia M36. Los estudios filogenéticos indicaron que esta fungalisina se encuentra muy conservada entre los hongos de la clase Sordariomycetes. Por otra parte, también se identificó que a lo largo de la evolución se han producido eventos de pérdida y duplicación de este gen. De manera interesante, la mayoría de las pérdidas génicas se han dado en especies de hongos saprófitos como *Neurospora* o *Chaetomium*, lo que sugiere la posibilidad de que esta proteasa sea un requisito necesario, entre otros muchos, para adquirir la capacidad de infectar plantas. Mediante experimentos de PCR a tiempo real se analizó el patrón

de expresión génica durante el proceso de infección y se observó que este gen se expresa de manera evidente a las 36 hpi alcanzando su máximo a las 60 hpi, durante la etapa biotrófica de la infección. Estos resultados se corroboraron mediante la visualización con microscopía confocal de una cepa de *C. graminicola* que contenía una construcción de fusión entre la región promotora del gen *Cgfl* y la proteína verde fluorescente (GFP). Para determinar el posible papel de Cgfl como efector durante el proceso de infección, se obtuvieron transformantes delecionados en el gen y los resultados tanto en hoja como en raíz, mostraron una reducción significativa en la virulencia de estos transformantes con respecto a la cepa silvestre M1.001.

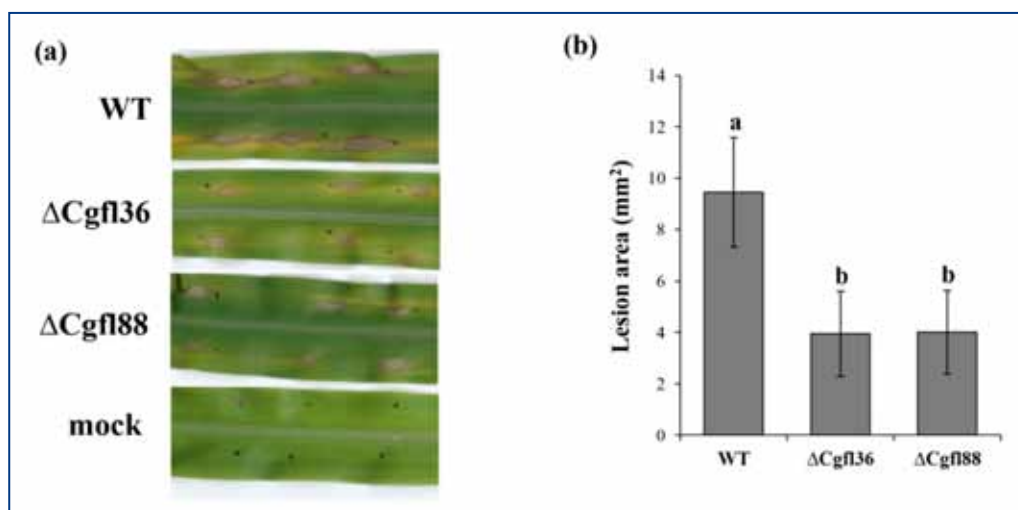


Figura 1. Antracnosis en hojas de maíz inducida por *Colletotrichum graminicola*. (a) Imágenes de las hojas inoculadas con la cepa silvestre (WT), las cepas delecionadas ($\Delta Cgfl36$ y $\Delta Cgfl88$) y sin inocular (mock) tomadas a 96 hpi. (b) Área de lesión en hojas a 96 hpi.

Además, se llevaron a cabo estudios de actividad endoproteolítica *in vitro* con los transformantes $\Delta Cgfl$, los cuales mostraron una menor actividad proteolítica respecto a la cepa silvestre M1.001. Adicionalmente, se realizó un estudio de actividad quitinasa *in planta* utilizando un sustrato artificial para quitinasas. De esta forma, se observó que las muestras de plantas inoculadas con los transformantes $\Delta Cgfl$ mostraron una actividad quitinasa mayor que aquellas muestras de plantas inoculadas con la cepa silvestre M1.001. En conjunto, estos resultados sugieren que Cgfl es una metaloproteasa fungalisina implicada en la

degradación de quitinasas de planta. Por último, se descubrió que el genoma del *C. graminicola* codifica para dos efectores homólogos de Ecp6, un efector presente en otros hongos fitopatógenos e implicado en alterar la inmunidad mediada por quitina. Además, se demostró que estos homólogos son funcionales y se expresan durante la etapa biotrófica de la infección. De esta manera, sugerimos que *C. graminicola* emplea diversos efectores, tanto la fungalisina como los homólogos de Ecp6, para suprimir la respuesta de defensa de la planta relacionada con la quitina.

En el segundo capítulo se analiza la implicación de una subtilisina (CPLS) de *C. graminicola* como posible efector durante la infección en la planta. Esta subtilisina es una serín-proteasa de la familia S8A identificada en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, como un gen candidato que sufrió un evento de transferencia horizontal desde las plantas hacia un ancestro del género *Colletotrichum*. Los análisis filogenéticos demostraron que únicamente se encuentran homólogos de CPLS en los géneros *Colletotrichum* y *Diaporthe*, con lo cual es posible que el evento de transferencia horizontal se diera en un ancestro común de ambos géneros. Mediante PCR a tiempo real y estudios de microscopía confocal utilizando cepas de fusión entre la región promotora de CPLS y la GFP, se observó que el gen CPLS se expresaba durante la etapa biotrófica de la infección, con un máximo a las 48 hpi. Los transformantes delecionados en el gen CPLS (Δ CPLS) mostraron un aumento en el tamaño de lesión en hojas de maíz con respecto a la cepa silvestre M1.001. Además, estos transformantes presentaron una reducción de biomasa en hoja de maíz, lo cual indica que la proteína CPLS contribuye a la acumulación de biomasa durante el crecimiento del hongo. Por otra parte, no se detectaron diferencias durante la infección en raíz entre los transformantes Δ CPLS y la cepa silvestre M1.001, lo cual sugiere que este efector es específico de tejido y actúa únicamente durante la infección en las hojas. Para intentar determinar si el gen CPLS se encuentra relacionado con los procesos de muerte celular programada (PCD) en la planta, realizamos análisis mediante PCR a tiempo real de dos genes de maíz codificantes de proteínas receptoras inmunes tipo CC-NLR, implicadas en PCD y respuesta hipersensible (HR). Los resultados mostraron que estos dos genes se encuentran suprimidos durante las primeras etapas de la infección con la cepa silvestre M1.001, e inducidos durante las 24 hpi y las 96 hpi de la infección con los transformantes Δ CPLS. De este modo, es posible pensar que este efector conservado en *Colletotrichum* estaría implicado en la modulación de los procesos de PCD en la planta, favoreciendo con ello una colonización

controlada sobre el huésped.

Por último, se analizó y caracterizó funcionalmente la proteína CgEP3 de *C. graminicola*. Consta de un dominio N-terminal que contiene un péptido señal, el cual solapa con una región que muestra semejanza a los dominios N-terminal de las nucleósido fosforilasas (NP), pero carece de la longitud completa del dominio NP encontrado en las proteínas de otros hongos. La región C-terminal no muestra similitud con ningún dominio funcional conocido, pero sí tiene similitud con alguna región de proteínas con dominios NP. Esto indica que ambos dominios están sujetos a presiones evolutivas asimétricas. El dominio NP, bajo selección purificadora, refleja menos acumulación de cambios, mientras que el dominio C-terminal se encuentra menos conservado y evolucionó más rápidamente.

El árbol filogenético con la región N-terminal mostró que CgEP3 se agrupa con los homólogos de otras especies de *Colletotrichum* o *Verticillium*, encontrando además otras proteínas que, como CgEP3, muestran solapamiento de su péptido señal con la región N-terminal del dominio NP. Además, la filogenia mostró varios eventos de duplicación y pérdida a lo largo de la evolución de esta familia de genes. Todo ello indica que CgEP3 desciende de un subfamilia de proteínas secretadas NP, perdida en muchas especies de hongos pero mantenida aún en otros como *Aspergillus* o *Talaromyces*.

La expresión del gen se analizó mediante PCR a tiempo real y análisis con microscopía confocal utilizando cepas de fusión entre el promotor del gen CgEP3 y la GFP, observándose que el gen CgEP3 se expresaba durante las etapas más tempranas de la infección en planta.

Por último, el estudio de transformantes delecionados en el gen CgEP3 mediante medición del área de lesión en la hoja y estimación de la biomasa utilizando PCR a tiempo real, indicó que los transformantes Δ CgEP3 presentaban una acusada reducción de la virulencia con respecto a la cepa silvestre

M1.001. En conjunto, estos resultados sugieren que CgEP3 se comporta como un

efector, actuando durante las etapas más tempranas del proceso de antracnosis.

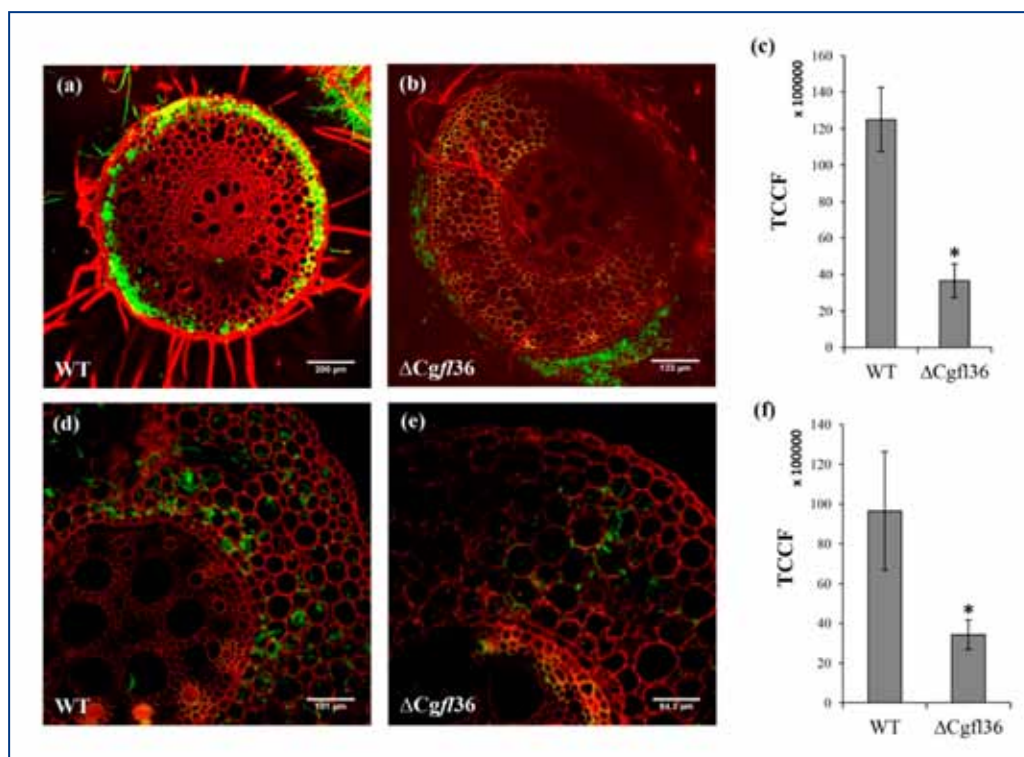


Figura 2. Imágenes de microscopía confocal de raíces de maíz inoculadas con la cepa silvestre M1.001 y la cepa transformante Δ Cgfl36, y cuantificación de fluorescencia a 6 dpi (a, b, c) y 12 dpi (d, e, f).

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Los estudios recogidos en esta Tesis Doctoral se realizaron en el Instituto CIALE-Dpto. de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y en la estancia de investigación en The Samuel Roberts Noble Foundation, Oklahoma, Estados Unidos de América. Los resultados han dado lugar a la publicación de varios artículos científicos, así como otras tres publicaciones en progreso y diversas comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

Sanz-Martín JM, Pacheco-Arjona JR, Bello-Rico V, Vargas WA, Monod M, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. 2016. A highly conserved metalloprotease effector enhances virulence in the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant Pathology* **17**: 1048–1062.

Sanz-Martín JM, Postigo V, Mateos A, Albrecht B, Munkvold GP, Thon MR, Sukno SA. 2016. First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose stalk rot in the Alentejo region, Portugal. *Plant Disease* **100**: 648.

Vargas WA, Sanz-Martín JM, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. 2012. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. *Plant Physiology* **158**: 1342–1358.

Rech GE, Sanz-Martín JM, Anisimova M, Sukno SA, Thon MR. 2014. Natural selection on coding and noncoding DNA sequences is associated with virulence genes in a plant pathogenic fungus. *Genome Biology and Evolution* **6**: 2368–2379.

