

- **Actualidad**
- **Cursos y Másteres**
- **Actividades de los Socios**
- **Publicaciones SEF**
- **Nuevos Patógenos**
- **Reuniones y Congresos**
- **Artículos**

EDITORIAL3 **NOVEDADES****ACTUALIDAD**4 **MARCHA POR LA CIENCIA**5 **ENTREVISTA: MARÍA JOSÉ BASALLOTE UREBA****CURSOS DE ESPECIALIZACIÓN Y MÁSTER**10 **MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL**10 **PLANTHEALTH – EUROPEAN MASTER DEGREE IN PLANT HEALTH IN SUSTAINABLE CROPPING SYSTEMS ROYECTO PATHOGEN**10 **MASTER EN SANIDAD VEGETAL - 4ª EDICIÓN**10 **ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA Y FITOPATOLOGÍA DE ZONAS ÁRIDAS****ACTIVIDADES DE LOS SOCIOS****TESIS DOCTORALES**11 **JERSON GARITA-CAMBRONERO.** Genómica comparativa de cepas de *Xanthomonas arboricola* asociadas a *Prunus* spp. INIA, IVIA, ETSIA-UPM16 **CRISTINA PRIETO RECIO.** Factores bióticos, abióticos y de gestión involucrados en el Decaimiento de *Pinus pinaster* en la Península Ibérica. ETSIA, Universidad de Valladolid19 **ÁNGELA VARO SUÁREZ.** Evaluación de microorganismos, enmiendas orgánicas y productos naturales para el control biológico de la Verticilosis del olivo. ETSIAM, Universidad de Córdoba22 **ARIADNA GINÉ BLASCO.** Populations dynamics of *Meloidogyne* spp. on tomato and cucumber and biologically-based management strategies. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona**LIBROS Y PUBLICACIONES**25 **PUBLICACIONES SEF****NUEVAS DESCRIPCIONES DE PATÓGENOS EN ESPAÑA**28 **HONGOS Y OOMICETOS**29 **BACTERIAS**29 **VIRUS Y VIROIDES****REUNIONES Y CONGRESOS**30 **3RD HEMIPTERAN-PLANT INTERACTIONS SYMPOSIUM**30 **15TH CONGRESS OF THE MEDITERRANEAN PHYTOPATHOLOGICAL UNION**30 **X CONGRESO NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA APLICADA - SEEA**30 **12TH EUROPEAN FOUNDATION FOR PLANT PATHOLOGY CONFERENCE****EL ARTÍCULO DEL BOLETÍN**31 **IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE EFECTORES DE OÍDIOS** por Jesús Martínez-Cruz y colaboradores44 **EL RÉGIMEN DE LUZ REGULA LA PATOGÉNESIS EN PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO DC3000** por Saray Santamaría-Hernando y colaboradores

Foto de portada: Sintomatología típica de los oídios. Hoja de calabacín completamente infectada por colonias de oídio de cucurbitáceas *Podosphaera xanthii*. La imagen fue tomada de Pérez-García et al. (2009).

Novedades BOLETÍN y WEB SEF

Queridos Soci@s:

Os presentamos el último Boletín SEF en su actual versión, ha sido un largo camino desde que en diciembre de 1992 se iniciase la edición de un Boletín de noticias y eventos relacionados con la SEF y sus socios, que a partir de ahora pasará a tomar nuevo formato y contenidos.

En la sección de actualidad incluimos una sección de actualidad en la que destaca una entrevista a nuestra compañera Pepa Basallote recientemente jubilada. En la sección del artículo del Boletín podréis encontrar dos artículos de gran interés y que corresponden a los Accésit SEF a comunicaciones orales en el XVIII Congreso SEF de Palencia.

Además, se incluyen como viene siendo habitual los nuevos patógenos descritos en España entre enero y abril de 2017, así como la sección de reseñas de Tesis Doctorales, 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. Nuestro reconocimiento a tod@s los Boletiner@s en estos 25 años. Por nuestra parte ha sido un placer haber podido contribuir en la elaboración y edición del Boletín SEF en los dos últimos años ...

L@s Editor@s

MARCHA POR LA CIENCIA

EXITO DE LA CONVOCATORIA DE LA MARCHA POR LA CIENCIA

La iniciativa, surgida de asociaciones de científicas norteamericanas, se extendió a los cinco continentes y en más de 600 ciudades de todo el mundo tuvieron lugar marchas y otros tipos de actividades.

En España, varios millares de personas participaron en los actos celebrados en Madrid, Barcelona, Gerona, Sevilla, Granada y Valladolid, respondiendo a la convocatoria lanzada desde las entidades científicas, académicas, sindicales, investigadores precarios y movimientos sociales.

La manifestación más numerosa tuvo lugar en Madrid, donde 3.000 personas recorrieron la calle de Alcalá entre las sedes del Ministerio de Educación y el de Hacienda y Administraciones Públicas. La pancarta que encabezaba la manifestación, bajo el lema: **"Sin investigación no hay futuro"** fue portada por representantes de la Confederación de Sociedades Científicas de España, como Nazario Martín, presidente de COSCE y Adolfo Azcárraga, del mundo académico, Federico Mayor Zaragoza y Emilio Muñoz, portavoces de CC.OO y de las asociaciones de jóvenes investigadores.