Jesús Martínez Cruz



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Análisis morfológico y funcional de la interacción *Podosphaera xanthii*-cucurbitáceas” en la Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga bajo la dirección de los doctores Alejandro Pérez García y Diego F. Romero Hinojosa. El tribunal estuvo constituido por los doctores Cayo Juan Ramos Rodríguez (Universidad de Málaga), Michael Ronald Thon (Universidad de Salamanca) y Antonieta de Cal y Cortina (INIA). La Tesis obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



De izquierda a derecha, directores (Diego Romero y Alejandro Pérez García), doctorando (Jesús Martínez) y miembros del tribunal (Cayo Ramos, Antonieta de Cal y Michael Thon).

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren las células vivas de su hospedador para su crecimiento. Estos patógenos desarrollan una estructura especializada responsable de la absorción de nutrientes y la secreción de efectores en la planta denominada ‘haustorio’. Los efectores son pequeñas proteínas secretadas

responsables de proporcionar un entorno adecuado para el desarrollo del patógeno, manipulando, entre otros aspectos, la respuesta de defensa de la planta. En *Podosphaera xanthii*, principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas en el sur de España, se han identificado hasta la fecha 138 proteínas efectoras secretadas candidatas

(CSEP).

En este trabajo hemos llevado a cabo el aislamiento y análisis morfológico del haustorio de *P. xanthii*, primero en el interior de las células epidérmicas de melón con el fin de determinar su estructura y facilitar su aislamiento. Posteriormente, para estudiar en detalle la morfología de los haustorios de *P. xanthii* se llevó a cabo la puesta a punto de un método de aislamiento selectivo de haustorios a partir de cotiledones de calabacín densamente infectados. Mediante técnicas de microscopía láser confocal (CLSM) observamos diferentes

estructuras del haustorio como el cuerpo, lóbulos, cuello y septum (Figura 1). En paralelo, se realizó una tinción vital de haustorios de *P. xanthii* con un colorante específico de membranas, observándose un patrón diferente en la distribución de pequeñas vesículas, endosomas y cuerpos multivesiculares (Multivesicular bodies, MVB), entre lóbulos y cuerpo del haustorio (Figura 2), sugiriendo que los lóbulos serían los máximos responsables del tráfico de vesículas y, probablemente, los principales mediadores del diálogo molecular con la planta.

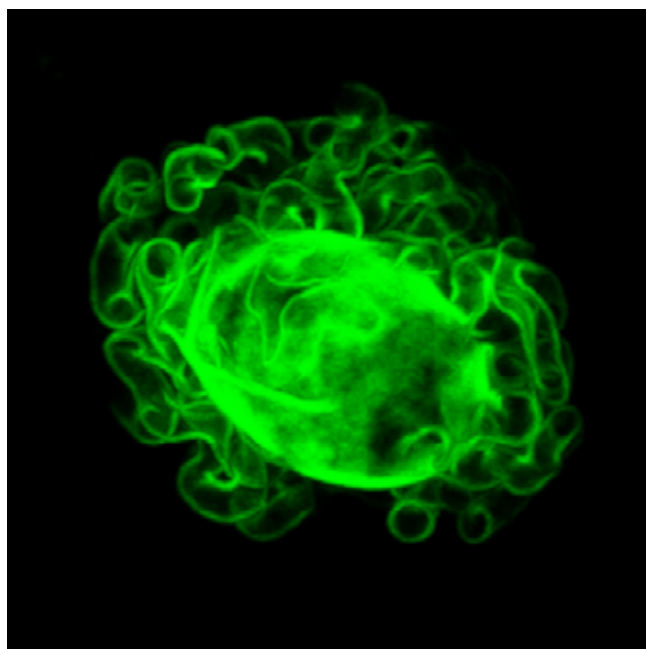


Figura 1. Visualización de la pared celular de un haustorio aislado de *Podosphaera xanthii* marcado específicamente con Alexa Fluor 488® conjugado a aglutinina de germen de trigo (WGA).

Además, hemos puesto a punto la metodología necesaria para la transformación de *P. xanthii* empleando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. De esta forma, hemos desarrollado dos vías distintas para la transformación de *P. xanthii*; i) transformando directamente conidios y ii) la transformación indirecta a través del haustorio. Mediante ambas metodologías

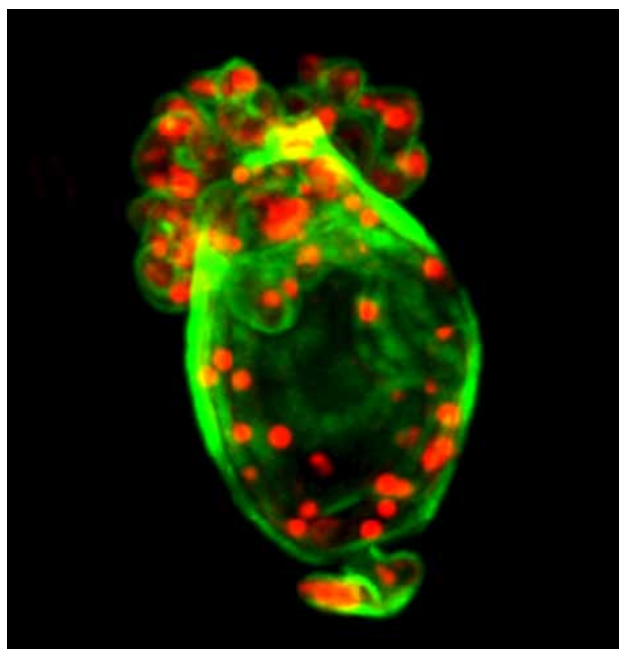


Figura 2. Doble tinción para la visualización de la pared celular (verde) y del conjunto de vesículas (rojo) de un haustorio aislado de *Podosphaera xanthii*. La tinción se llevó a cabo con el conjugado WGA-Alexa Fluor 488® (pared celular, verde) y el colorante de membranas FM4-64 (vesículas, rojo).

hemos obtenido colonias resistentes a higromicina B o a carbendazima. Además, estas colonias mostraban gran fluorescencia como consecuencia de la expresión de la proteína GFP (Figura 3).

Los análisis moleculares determinaron la integración del T-DNA en el genoma de *P. xanthii*. En lo referente a la estabilidad observamos que la

transformación directa de conidios el DNA introducido se mantenía durante sucesivas generaciones sólo en presencia del agente de selección. En el caso de la transformación indirecta no obtuvimos colonias transformadas más allá de la primera generación. No obstante, estas técnicas permitieron hacer estudios de localización de efectores.

Para el estudio funcional de efectores llevamos a cabo dos vías de análisis: i) silenciamiento de los efectores en cotiledones de melón mediante *A. tumefaciens* y ii) análisis informáticos basados en el modelaje de las proteínas y la predicción de ligando y función. Mediante el uso conjunto de estas metodologías hemos identificado los primeros efectores de *P. xanthii* entre los

que destaca una nueva familia de quitinasas secretadas en la papila de la planta. Estas quitinasas denominadas ECHA ("Effectors with CHitinase Activity"), parecen estar ampliamente distribuidas y conservadas en multitud de hongos todos ellos patógenos. Los análisis de actividad mostraron su papel en la interacción con la planta, degradando los residuos de quitina liberados de la pared celular del hongo. Finalmente, y derivado de un gen de quitina deacetilasa, hemos identificado un nuevo efector con afinidad por la quitina denominado CHBE1 (CHitin Binding Effector 1) que sería un homólogo funcional al efector ECP6 de *Cladosporium fulvum*, aunque su estructura no tendría nada que ver.

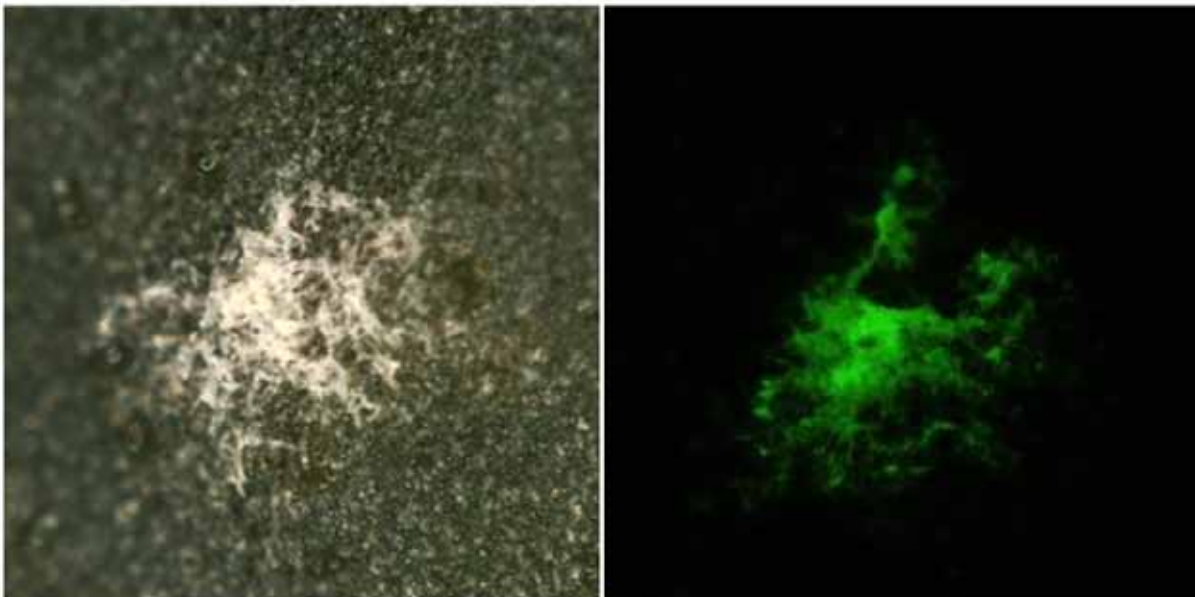


Figura 3. Colonia de *Podosphaera xanthii* transformada mediante *Agrobacterium tumefaciens* mostrando fluorescencia verde debida a la expresión de GFP.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Martínez-Cruz, J., Romero, D., Dávila, J. C., Pérez-García, A. 2014. The *Podosphaera xanthii* haustorium, the fungal Trojan horse of cucurbit-powdery mildew interactions. *Fungal Genetics and Biology* 71: 21-31.

Martínez-Cruz, J., Romero, D., de Vicente, A., Pérez-García, A. 2016. Transformation of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.14297.

**NOVEDAD****Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides**

Editado por: M.A. Ayllon, M. Cambra, C. Llave y E. Moriones
2016; 662 pág.

Sociedad Española de Fitopatología

Publicado por: Bubok
<http://www.bubok.es/autores/SEFLIBROS>

Edición en papel: 45 €

e-book: 9,9 €

CONTENIDO: Los virus y viroides son admirables armas de destrucción masiva. Son la causa de frecuentes enfermedades con muy alto impacto económico y de muy difícil control en el mundo vegetal. También son un paradigma de simplicidad biológica que los sitúa en la frontera de la vida y tienen múltiples aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas.

La Sociedad Española de Fitopatología (SEF), en su afán de generar, aunar y difundir la información más actualizada sobre las enfermedades de plantas, los patógenos que las causan y los métodos para su control ha querido promover la publicación de este libro sobre las enfermedades causadas por virus y viroides. Los autores y editores son científicos de primera línea internacional que han reunido en esta obra actual y única en castellano, diversos capítulos que profundizan en aspectos tanto básicos como aplicados, para un mejor conocimiento de los virus y viroides y de las enfermedades que ocasionan. El libro está cuidadosamente ilustrado con fotos, figuras y todo lo necesario para mejorar la comprensión y favorecer la lectura amena de investigadores, profesores, estudiantes, estudiosos y técnicos relacionados con la Patología Vegetal, pues a ellos va destinado.

Disponible en:

<http://www.bubok.es/libros/247548/Enfermedades-de-plantas-causadas-por-virus-y-viroides>

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

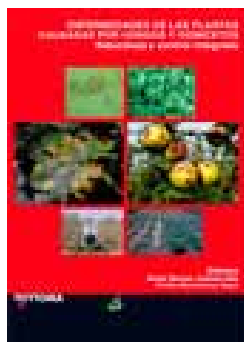


CONTENIDO: Nematodos fitoparásitos. Detección, extracción y diagnóstico de nematodos fitoparásitos. Interacción planta-nematodo: Mecanismos de patogénesis celular. Interacciones planta-nematodo: Resistencia vegetal. Dinámica de poblaciones, epidemiología y umbrales de daño. Estrategias de control integrado 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.Rodríguez-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.

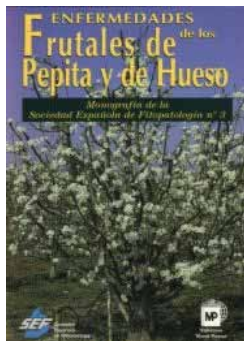
PATOLOGÍA VEGETAL (2 VOLUMENES)

Editado por: G.Llácer, M.M.López, A.Trapero, A.Bello

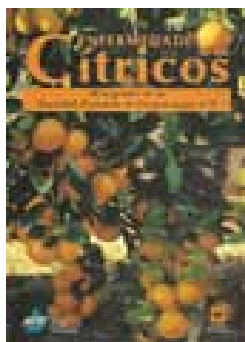
Publicado por: Mundi Prensa Libros SA - Phytoma. ISBN: 84-921910-5-8



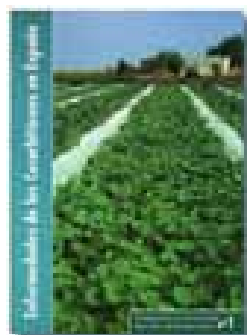
CONTENIDO: Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas. Patogénesis de virus de plantas. Resistencia a virus de plantas. ARNs satélites y ARNs defectivos interferentes. Viroides. Diagnóstico de virosis: técnicas clásicas. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. Técnicas 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 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.

ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS**Editado por:** N. Durán, P. Moreno**Publicado por:** Mundi Prensa Libros SA. ISBN: 84-7114-862-5

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 .

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

PATÓGENOS EN ESPAÑA

NOTA INFORMATIVA:

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

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

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

HONGOS y OOMICETOS

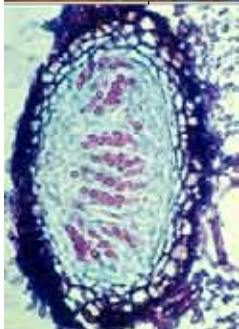
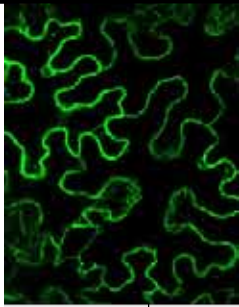
First report of *Pleurostomophora richardsiae* causing grapevine trunk disease in Spain. Pintos Varela, C., Redondo Fernández, V., Aguín Casal, O., Ferreiroa-Martínez, V. & Mansilla Vázquez, J.P. Plant Disease 100 (10): 2168, DOI: 10.1094/PDIS-04-16-0444-PDN

First report of branch dieback in mango trees caused by *Neofusicoccum parvum* in Spain. Arjona-Girona, I. & López-Herrera, C.J. Plant Disease 100 (12): 2529, DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0596-PDN

First Report of *Sclerotium rolfsii* causing soft rot of potato tubers in Spain. Roca-Castillo, L.F., Raya-Ortega, C., Luque Marquez, F., Agustí-Brisach, C., Romero-Rodríguez, J. & Trapero-Casas, A. Plant Disease 100 (12): 2535, 10.1094/PDIS-12-15-1505-PDN

First Report of Fusarium wilt of *Albizia julibrissin* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *perniciosum* in Spain. Berbegal, M., Marín-Terrazas, M., Ramón-Albalat, A., León, M. & Armengol, J. Journal of Plant Pathology 98 (3): 694

First Report of *Phytophthora* × *multiformis* on *Alnus glutinosa* in Spain. Pintos-Varela, C., Rial-Martínez, C., Aguín-Casal, O. & Mansilla-Vázquez, J.P. Plant Disease 101 (1): 261, 10.1094/PDIS-08-16-1092-PDN





BACTERIAS

First report of Bark Canker Disease of Poplar caused by *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* in Spain. Berruete, I.M., Cambra, M.A., Collados, R., Monterde, A., López, M.M., Cubero, J. & Palacio-Bielsa, A. *Plant Disease* 100 (10): 2159, DOI: 10.1094/PDIS-03-16-0405-PDN

First report of *Dipladenia* (*Mandevilla* spp.) Leaf and Stem Spot caused by *Pseudomonas savastanoi* in Spain. Caballo-Ponce, E. & Ramos. *C. Plant Disease* 100 (11): 2319, DOI:10.1094/PDIS-03-16-0334-PDN

Iberian wild pear (*Pyrus bourgaeana*) is a new host of *Erwinia amylovora*, the causal agent of Fire blight. Marco-Nogales, E., Peñalver, J., Navarro, I., Gorris, M.T., Morente, M.C., Balguerías, C., Ramírez, J.A., Recio, C., Ruíz de la Hermosa, T., Sancho, R., Aedo, C. & López, M.M.. *Plant Disease, First look*, DOI:10.1094/PDIS-09-16-1251-PDN

VIRUS y VIROIDES

First report of Little cherry virus 1 (LChV-1) in sweet cherry in Spain. Ruiz-García, A.B., Martínez, C., Santiago, R., García, M.T., de Prado, N. & Olmos, A. *Plant Disease* 100 (11): 2340, DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0620-PDN

First report of Grapevine Red Globe Virus in grapevine in Spain. Cretazzo, E., Padilla, C.V. & Velasco, L. *Plant Disease* 101 (1): 264, DOI:10.1094/PDIS-06-16-0932-PDN

First report of a new *Pepper Mild Mottle Virus* pathotype 1,2 on pepper in Spain. Ruíz, L., García, C., Simón, A. & Jansen, D. *Journal of Plant Pathology* 98 (3): 678

First Report of *Maize chlorotic mottle virus* on a perennial host, *Sorghum halepense*, and maize in Spain. Achón, M.A., Serrano, L., Clemente-Orta, G. & Sossai, S. *Plant Disease, First look*, 101 (1): 264, DOI: 10.1094/PDIS-09-16-1261-PDN

NEMATODOS

***Xiphinema andalusiense* sp. nov., *Xiphinema celtiense* sp. nov., *Xiphinema iznajareense* sp. nov., *Xiphinema mengibareense* sp. nov., and two new records *X. cadavalense* y *X. conurum*, En: Remarkable diversity and prevalence of Dagger nematodes of the genus *Xiphinema* Cobb, 1913 (Nematoda: Longidoridae) in olives revealed by integrative approaches.** Archidona-Yuste, A., Navas-Cortés, J.A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J.E., Castillo, P. 2016. *PLoS ONE* 11 (11), e0165412. DOI: 10.1371/journal.pone.0165412

3rd HEMIPTERAN-PLANT INTERACTIONS SYMPOSIUM

Fechas: 4 a 8 de junio 2017, Madrid



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

15th CONGRESS OF THE MEDITERRANEAN PHYTOPATHOLOGICAL UNION

Fechas: 20 a 23 de junio 2017, Córdoba



INFORMACIÓN: <http://mpucordoba.mpunion.eu/>

X CONGRESO NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA APLICADA

Fechas: 15 al 20 de octubre 2017, Logroño



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

12th EUROPEAN FOUNDATION FOR PLANT PATHOLOGY CONFERENCE

Fechas: 29 mayo a 2 junio 2017, Dunkerke, FRANCE



INFORMACIÓN: <http://www.efpp12sfp10.univ-littoral.fr/>

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

INMUNIDAD BASAL Y DEFENSA ANTIVIRAL EN LAS PLANTAS

**Irene Guzmán-Benito¹, Laura Diezma¹, Livia Donaire¹,
Virginia Ruíz-Ferrer¹, Andrzej T. Wierzbicki² y César Llave¹**

1. Departamento de Biología Medioambiental. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

2. Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan, USA

Trabajo galardonado con el Premio SEF-Phytoma a la mejor COMUNICACIÓN ORAL en el XVIII Congreso SEF celebrado en Palencia en septiembre de 2016

Las enfermedades de las plantas causadas por organismos fitopatógenos representan un problema global que afecta a la producción y seguridad alimentaria en todo el planeta. Aproximadamente 150 especies de bacterias, de las 7.100 especies clasificadas, causan enfermedades en las plantas, mientras que cerca de 8.000 especies de hongos y 73 géneros de virus son fitopatógenos. Sin embargo, no todos los agentes infecciosos que invaden una planta son capaces de inducir enfermedad dado que su potencial patogénico depende en gran medida de su habilidad para evadir y/o suprimir la compleja y sofisticada red de estrategias defensivas de la planta. Para protegerse a sí mismas, las plantas han desarrollado una gran variedad de defensas constitutivas que incluyen barreras físicas preformadas como la pared celular, la cera cuticular, la presencia de pelos, la corteza, etc. Estas barreras protegen a la planta de la invasión al tiempo que proporcionan rigidez y soporte. Pero además, todas las células vegetales tienen la facultad de detectar al patógeno invasor y responder con una batería de defensas inducibles que conforman el sistema inmune de la planta [1].

La inmunidad basal en las plantas

La respuesta inmune de la planta se moviliza cuando la célula vegetal percibe ciertas estructuras y/o compuestos microbianos altamente conservados y conocidos como patrones moleculares asociados al patógeno/microbio (PAMPs/MAMPs, del inglés *pathogen/microbial-associated molecular patterns*) [2,3]. Estos patrones son reconocidos por complejos proteicos de la membrana celular llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del

inglés *pathogen recognition receptors*). Incluso ciertos restos celulares que se generan en el exterior de la célula por la acción de enzimas líticas del microbio pueden actuar como patrones moleculares asociados al daño (DAMP, del inglés *damage-associated molecular pattern*) y ser reconocidos por estos receptores. La unión de cualquiera de estos ligandos al receptor PRR dispara una cascada de señalización que resulta en cambios en el patrón de expresión de los genes de la planta [4]. Estos cambios permiten activar respuestas defensivas

tales como la síntesis de proteínas y compuestos de defensa, la aclimatación metabólica, la alcalinización del citoplasma (que favorece el control de la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la producción de hormonas de defensa o el cierre de estomas), etc. Sobre esta serie de acontecimientos se vertebra la inmunidad basal de las plantas, también conocida como inmunidad desencadenada por PAMP (PTI, del inglés *PAMP-triggered immunity*) [5]. En este escenario algunos patógenos han evolucionado produciendo una batería de proteínas efectoras que son inyectadas al interior de la célula a través de sistemas de secreción que atraviesan la pared celular. Estos efectores, que contribuyen a la virulencia del patógeno, interfieren con distintas etapas de la inmunidad basal activando la transcripción de genes de la planta, interfiriendo con la actividad de factores de transcripción del huésped o alterando la estructura de la cromatina [6]. En contraposición, la planta ha desarrollado un repertorio adicional de receptores inmunológicos codificados por genes de resistencia (gen *R*) que reconocen al efector patogénico y disparan una segunda línea de inmunidad innata conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI, del inglés *effector-triggered immunity*) [7].

El grupo más amplio de proteínas de resistencia (proteínas *R*) lo forman los receptores intracelulares con dominios de unión a nucleótidos (NB, del inglés *nucleotide-binding*) y repeticiones ricas en leucinas (LRR, del inglés *leucine-rich repeat*). Algunos genes *R* codifican proteínas NB-LRR con un dominio en posición amino terminal similar a los receptores Toll and Interleukin-1 (TIR1, del inglés *Toll and Interleukin-1 receptors*) que median respuestas inmunes en animales (TIR-NB-LRR). Otros codifican proteínas con un dominio de hélice superenrollada (CC, del inglés *coiled-coil*) en su extremo amino (CC-NB-LRR). Una vez las proteínas *R* reconocen al efector patogénico, directa o indirectamente, se disparan una serie de

respuestas inmunes que en muchos casos se superponen con mecanismos típicamente asociados a la inmunidad basal y que a menudo resultan en una muerte celular programada conocida como respuesta hipersensible (HR, del inglés *hypersensitive response*) [8].

Vías de señalización en la respuesta inmune

Pero, ¿cómo se generan estas vías de señalización de defensa frente a los patógenos? La percepción selectiva de los patrones PAMP microbianos induce a la heteromerización de los receptores PRR [4]. Estos receptores de superficie incluyen quinasas receptoras (RLK, del inglés *receptor-like kinase*) y proteínas receptoras sin actividad quinasa (RLP, del inglés *receptor-like protein*) [2]. Las proteínas de membrana RLK poseen un dominio extracelular con el que unen el ligando microbiano, un dominio transmembrana y un dominio intracelular cuya actividad quinasa les permite fosforilar otras proteínas y operar así como transductor de señales [9]. Esta unión receptor-ligando favorece la asociación del receptor con la proteína RLK de membrana BAK1 y la consiguiente transfosforilación mutua de sus dominios quinasa (Figura 1) [10]. Este proceso comporta un cambio conformacional que inicia una cascada de señalización mediada por proteínas quinasas activadas por mitógeno (factor que promueve la proliferación celular en eucariotas) [9,11]. Esta vía estimula la síntesis de factores de transcripción que controlan la expresión de genes de defensa [5]. *BAK1* es por tanto un regulador esencial en la inmunidad basal de las plantas pues es capaz de interactuar con distintos receptores RLK y RLP e integrar la percepción de múltiples patrones microbianos en eventos de señalización de defensa [12]. *BAK1* es además un componente crítico en la respuesta ETI actuando como regulador negativo de la muerte celular programada en respuesta a patógenos necrotrofos [13].

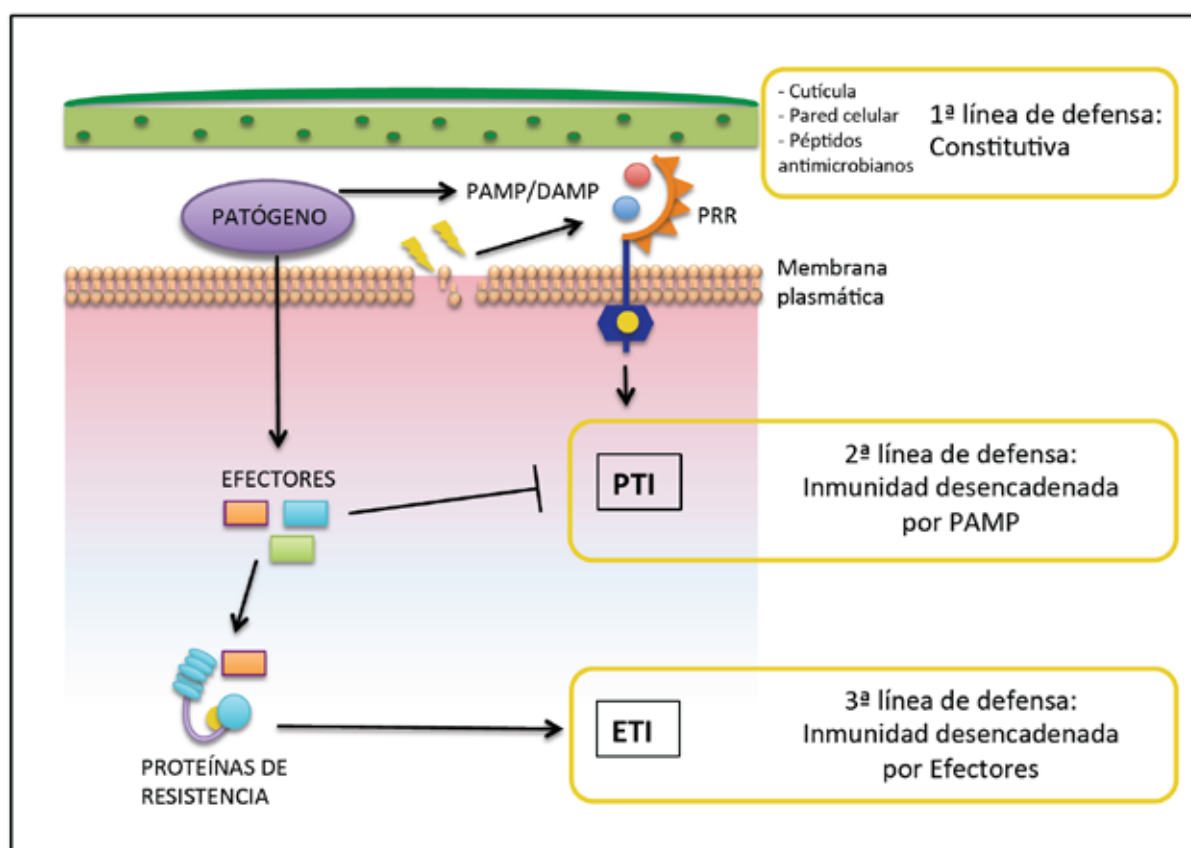


FIGURA 1. El sistema de inmunidad innata en plantas presenta diferentes líneas de defensa que se inducen una vez que el patógeno supera la barrera física que proporcionan la cutícula, la pared celular o la secreción de péptidos antimicrobianos. La percepción de compuestos derivados del patógeno (PAMP), o del daño celular (DAMP) por proteínas de membrana receptoras (PRR), dispara una cascada de señalización que culmina en una respuesta defensiva conocida como inmunidad desencadenada por PAMP (PTI). Algunos patógenos sintetizan proteínas conocidas como efectores que interfieren con procesos de la inmunidad PTI. Frente a ellos, las plantas han desarrollado proteínas de resistencia que reconocen los efectores patogénicos y activan la tercera línea defensiva conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI).

Regulación de la respuesta inmune

La activación constitutiva de la respuesta inmune lleva implícito un coste energético que en ausencia del patógeno resulta perjudicial para la planta. Por ejemplo, la expresión constitutiva de proteínas de resistencia puede provocar muerte celular e inhibición del crecimiento. Por ello estas vías de inmunidad deben estar sujetas a un estricto control que impida que la eficacia biológica de la planta pueda verse comprometida. La proteína de membrana BIR1 desempeña un papel clave en este proceso pues actúa como regulador negativo de la inmunidad innata basal y de la muerte celular programada asociada a proteínas de resistencia [14].

De hecho, las plantas en las que BIR1 no es funcional presentan una activación permanente de las defensas y graves trastornos en el desarrollo [14]. En situaciones normales de crecimiento, BIR1 interacciona específicamente con BAK1 (y no con otras proteínas RLKs) y previene la formación espontánea de los complejos BAK1-receptor que son necesarios para iniciar la cascada de señalización (Figura 2) [14]. Sin embargo, en presencia del patógeno, la percepción del patrón microbiano y su unión con el receptor de membrana permiten la liberación de BAK1 y la formación de los complejos BAK1-receptor que transducen la señal de defensa [12]. Por tanto, la unión entre BAK1 y BIR1

es crítica para entender cómo las plantas sortean la activación constitutiva de sus defensas. Recientemente se han descrito en *Arabidopsis* dos genes homólogos de *BIR1* conocidos como *BIR2* y *BIR3*. Ambos actúan como represores de PTI limitando la formación de complejos BAK1-receptor PRR e impidiendo así respuestas autoinmunes. A diferencia de *BIR1*, al menos *BIR2* es incapaz de fosforilar otras proteínas lo que sugiere que pudiera actuar siguiendo una

ruta de señalización diferente a *BIR1* [15]. A pesar del papel crítico que desempeñan estos elementos en el control de la respuesta inmune, nuestro conocimiento de sus mecanismos de regulación es muy limitado hasta el momento. No obstante, cada vez disponemos de más evidencias que demuestran que el silenciamiento génico es un modulador esencial en las respuestas inmunes de tipo PTI y ETI [16].

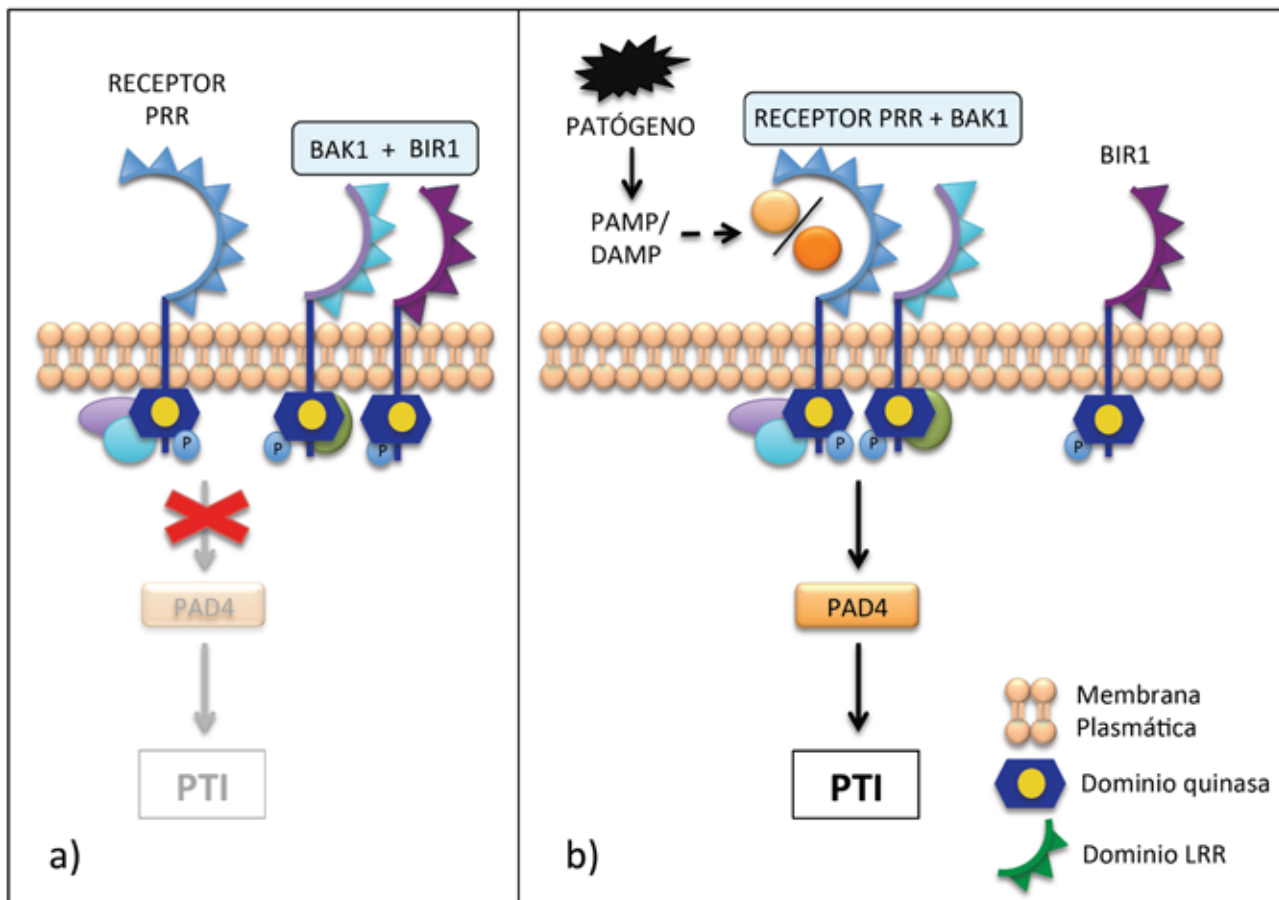


FIGURA 2. En situaciones normales de crecimiento y desarrollo *BIR1* secuestra *BAK1* en la membrana plasmática impidiendo la asociación espontánea de *BAK1* con el receptor PRR. De esta forma se evita el inicio de la cascada de señalización que activaría constitutivamente la respuesta PTI mediante la vía de *PAD4*, que actúa como nexo común para la expresión de múltiples genes de defensa (a). Durante una infección, el receptor PRR de membrana percibe los compuestos PAMP o DAMP asociados al patógeno, provocando un cambio conformacional que permite la liberación de *BAK1* y la formación del complejo *BAK1*-receptor PRR. La unión de *BAK1* con el receptor de membrana dispara la cascada de señalización que activa la respuesta inmune PTI frente al patógeno (b).

Silenciamiento génico y respuesta inmune

El silenciamiento génico, también conocido como silenciamiento por RNA, es clave en la regulación transcripcional

y post-transcripcional de los genes eucariotas [17]. Se trata de un mecanismo que emplea pequeñas moléculas de RNA de 20 a 24 nucleótidos como determinantes de especificidad para que los complejos

proteicos efectores de silenciamiento puedan reconocer secuencias diana complementarias en el RNA o el DNA de la planta [18]. La interacción de los complejos de silenciamiento con el RNA mensajero provoca su degradación y/o la inhibición de su traducción.

La interacción con el DNA genómico conlleva la represión transcripcional de los genes diana a través de un proceso epigenético conocido como metilación del DNA dependiente de RNA (RdDM, del inglés *RNA-dependent DNA methylation*) (Figura 3) [19].

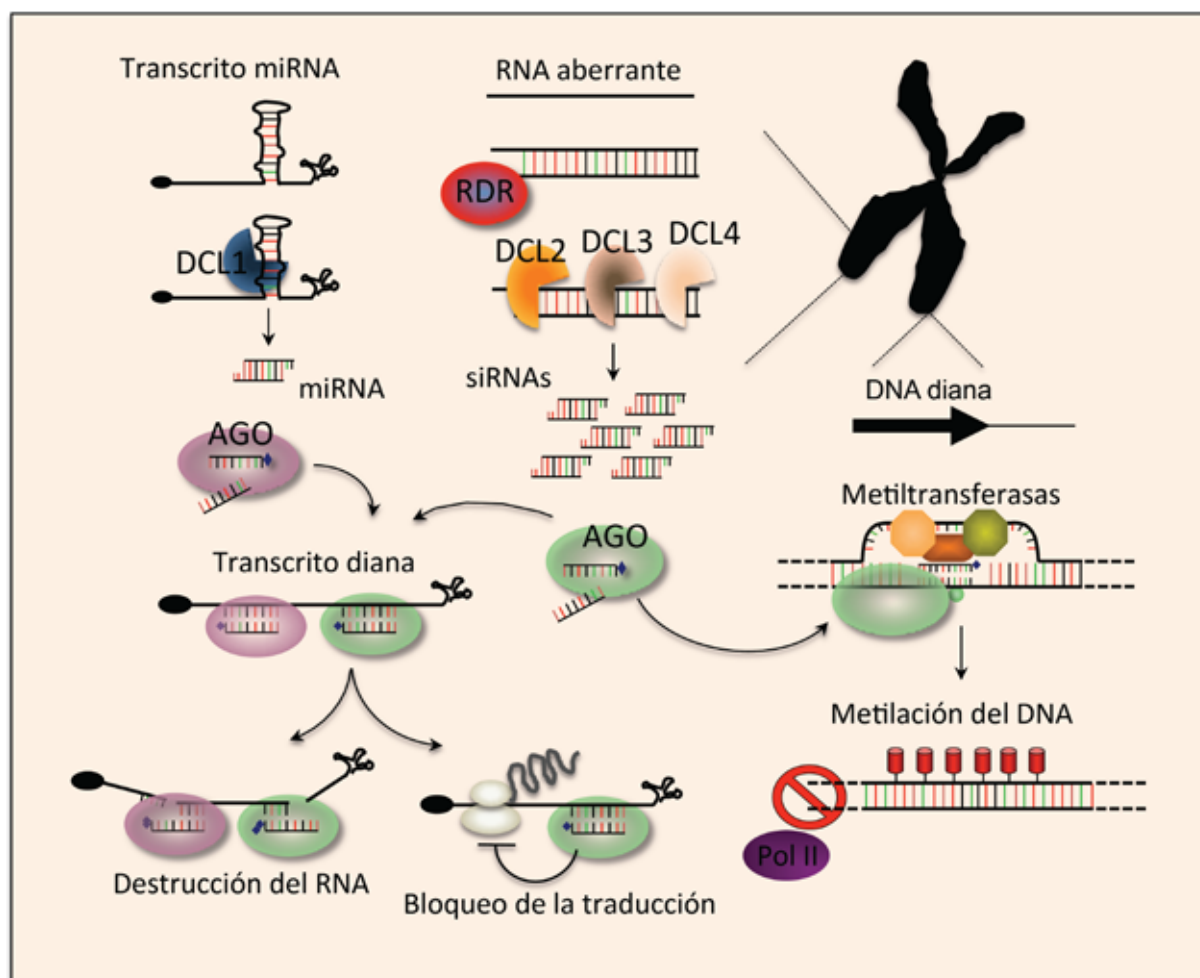


FIGURA 3. El silenciamiento genético comprende un conjunto de mecanismos ancestrales empleados por la célula eucariota para regular sus genes y mantener la integridad de su genoma. Todos estos mecanismos convergen en la síntesis de pequeñas hebras de RNA que confieren especificidad a la regulación. Estos pequeños RNAs se originan a partir de RNAs precursores con estructura secundaria estable y se clasifican en dos grandes grupos conocidos como microRNAs (miRNAs) y pequeños RNAs interferentes (siRNAs, del inglés small interfering RNAs). Si bien son indistinguibles en su estructura bioquímica y su modo de acción, miRNAs y siRNAs tienen orígenes distintos. La especie modelo *Arabidopsis* cuenta con cuatro genes que codifican enzimas DICER-LIKE (DCL), de las cuales DCL1 procesa RNA de cadena sencilla con regiones autocomplementarias muy estructuradas para generar miRNAs de 21-22 nucleótidos, mientras que DCL2, DCL3 y DCL4 usan sustratos de RNA bicatenario para generar distintas subclases de siRNAs de 21 a 24 nucleótidos. Estos RNAs bicatenarios son, en la mayoría de los casos el resultado de la actividad de enzimas RDR con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA, que convierten el RNA de cadena sencilla con alguna característica "aberrante" en RNA de cadena doble a través de síntesis de una copia del RNA molde. Proteínas de la familia génica ARGONAUTA (AGO) son los principales efectores de los complejos de silenciamiento a los que se unen la moléculas de miRNA o siRNA y son las que determinan la manera en la que las secuencias del DNA y el RNA genómico van a ser reguladas. La asociación de los complejos con secuencias complementarias de DNA promueve la metilación del DNA mientras que su unión con RNAs mensajeros induce su degradación o el bloqueo de su traducción.

La regulación transcripcional implica la adición de grupos metilo en residuos de citosina del DNA diana impidiendo así la

formación de los complejos de transcripción necesarios para la síntesis de RNAs mensajeros (Figura 4).

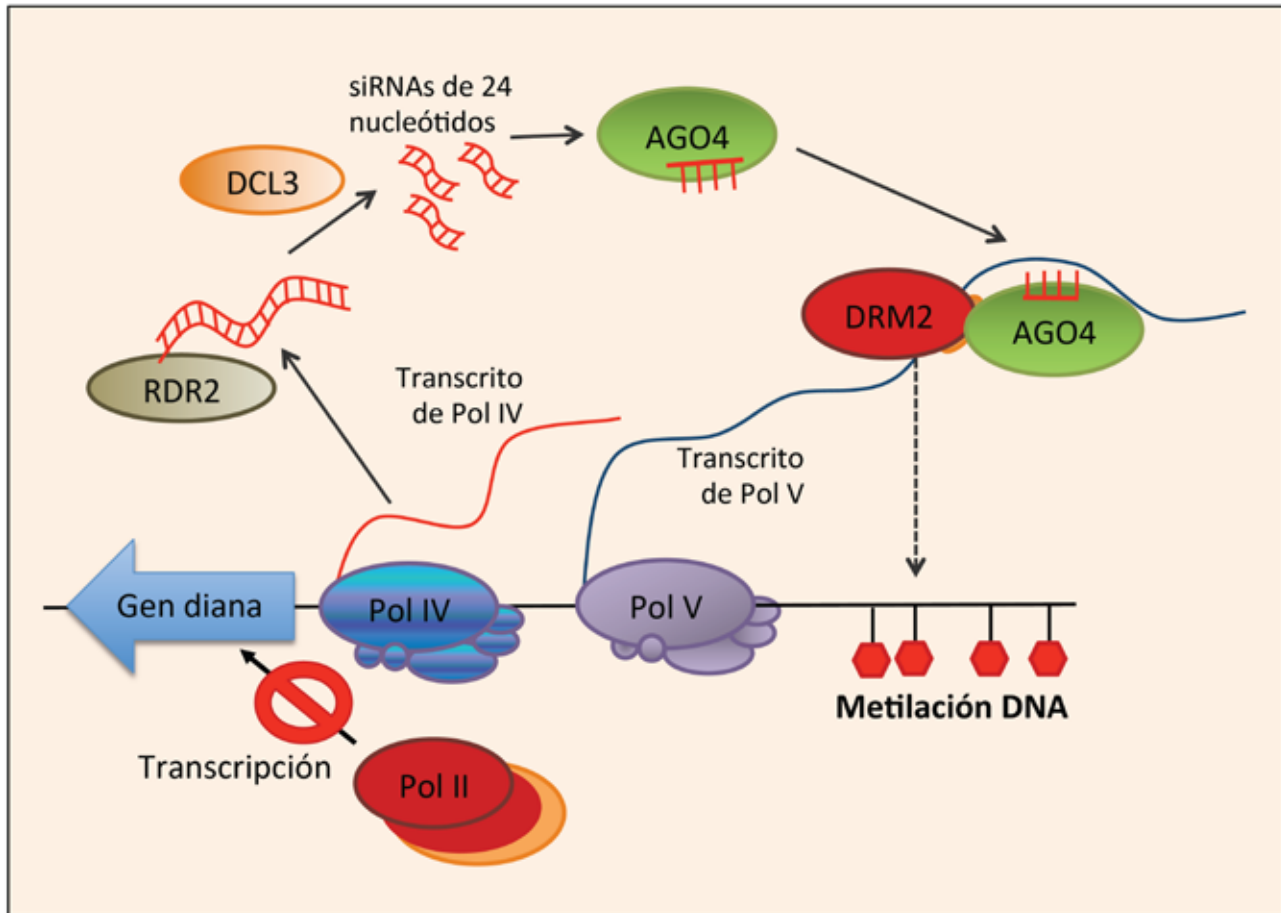


FIGURA 4. El mecanismo de metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM) causa modificaciones epigenéticas en el genoma de las plantas e implica la síntesis de siRNAs de 24 nucleótidos de tamaño como moléculas directoras de los complejos de silenciamiento y metilación. Este mecanismo se inicia con la formación de un transcrito de RNA por una RNA polimerasa IV (Pol IV) a partir, generalmente, de las regiones promotoras de los genes. Enzimas RDR reconocen estos transcritos y los convierten en RNA bicatenario promoviendo así la síntesis de siRNAs por acción de la enzima DCL3. Estos siRNAs se asocian con la enzima AGO4 formando así el complejo de silenciamiento. Esa misma región del DNA experimenta un segundo episodio de transcripción, esta vez mediado por una RNA polimerasa V (Pol V). El transcrito resultante es reconocido por el complejo de silenciamiento que recluta a la metiltransferasa DRM2 en la zona de complementariedad con el siRNAs del complejo. DRM2 metila *de novo* las citosinas en esta región del DNA haciéndolo inaccesible a la maquinaria de transcripción

En plantas, la metilación de las citosinas puede darse en tres posibles contextos de secuencia: CpG y/o CpHpG (contexto simétrico) y CpHpH (contexto asimétrico), donde H representa cualquier nucleótido excepto la guanina [20]. La transferencia de grupos metilo ocurre por mediación de al menos tres metiltransferasas conocidas como DRM2, MET1 y CMT3 [21]. Estas tres enzimas contribuyen a mantener el estado metilado del DNA durante su replicación,

mientras que solo DRM2 participa en la formación de nuevas marcas de metilación o metilación *de novo*. Existen diversas evidencias que atribuyen a la metilación del DNA funciones en la inmunidad de las plantas [22]. Por ejemplo, la infección por la bacteria patógena *Agrobacterium tumefaciens*, que inserta genes inductores de tumores en el DNA de la célula infectada, se asocia con una hipermetilación global en el genoma de la célula huésped [23].

Esta respuesta se ha interpretado como un mecanismo de defensa puesto que plantas portadoras de mutaciones en genes implicados en la metilación del DNA muestran mayor predisposición al desarrollo de tumores cuando son infectadas. En general, la infección con bacterias fitopatógenas o simplemente el tratamiento con compuestos bacterianos que desencadenan cascadas de señalización tipo PTI inducen de forma activa episodios de hipometilación e hipermetilación en posiciones genómicas concretas [24,25]. Se ha observado que estos cambios en el patrón de metilación, que también ocurren en infecciones con virus, provocan la reactivación de elementos transponibles, lo cual se traduce en un incremento en la diversidad fenotípica de la planta. Ello se debe a que como resultado de la transposición se activan los genes adyacentes en los que se insertaba el transposón mientras que se altera el patrón de expresión de los genes en los nuevos sitios de inserción [24,25]. La infección con ciertos viroides también viene acompañada de una reactivación transcripcional de genes ribosómicos que coincide con perturbaciones en el patrón de metilación de sus secuencias promotoras [26]. No está claro sin embargo en qué manera estos cambios en los patrones de metilación de la planta que ocurren durante la infección afectan al proceso infectivo, o si constituyen en sí mismos un mecanismo de patogénesis. Sea como fuere, una mayor diversidad fenotípica aumenta el potencial de las plantas para adaptarse a situaciones de estrés. La actividad de proteínas efectoras de la ruta de metilación RdDM también se asocia con un efecto antiviral frente a virus con genomas nucleares de DNA [27].

La regulación post-transcripcional dependiente de silenciamiento génico resulta de la unión de los complejos efectoras con los RNA mensajeros. Esta asociación viene prescrita por la

complementariedad de bases entre el pequeño RNA y el mensajero diana. La enzima ARGONAUTA (AGO) del complejo de silenciamiento posee actividad catalítica ribonucleasa lo que le permite generar cortes endonucleolíticos en el RNA mensajero dentro de zona de complementariedad promoviendo así su consiguiente degradación (Figura 3). Se ha observado además que la interacción del complejo efector con el RNA diana puede bloquear su traducción si bien se desconocen los detalles del mecanismo responsable [28]. MicroRNAs (miRNAs), pequeños RNAs de interferencia (siRNAs, del inglés *small interfering RNA*) así como algunos componentes genéticos de la maquinaria de silenciamiento post-transcripcional desempeñan funciones importantes en las respuestas de tipo PTI y ETI frente a patógenos. Los primeros estudios en este campo demostraban que la acumulación de flagelina, un péptido microbiano inductor de respuestas PTI, estimulaba específicamente la acumulación de un miRNA en plantas de *Arabidopsis* [29]. Este miRNA promovía de forma selectiva la represión de receptores de auxinas contribuyendo así a incrementar la resistencia de la planta a la bacteria. Otro ejemplo lo constituye la enzima efectora AGO1, que en *Arabidopsis* regula la formación de depósitos de calosa y la expresión de genes de defensa que favorecen la resistencia frente a patógenos bacterianos [30]□.

Como se ha mencionado anteriormente, la regulación de los genes de resistencia *R* y de sus productos génicos es crítica para mantener la homeostasis celular en ausencia de agentes invasores. Por ejemplo, en *Arabidopsis* el silenciamiento génico post-transcripcional resulta esencial para regular el locus de resistencia *RPP5* cuando sus niveles de transcripción superan un umbral a partir del cual la eficacia biológica de la planta se ve

comprometida [31]. Un escenario similar se ha descrito para la regulación de un conjunto de receptores inmunes del tipo NB-LRR [32,33]. En este caso, la interacción de los complejos de silenciamiento con los transcritos que codifican estas proteínas receptoras promueve la destrucción de dichas moléculas mensajeras evitando así la activación de respuestas PTI y ETI. Las polimerasas dependientes de RNA RDR reconocen los fragmentos de RNA parcialmente degradados y los convierten en RNA bicatenario. Este RNA de doble cadena proporciona el sustrato para la síntesis de nuevos siRNAs que una vez incorporados en los complejos de silenciamiento catalizan nuevos episodios de corte en zonas homólogas del RNA de los genes NB-LRR. Este bucle amplifica el efecto del silenciamiento y hace más efectiva la regulación de los genes diana. De hecho, plantas defectivas en la actividad RDR o que carecen del miRNA responsable de esta regulación muestran una respuesta PTI constitutiva y una mayor resistencia basal hacia patógenos bacterianos [32]. También se ha observado en cultivares de tomate (Motelle) resistentes a *Fusarium oxysporum* la represión de ciertos miRNAs que regulan negativamente proteínas con dominios NB implicadas en resistencia frente a hongos [34]. Estos miRNAs sin embargo se expresan a niveles normales en los cultivares susceptibles (Moneymaker) en los que reprimen activamente los genes *R*.

Inmunidad basal y virus

Tradicionalmente se ha considerado a la inmunidad innata como la principal vía de defensa frente a microorganismos patógenos, como hongos, bacterias y oomicetos. En las plantas, los virus, aparentemente, no producen compuestos equivalentes a los PAMPs microbianos de modo que la defensa antiviral recae principalmente en respuestas ETI [35]. Estas respuestas se activan cuando las proteínas NB-LRR de resistencia del huésped

reconocen específicamente proteínas de avirulencia (Avr) de origen viral para iniciar una respuesta HR que confina al virus en el foco inicial de la infección [36]. Como otros efectores microbianos, las proteínas Avr virales son reconocidas por factores de resistencia en los huéspedes resistentes pero no en los susceptibles, en los que sí podrían suprimir la respuesta inmune de la planta y facilitar la infección [37]. Los tres genes *R* más estudiados en plantas son el gen *N* que interacciona con la proteína replicasa y supresor de silenciamiento p126/p180 del virus del mosaico del tabaco (TMV, del inglés *Tobacco mosaic virus*), *Rx1* que reconoce la proteína de la cápsida del virus X de la patata (PVX, del inglés *Potato virus X*) y *HRT* que interactúa indirectamente con el virus del arrugado del nabo (TCV, del inglés *Turnip crinkle virus*) a través de una proteína denominada TIP (del inglés *TCV-interacting protein*) [37].

Recientemente se han ido acumulando evidencias experimentales que sugieren que la respuesta PTI podría también contribuir de forma activa a la defensa antiviral. Por ejemplo, las infecciones compatibles van acompañadas de un incremento en la expresión de genes relacionados con PTI y con vías de defensa señalizadas por el ácido salicílico [38]. BAK1, que es un activador central de la respuesta PTI, también contribuye a la defensa antiviral como apunta el hecho de que su inactivación genética se asocia con una mayor susceptibilidad a virus y patógenos microbianos [10]. Además, las infecciones virales en las plantas inducen respuestas tales como la activación de MAPKs, aumento en la producción de la fitohormona etileno o la inhibición del crecimiento de la raíz, todas ellas relacionadas con la inmunidad PTI dependiente de BAK1. Esto sugiere que algún producto asociado a la infección (bien de origen viral o inducido por el virus) pudiera interactuar con receptores de membrana PRR regulados por BAK1 e iniciar así una respuesta PTI.

El silenciamiento génico es posiblemente la primera línea de defensa antiviral en las plantas [39]. Así las plantas con mutaciones de pérdida de función en diversos componentes de la ruta son, en general, hipersusceptibles a las infecciones por virus. Conceptualmente el silenciamiento génico puede enmarcarse en el contexto de la inmunidad innata ya que el RNA viral puede activar una respuesta efectiva que restringe la proliferación del virus. En este modelo, los intermediarios virales de RNA bicatenario serían reconocidos como un PAMP por las enzimas DCL que actuarían como receptores PRR [40]. De esta manera se activaría una cascada de eventos que incluye la producción de pequeños RNAs primarios y secundarios (por mediación de enzimas RDR), su incorporación a los complejos efectores de silenciamiento y la consiguiente degradación de los RNAs virales complementarios [39]. Por otro lado, los virus emplean proteínas virales con actividad supresora para contrarrestar el efecto represor del silenciamiento de forma similar a cómo los efectores microbianos suprimen la inmunidad innata cuando son inyectados al interior de la célula [41]. Algunos de estos supresores virales actúan como proteínas Avr interaccionando con proteínas de resistencia NB-LRR del huésped para activar una respuesta ETI que en última instancia provoca la reacción HR.

Regulación de la respuesta inmune en las infecciones por virus

El silenciamiento génico parece también desempeñar un papel relevante en la regulación de la respuesta inmune en las plantas infectadas con virus. Por ejemplo, se ha documentado la existencia de dos miRNAs que interaccionan con los transcritos TIR1-NB-LRR del gen *N* de tabaco y reprimen su acumulación [42]. En estos casos es además frecuente la producción de siRNAs secundarios

a partir de los fragmentos parcialmente degradados de estos transcritos *R*, previa conversión en RNAs de doble hebra por enzimas RDR. Cuando estos miRNAs se sobre-expresan en las plantas de tomate, la resistencia a TMV mediada por el gen *N* se atenúa considerablemente lo que pone en énfasis la importancia que tiene la regulación por miRNAs en la resistencia a la enfermedad en esta especie [42]. En el tomate, y en condiciones normales, un miRNA dirige la degradación y posterior formación de siRNAs secundarios de docenas de transcritos de genes CC-NB-LRR [43]. Lo interesante es que la infección con virus y bacterias reprime esta cascada de silenciamiento mediada por el miRNA de modo que se promueve la expresión de los genes de resistencia. De estas observaciones se deduce que al mismo tiempo que el virus bloquea el silenciamiento génico a través de sus proteínas supresoras se activa la síntesis de un conjunto de receptores inmunes que contribuyen a la defensa antiviral. Esto contrasta con el hecho de que la infecciones virales se asocian con la producción masiva de siRNAs a partir numerosos genes del huésped, lo que sugiere que la presencia del virus pone en marcha un programa de regulación que afecta a buena parte del transcriptoma de la planta [44]. En resumen, durante la infecciones con virus y microbios, el silenciamiento génico adquiere un importante compromiso como modulador de la expresión génica, si bien no está claro en qué manera repercute en el desenlace de la infección.

A pesar de las posibles conexiones entre el silenciamiento génico y la inmunidad basal en la defensa antiviral, lo cierto es que la vía efectora de silenciamiento post-transcripcional (que resulta en la degradación de los genomas virales y/o en la inhibición de la traducción de sus genes) muestra evidentes diferencias con respecto a los efectores de defensa asociados

a las respuesta PTI y ETI. En nuestro laboratorio de “Expresión génica y estrés” en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC investigamos la manera en la que se activa *BIR1*, un regulador esencial en la inmunidad basal, en condiciones normales de crecimiento y en presencia de virus. Empleando *Arabidopsis* como especie modelo hemos demostrado que *BIR1* contribuye de forma notable a la susceptibilidad y/o resistencia de la planta a la infección. Esta observación sugiere que durante la infección viral tiene lugar la inducción de la respuesta PTI dependiente de *BIR1* por mecanismos aun desconocidos. La dependencia de *BIR1* es muy relevante puesto que este receptor actúa en las primeras etapas de la vía de señalización de la respuesta inmune. De acuerdo a su función represora de la inmunidad basal, las plantas deficientes en *BIR1* muestran resistencia extrema a la infección, tal vez debido a la inducción exacerbada de componentes de defensa que hemos observado en estas plantas. Nuestros datos indican que el gen *BIR1* se expresa de forma constitutiva y ubicua durante el desarrollo pero se acumula de forma significativa en la planta durante las infecciones virales. Mediante ensayos de expresión hemos observado que el grado de acumulación del RNA mensajero durante la infección es el resultado de una doble regulación del gen *BIR1* que opera a nivel transcripcional y post-transcripcional. En condiciones normales la expresión de *BIR1* parece modularse mediante mecanismos epigenéticos que sin embargo no se alteran durante la infección, lo que sugiere la existencia de una vía alternativa de activación transcripcional. Para contrarrestarla, nuestros experimentos indican que la acumulación de los transcritos de *BIR1* está sujeta a una regulación negativa que implica la síntesis de siRNAs y la participación activa de los diversos componentes genéticos de silenciamiento. De esta manera la planta sortea la posible caída de la respuesta inmune asociada a la sobre-acumulación de *BIR1*. Esta

regulación resulta esencial para mantener un umbral de respuesta inmune que evite la sobre-proliferación viral y contribuya a establecer una relación de compatibilidad no patogénica entre la planta y el virus. Estos resultados nos ayudan a entender la manera en que la inmunidad innata participa en la defensa antiviral y proporciona una herramienta prometedora para el desarrollo de resistencias frente a agentes patógenos de plantas.

Posibles mecanismos de activación de la inmunidad basal durante la infección viral.

Aunque las evidencias apuntan a que las respuestas PTI se activan eficazmente durante la infección, el gran interrogante sigue siendo determinar el origen del compuesto o compuestos que ponen en marcha la cascada de señalización y de los receptores celulares implicados. Dado que los virus son parásitos intracelulares, es posible que el desencadenante de esta respuesta sea alguna señal conservada derivada de la planta, de forma similar a cómo los receptores PRR perciben los DAMP originados por la célula huésped. No está claro cómo las plantas perciben el daño asociado al virus, pero una posibilidad atractiva es que se relacione con la biosíntesis de metabolitos protectores. Las infecciones virales en las plantas conllevan una considerable reprogramación en el contenido de metabolitos primarios y secundarios [45]. Entre ellos, los azúcares funcionan como moléculas señalizadoras que estimulan la inmunidad PTI y ETI en infecciones por patógenos [46]. Se piensa que la proporción de sacarosa y hexosas en la célula podría representar la señal que dispara la síntesis de genes de defensa, incluyendo genes que sintetizan metabolitos con propiedades antimicrobianas. Las poliaminas también podrían actuar como señalizadores en la transducción de respuestas de defensa promoviendo la expresión de genes asociados al estrés [47].

Por ejemplo, las plantas de *Arabidopsis* que son defectivas en los genes de biosíntesis de la poliamina putrescina presentan una mayor susceptibilidad (menor resistencia) a la infección viral [48]. El metabolismo de los lípidos y ácidos grasos experimenta también importantes cambios durante una infección. Estos compuestos proporcionan energía y son los componentes estructurales de las membranas intracelulares en las que tiene lugar la replicación de los virus con genoma de RNA [49]. De hecho, durante la infección, los virus interfieren con la biosíntesis y metabolismo de lípidos y ácidos grasos con el fin de provocar los cambios en la fluidez y plasticidad de la membrana necesarios para la correcta formación de los complejos de replicación [45]. Algunas infecciones por virus se asocian con la acumulación de ácidos grasos poli-insaturados [48]. Lo interesante es que las plantas que contienen niveles reducidos de ácidos grasos insaturados son más resistentes a la infección, indicando que estos compuestos participan en cascadas de señalización de defensa [48].

La pregunta, aún sin respuesta, es cómo estas alteraciones en el metabolismo primario pueden iniciar una cascada de señalización inmune. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) es una consecuencia de la inmunidad PTI y ETI, pero también es una respuesta común asociada al estrés ambiental y a las infecciones virales [50]. Es posible que la biosíntesis de metabolitos protectores durante la infección obedezca a la necesidad de aliviar el estrés impuesto por la generación de ROS. Esto implicaría que la acumulación de azúcares, ácidos grasos insaturados o poliaminas con propiedades detoxificadoras sería posiblemente una consecuencia, y no la causa, de la activación de la respuesta inmune. De acuerdo a esta visión, la

infección confiere a la planta un estado de aclimatación metabólica que le permite sortear el estrés celular asociado a la infección, y por extensión, a otros estreses ambientales. Quedaría por determinar qué función, si la tuvieran, desempeñan estos compuestos como iniciadores de la respuesta inmune.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto BIO2015-70752 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, España). Irene Guzmán-Benito está financiada con una beca predoctoral BES-2013-063138 del MINECO.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dangl JL, Jones JD: Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 2001, 411:826-833.
2. Zipfel C: Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 2009, 12:414-420.
3. Boller T, Felix G: A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 2009, 60:379-406.
4. Tena G, Boudsocq M, Sheen J: Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* 2011, 14:519-529.
5. Jones JD, Dangl JL: The plant immune system. *Nature* 2006, 444:323-329.
6. Asai S, Shirasu K: Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. *Curr Opin Plant Biol* 2015, 28:1-8.
7. Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW: Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol and Mol Plant Pathol* 2012, 78:51-65.
8. Coll NS, Epple P, Dangl JL: Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* 2011, 18:1247-1256.
9. Park CJ, Caddell DF, Ronald PC: Protein phosphorylation in plant immunity: in-

- sights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling. *Front Plant Sci* 2012, 3:177.
10. Korner CJ, Klauser D, Niehl A, Dominguez-Ferreras A, Chinchilla D, Boller T, Heinlein M, Hann DR: The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact* 2013, 26:1271-1280.
11. Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T: A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 2007, 448:497-500.
12. Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B: One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* 2009, 14:535-541.
13. Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Qamar SA, Mengiste T, Betsuyaku S, Parker JE, Mussig C, et al.: The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr Biol* 2007, 17:1116-1122.
14. Gao M, Wang X, Wang D, Xu F, Ding X, Zhang Z, Bi D, Cheng YT, Chen S, Li X, et al.: Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* 2009, 6:34-44.
15. Halter T, Imkamp J, Blaum BS, Stehle T, Kemmerling B: BIR2 affects complex formation of BAK1 with ligand binding receptors in plant defense. *Plant Signal Behav* 2014, 9.
16. Zvereva AS, Pooggin MM: Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* 2012, 4:2578-2597.
17. Ruiz-Ferrer V, Voinnet O: Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 2009, 60:485-510.
18. Brodersen P, Voinnet O: The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 2006, 22:268-280.
19. Matzke MA, Kanno T, Matzke AJ: RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu Rev Plant Biol* 2015, 66:243-267.
20. Matzke M, Kanno T, Huettel B, Daxinger L, Matzke AJ: Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* 2007, 10:512-519.
21. Cao X, Jacobsen SE: Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 2002, 12:1138-1144.
22. Matzke MA, Mosher RA: RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet* 2014, 15:394-408.
23. Gohlke J, Scholz CJ, Kneitz S, Weber D, Fuchs J, Hedrich R, Deeken R: DNA methylation mediated control of gene expression is critical for development of crown gall tumors. *PLoS Genet* 2013, 9:e1003267.
24. Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR: Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:E2183-2191.
25. Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham AL, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, et al.: Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:2389-2394.
26. Martinez G, Castellano M, Tortosa M, Pallas V, Gomez G: A pathogenic non-coding RNA induces changes in dynamic DNA methylation of ribosomal RNA genes in host plants. *Nucleic Acids Res* 2014, 42:1553-1562.
27. Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM: Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *J Virol* 2008, 82:8997-9007.
28. Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O: Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 2008, 320:1185-1190.
29. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dhar-masiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD: A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 2006, 312:436-439.
30. Li Y, Zhang Q, Zhang J, Wu L, Qi Y, Zhou JM: Identification of microRNAs involved in

- pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiol* 2010, 152:2222-2231.
31. Yi H, Richards EJ: A cluster of disease resistance genes in Arabidopsis is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell* 2007, 19:2929-2939.
 32. Boccara M, Sarazin A, Thiebaud O, Jay F, Voinnet O, Navarro L, Colot V: The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathog* 2014, 10:e1003883.
 33. Zhai J, Jeong DH, De Paoli E, Park S, Rosen BD, Li Y, Gonzalez AJ, Yan Z, Kitto SL, Grusak MA, et al.: MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev* 2011, 25:2540-2553.
 34. Ouyang S, Park G, Atamian HS, Han CS, Stajich JE, Kaloshian I, Borkovich KA: MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog* 2014, 10:e1004464.
 35. Mandadi KK, Scholthof KB: Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell* 2013, 25:1489-1505.
 36. Caplan JL, Mamillapalli P, Burch-Smith TM, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP: Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* 2008, 132:449-462.
 37. de Ronde D, Butterbach P, Kormelink R: Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* 2014, 5:307.
 38. Whitham SA, Wang Y: Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* 2004, 7:365-371.
 39. Llave C: Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci* 2010, 15:701-707.
 40. Ding SW: RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 2010, 10:632-644.
 41. Nakahara KS, Masuta C: Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 2014, 20:88-95.
 42. Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B: MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:1790-1795.
 43. Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, Bond DM, Santos BA, Baulcombe DC: A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 2012, 24:859-874.
 44. Cao M, Du P, Wang X, Yu YQ, Qiu YH, Li W, Gal-On A, Zhou C, Li Y, Ding SW: Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:14613-14618.
 45. Llave C: Dynamic cross-talk between host primary metabolism and viruses during infections in plants. *Curr Opin Virol* 2016, 19:50-55.
 46. Bolouri Moghaddam MR, Van den Ende W: Sugars and plant innate immunity. *J Exp Bot* 2012, 63:3989-3998.
 47. Walters DR: Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 2003, 64:97-107.
 48. Fernandez-Calvino L, Osorio S, Hernandez ML, Hamada IB, Del Toro FJ, Donaire L, Yu A, Bustos R, Fernie AR, Martinez-Rivas JM, et al.: Virus-Induced Alterations in Primary Metabolism Modulate Susceptibility to Tobacco rattle virus in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2014, 166:1821-1838.
 49. Heaton NS, Randall G: Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol* 2011, 19:368-375.
 50. Stael S, Kmiecik P, Willems P, Van Der Kelen K, Coll NS, Teige M, Van Breusegem F: Plant innate immunity--sunny side up? *Trends Plant Sci* 2015, 20:3-11.

INFLUENCIA DE FACTORES DE SITIO EN LA DISTRIBUCIÓN DE ENDÓFITOS POTENCIALMENTE BENEFICIOSOS VS PERJUDICIALES EN RAMILLOS DE PINO ALBAR (*Pinus sylvestris*) DEL NORTE DE ESPAÑA

Sanz-Ros, A.V.^{1,2}, Müller, M.M.³, San Martín, R.², y Diez, J.J.²

1 TRAGSA. Teófilo Ortega, 7-9. 34004 Palencia. España. Asistencia técnica en Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos (Junta de Castilla y León). Polígono Industrial de Villamuriel, s/n. 34190 Palencia, España.

2 iuFor: Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid-INIA, Avenida Madrid, 44, Campus La Yutera, Edificio E, 34071, Palencia, Castilla y León, España.

3 Instituto Finandés de Recursos Naturales (LUKE), Latokartanonkaari, 9, FI-00790, Helsinki, Finlandia.

Trabajo galardonado con el Premio SEF a la mejor COMUNICACIÓN en PANEL en el XVIII Congreso SEF celebrado en Palencia en septiembre de 2016

INTRODUCCIÓN

Todas las plantas albergan microorganismos en sus tejidos internos que habitan de modo asintomático, al menos durante parte de su vida, y reciben el nombre de endófitos (Carroll, 1988), correspondiéndose principalmente con hongos y bacterias. En algunas ocasiones se ha podido determinar el papel ecológico de estos endófitos (Tintjer and Rudgers, 2006; Sherameti et al., 2008), sin embargo el papel que juegan la gran mayoría de endófitos de sistemas forestales permanece aún infraestudiado y en muchos casos desconocido (Rodríguez et al., 2009). A pesar de ello, estos organismos representan una fuente potencial de aplicaciones en diferentes campos de la ciencia (Hamayun et al., 2009; Christina et al., 2013; Romeralo et al., 2015; Martínez-Álvarez et al., 2016).

Los factores de sitio, incluyendo

clima, suelo y características del rodal (como resultado de la gestión forestal realizada) influyen claramente sobre el crecimiento vegetal, y en este estudio se pretende testar la hipótesis de que también influyen sobre los organismos endófitos que habitan sus tejidos internos. Algunos estudios sugieren que algunos de estos factores pueden determinar la susceptibilidad del árbol a la colonización por organismos endófitos (Carroll and Carroll, 1978; Müller and Hallaksela, 1998).

En este estudio se pretende I) evaluar la influencia de diversos factores de sitio en la distribución de hongos endófitos de ramillos de pino silvestre, y II) identificar significación ecológica en las especies de endófitos, y III) Identificar los factores que determinan la abundancia de hongos potencialmente beneficiosos o perjudiciales, así como las interacciones entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre junio y septiembre de 2005, 15 parcelas circulares de pino albar fueron seleccionadas en del Inventario Forestal Nacional intentando obtener el mayor rango climático y edáfico posible en una zona

piloto de unas 186.000 ha. En ellas fueron cuantificados numerosos parámetros de sitio, y también fueron recolectadas muestras biológicas de ramillos de un total de 30 árboles para el aislamiento de organismos endófitos (Figura 1).



FIGURA 1. Localización del área de estudio en la Provincia de Palencia, mostrada en negro. La comunidad de Castilla y León se muestra en color gris (izquierda). Fotos de izquierda a derecha, 1) toma de canutillos con barrena Pressler para evaluar el crecimiento del árbol. 2) Calicata de suelo. 3) toma de muestras de ramillo con pértiga. 4) muestra de ramillo analizada.

En total fueron medidos 51 parámetros de sitio, incluyendo suelo (13), clima (25) y rodal (13), mostrados en la Tabla 1. El estado sanitario fue evaluado en cada parcela mediante la estimación de la defoliación siguiendo la metodología de la Red Europea de Seguimiento de Daños a los Bosques (UN-ECE ICP Forests, 1998). Los datos climáticos fueron obtenidos del Atlas Climático Digital de la Península Ibérica (Ninyerola et al., 2005).

Las muestras biológicas fueron esterilizadas en superficie y cultivadas en medio nutritivo generalista para hongos (agar patata dextrosa). Los hongos obtenidos fueron contados y clasificados en diferentes morfotipos según la morfología de la colonia. De cada morfotipo fueron seleccionados varios asilados que fueron sometidos a extracción de ácidos nucleicos, amplificación por PCR del ADN ribosómico (ADNr), secuenciados y comparados, mediante el uso de la herramienta BLAST, con las secuencias depositadas en GenBank. La identidad de los taxones fue comprobada posteriormente mediante microscopía, en los casos en que fue posible (Sanz-Ros et al., 2015).

Diversos análisis estadísticos fueron realizados. Primero un Análisis de Componentes Principales, para reducir la dimensionalidad de los datos e identificar qué parámetros son los que determinan la variación de los datos. Después fue llevado a cabo un análisis de correspondencias simples (ACS), que agrupó las parcelas según los hongos que presentaban. Con los ejes factoriales de este ACS se ejecutó un análisis clúster, que agrupó las parcelas en grupos de parcelas según los hongos que albergaban. El análisis clúster se realizó usando el método de Ward y el cuadrado de las distancias euclídeas. Finalmente el método de las k-medias fue usado para la consolidación de los grupos.

Estos grupos de parcelas fueron caracterizados a su vez por las variables ambientales que los definen, lo cual nos permite establecer relaciones entre los hongos que habitan estos sitios y los parámetros ambientales que los definen. Para ello, se comparó la media de cada variable en un grupo de parcelas con la media de dicha variable en el resto de grupos. El análisis estadístico fue realizado con los programas Statistica 7 y SPAD 5.6.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Tabla 1: Parámetros climáticos (C), dasométricos (D), edáficos (E) y de estado sanitario (S) obtenidos en este estudio para cada parcela.

Descripción y unidades	Cat.	Descripción y unidades	Cat.
Edad media (años)	D	Radiación solar (10 kJ*m ⁻² *día ⁻¹ *µm ⁻¹)	C
Densidad (pies*ha ⁻¹)	D	Precipitación media anual (mm)	C
Diámetro medio (cm)	D	Temperatura media (15 años)	C
Numero de tocones	D	Máxima de las Temperaturas medias (15 años)	C
Altura media (m)	D	Mínima de las Temperaturas medias (15 años)	C
Altura dominante (m)	D	Precipitación diciembre	C
Área basimétrica (m ² *ha ⁻¹)	D	Temperatura media diciembre	C
Tasa crecimiento diametral relativo (5 años) (mm*año ⁻¹)	D	Temperatura máxima diciembre	C
Tasa crecimiento diametral relativo (10 años) (mm*año ⁻¹)	D	Temperatura mínima diciembre	C
Tasa crecimiento diametral relativo (15 años) (mm*año ⁻¹)	D	Precipitación media enero	C
Índice de Reineke	D	Temperatura media enero	C
Defoliación media (%)	S	Temperatura máxima enero	C
Elementos gruesos (%)	E	Temperatura mínima enero	C
Arenas (%)	E	Precipitación media febrero	C
Limo (%)	E	Temperatura media febrero	C
Arcilla (%)	E	Temperatura máxima febrero	C
pH	E	Temperatura mínima febrero	C
Fósforo (ppm)	E	Precipitación media junio	C
Potasio (ppm)	E	Temperatura media junio	C
Calcio (meq/100 g)	E	Temperatura máxima junio	C
Magnesio (meq/100 g)	E	Precipitación media julio	C
Sodio (meq/100 g)	E	Temperatura media julio	C
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g)	E	Temperatura máxima julio	C
Nitrógeno (%)	E	Precipitación media agosto	C
Carbono Total (%)	E	Temperatura media agosto	C
		Temperatura máxima agosto	C

RESULTADOS

Fueron determinados 34 taxones fúngicos en ramillos de pino albar (Figura 2), descritos por los autores en un estudio previo (Sanz-Ros et al., 2015). Los resultados indican que la comunidad de hongos endófitos está claramente asociada a condiciones ambientales y factores de sitio particulares. Estos factores no realizan su acción de forma independiente, sino que combinaciones de dichos factores producen nichos determinados para especies o grupos de especies fúngicas

endófitas.

Han sido identificadas varias asociaciones que sugieren un papel ecológico para algunas de las especies fúngicas encontradas. Endófitos como *Phoma herbarum* y *Fimetiariella rabenhorstii* fueron encontrados asociados a arboles de gran porte con altas tasas de crecimiento. Estos pies se encuentran situados en suelos algo arenosos con altos niveles de macronutrientes (N, P y K), sometidos a altas temperaturas y precipitaciones.



FIGURA 2. Cultivo en PDA de aislados fúngicos obtenidos de ramillos de pino albar. Algunas de estas colonias con diferente morfología finalmente correspondieron a un mismo taxón fúngico.

Por otro lado, la abundancia de *Phoma herbarum* y *Hormonema dematioides* está inversamente relacionada con la de *Biscogniauxia mediterranea*, siendo este último excluido en la mayoría de parcelas en las que aparecen los primeros; solamente coocurren cuando la abundancia de *P. herbarum* y *H. dematioides* es muy baja. Sorprendentemente, *B. mediterranea* aparece como endófito en más del 50% de las parcelas de *P. sylvestris*, pareciendo asociarse a pies con bajas tasas de crecimiento ($P=0,06$). Otros hongos aparecen claramente asociados ($P<0,05$) a bajas tasas de crecimiento, como *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Hypocrea lixii* y *Ophiostoma nigrocarpum*.

DISCUSIÓN

Algunas especies de hongos endófitos se encuentran ligadas a combinaciones de factores de sitio y al crecimiento de los árboles que habitan. Este es el caso de *Fimetariella rabenhorstii* y *Phoma herbarum*, ambos asociados a pies con altas tasas de crecimiento relativo. Esta última especie y otras del género *Phoma* son capaces de sintetizar giberelinas y de estimular el crecimiento vegetal (Rim et al., 2007; Hamayun et al., 2009; 2010). Sin embargo no podemos determinar si estas especies están influyendo sobre el crecimiento o éste está solamente determinado por las condiciones ambientales. Por ello, sería

deseable realizar ensayos de inoculación con el fin de determinar cuál es el efecto sobre pinos u otros hospedantes, y evaluar su potencial aplicación como bioestimulante del crecimiento en coníferas.

Además, la abundancia relativa de *Fimetariella rabenhorstii*, *Hormonema dematioides* y *Phoma herbarum* está inversamente relacionada con la de *Biscogniauxia mediterranea*, sugiriendo que estos hongos podrían estar excluyendo a este último. *B. mediterranea* es patógeno de encinas y alcornoques, a los que les causa el denominado “chancro carbonoso”, produciendo una importante reducción del crecimiento. Sin embargo aparece asociado a pinos, y es muy abundante en pies con bajas tasas de crecimiento. Su exclusión podría representar un papel protector por parte de *H. dematioides* y *P. herbarum* ante organismos que son potencialmente perjudiciales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos en los que también se ha sugerido a *H. dematioides* como protector de yemas de pino silvestre (Pirttilä et al., 2003).

Por otro lado, el hecho de que hongos como *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Biscogniauxia mediterranea* u *Ophiostoma nigrocarpum* se encuentren asociados a pies con bajas tasas de crecimiento, podría señalar a éstos como potencialmente perjudiciales. Las dos especies de *Alternaria*

fueron encontradas con una abundancia relativa muy alta en parcelas muy defoliadas y con una densidad excesiva de pies. *A. alternata* ha sido comúnmente considerado como un saprófito común de acículas de pino (Guo et al., 2004), así como de otras especies, aunque también ha sido descrito como patógeno de un amplio rango de plantas, hortícolas y frutales (Droby et al., 1984; Peever et al., 2002). Algo similar ocurre con *Ophiostoma nigrocarpum*, hongo del azulado de la madera, asociado a varias especies de escolítidos que atacan a pinos, normalmente sin causar daño alguno a su hospedante (Hobson et al., 1994; Pérez et al., 2011), aunque algunos ensayos de inoculación han mostrado su patogenicidad en *Pinus* (Pérez, 2009). Una explicación plausible es que estos hongos resulten inocuos mientras las condiciones del sitio y el vigor del hospedador son adecuados, sin embargo, en sitios o ambientes desfavorables proliferan, actuando como patógenos oportunistas o de debilidad.

En definitiva, las parcelas en las que las combinaciones de condiciones climáticas, edafológicas y del rodal son más favorables para el crecimiento vegetal, como en este caso es la combinación de altas temperaturas y precipitaciones, un elevado contenido de nutrientes edáficos y una gestión forestal adecuada, muestran una mayor abundancia de hongos con un efecto positivo sobre el hospedante, como *Fimetiariella rabenhorstii*, *Hormonema dematioides* o *Phoma herbarum*. Por el contrario, parcelas situadas en sitios estresantes (debido a clima o suelo), o con unas malas características de rodal (p. ej. densidad excesiva de pies) muestran una mayor abundancia de hongos potencialmente perjudiciales.

CONCLUSIONES

- La comunidad de hongos endófitos está claramente influenciada el ambiente, de modo que diferentes grupos de hongos se asocian a combinaciones particulares de factores de sitio.
- Algunas especies aparecen asociadas a

parcelas con tasas elevadas de crecimiento relativo, como es el caso de *Fimetiariella rabenhorstii* y *Phoma herbarum*.

- Algunas de las especies de endófitos como *Fimetiariella rabenhorstii*, *Hormonema dematioides* y *Phoma herbarum* aparecen de forma excluyentemente respecto a especies potencialmente “perjudiciales”.
- Las condiciones de sitio favorables para el crecimiento también favorecen una mayor abundancia de especies “beneficiosas”, mientras los sitios estresantes favorecen el desarrollo de especies “perjudiciales”.

BIBLIOGRAFÍA

- Carroll, G., 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69, 2–9.
- Carroll, G.C., Carroll, F.E., 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* 56, 3034–3043.
- Christina, A., Christopher, V., Bhore, S.J., 2013. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn. Rev.* 7, 11–16.
- Droby, S., Dinoor, A., Prusky, D., Barkai-Golan, R., 1984. Pathogenicity of *Alternaria alternata* on potato in Israel. *Phytopathology* 74, 537–542.
- Guo, L.-D., Xu, L., Zheng, W.-H., Hyde, K.D., 2004. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Fungal Divers.* 16, 53–65.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Tang, D.-S., Hussain, J., Ahmad, B., Anwar, Y., Lee, I.-J., 2010. Growth promotion of cucumber by pure cultures of gibberellin-producing *Phoma* sp. GAH7. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 889–894.
- Hamayun, M., Khan, S., Khan, A., Rehman, G., Sohn, E.-Y., Shah, A., Kim, S.-K., Joo, G.-J., Lee, I.-J., 2009. *Phoma herbarum* as a New Gibberellin-Producing and Plant Growth-Promoting Fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1–6.

- Hobson, K.R., Parmeter, J.R., Wood, D.L., 1994. The role of fungi vectored by *Dendroctonus brevicornis* leconte (Coleoptera: Scolytidae) in occlusion of Ponderosa pine xylem. *Can. Entomol.* 126, 277–282.
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R.A., Sanz-Ros, A.V., Pando, V., Diez, J.J., 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biol. Control* 94, 1–10.
- Müller, M.M., Hallaksela, A.-M., 1998. Diversity of Norway spruce needle endophytes in various mixed and pure Norway spruce stands. *Mycol. Res.* 102, 1183–1189.
- Ninyerola, M., Pons, X., Roure, J., 2005. Atlas Climático Digital de la Península Ibérica. Metodología y aplicaciones en bioclimatología y geobotánica. Bellaterra.
- Peever, T.L., Ibañez, A., Akimitsu, K., Timmer, L.W., 2002. Worldwide phylogeography of the Citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 92, 794–802.
- Pérez, O.A., 2009. Caracterización morfológica, molecular e histopatología de hongos Ophiostomatoides asociados al pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl). Institucion de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. México.
- Pérez, O.A., Alvarado, D., Cibrián, D., Equihua, A., Cárdenas, E., 2011. Hongos ophiostomatoides de galerías de *Dendroctonus adjunctus* Blandford en *Pinus hartwegii* Lindl. *Rev. Mex. Ciencias For.* 2, 35–46.
- Pirttilä, A.M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, R., Hohtola, A., 2003. Two endophytic fungi in different tissues of Scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microb. Ecol.* 45, 53–62.
- Rim, S., Lee, J., Khan, S., Lee, I., Rhee, I., Lee, K., Kim, J., 2007. Isolation and identification of fungal strains producing gibberellins from the root of plants. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 357–363.
- Rodriguez, R., White Jr, J., Arnold, A., Redman, R., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314–30.
- Romeralo, C., Witzell, J., Romeralo-Tapia, R., Botella, L., Diez, J.J., 2015. Antagonistic activity of fungal endophyte filtrates against *Gremmeniella abietina* infections on Aleppo pine seedlings. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 691–704.
- 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 Biol.* 119, 870–883.
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., Oelmüller, R., 2008. The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 799–807.
- Tintjer, T., Rudgers, J.A., 2006. Grass-herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. *New Phytol.* 170, 513–521.
- UN-ECE ICP Forests, 1998. International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Federal Research. Hamburg.

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