En la cabecera de la manifestación estuvieron también presentes representantes de la Real Academia (José Elguero, Manuel Aguilar, Jesús Ávila), así como vicerrectores de las distintas universidades madrileñas e

investigadores universitarios y de los organismos públicos de investigación CSIC, IGME, INTA, CIEMAT e INIA. Pero el mayor protagonismo lo mostraron los jóvenes investigadores precarios de la FJI y Ciencia con Dignidad, que expresaron su desacuerdo radical con un modelo de investigación que les relega a la precariedad o al exilio.

El manifiesto fue leído por una representante de la Asociación de Jóvenes Investigadores de Madrid. El texto recordaba la necesidad de recuperar el Pacto por la Ciencia firmado en diciembre de 2013 en el Congreso de los Diputados, tras las movilizaciones impulsadas por el Colectivo Carta por la Ciencia y el agravamiento de las condiciones presupuestarias y de recursos humanos. El texto denunciaba así mismo los nuevos recortes que suponen los presupuestos presentados en el Congreso, el retraso en la aprobación del Plan Estatal, que debería haberse iniciado en enero de 2017 y la exclusión de la enseñanza universitaria y la investigación en las políticas de recuperación del empleo público.

Tras la manifestación, los organizadores se han puesto en contacto con los diferentes partidos políticos para presentar en el Congreso los objetivos de la Marcha, a fin de introducir las enmiendas adecuadas en el debate parlamentario de los PGE. Asimismo, están en marcha la organización de actos de divulgación del llamamiento en los centros académicos y de investigación.



La entrevista del Boletín **MARÍA JOSÉ BASALLOTE UREBA**

Nuestra compañera, Investigadora del Instituto Andalúz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica (IFAPA), Centro "Las Torres-Tomejil", Alcalá del Río, Sevilla, se ha jubilado recientemente. En esta entrevista nos explicará su trayectoria profesional, los avances en su línea de investigación, cómo ve el futuro de la Fitopatología y sus proyectos



¿Nos puedes hacer una breve reseña de tu trayectoria profesional?

La carrera de Biológicas la estudié en la Universidad de Sevilla y la finalicé en 1975. Después de 5 años en los que, por razones personales dejé aparcada mi formación fitopatológica, llegué a Córdoba donde tuve la oportunidad de continuarla en la Cátedra de Patología Vegetal de la ETSIA con Rafael M. Jiménez Díaz, primero como meritoria y, posteriormente, con dos becas de la Dirección General de Investigación y Extensión Agraria (Junta de Andalucía), una pre- y otra postdoctoral. La última co-tutorada por él y por José M^a Melero Vara. Durante mi estancia en la Universidad llevé a cabo la Tesina de Licenciatura sobre el Mildiu del girasol y la Tesis

Doctoral sobre la histopatología y patogénesis de la Fusariosis del garbanzo, ambos trabajos en cultivares susceptibles y resistentes de la planta huésped correspondiente. En 1987 finaliza ésta etapa y continuo mi andadura fitopatológica con José M^a Melero, en el departamento de Protección Vegetal del Centro de Investigación y Desarrollo Agrario Alameda del Obispo de Córdoba (Junta de Andalucía). Es en este momento cuando establezco contacto con las enfermedades en el campo, en un trabajo con la solarización del suelo en el control de la podredumbre blanca del ajo. En ese año, siendo todavía becaria postdoctoral, me concedieron el primer proyecto de investigación sobre enfermedades del cultivo del ajo en el que estuve muy respaldada por varios compañeros

con mayor experiencia (José M^a Melero, Miguel Ángel Blanco). En octubre de 1988 obtuve un contrato por concurso de méritos que mantuve hasta junio de 1990 cuando me dieron un nombramiento de funcionaria interina que se prolongó hasta 2007 cuando se realizó la primera convocatoria de plazas en el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) creado en 2003. Permanecí en el centro de investigación de Córdoba hasta octubre de 1997 y mi trabajo lo desarrollé entre ese centro, el del Camino del Purchil de Granada,

el de Churriana en Málaga y del Camino de la Esparragosa de Chipiona, (Cádiz). En los 10 años en Alameda del Obispo colaboré estrechamente con José M^a Melero, Ana Prados y Carlos López, inicialmente en estudios de control de la Podredumbre blanca del ajo mediante métodos físicos químicos y biológicos. Posteriormente, tras la detección por primera vez en España del hongo aéreo *Stemphylium vesicarium* en diversos cultivos de la familia Liliáceas, realizamos investigaciones acerca de su etiología, epidemiología y control.



Con Ana Prados, José M^a Montosa y Pepe Melero en la recolección de una parcela experimental de ajos en 1991

Paralelamente, en fincas de aguacate de la costa de Málaga y Granada afectadas por podredumbres radiculares detectamos *Rosellinia necatrix*, *Phytophthora cinnamomi* y *Armillaria mellea* y llevamos a cabo estudios de control mediante solarización del suelo. A finales de 1997 me trasladé al Centro de Las Torres-Tomejil en Alcalá del Río (Sevilla), incorporándome al laboratorio de Fitopatología del que era responsable Fernando Romero. Y allí he permanecido hasta mi jubilación en diciembre de 2016 investigando en

enfermedades ocasionadas por distintas especies de *Fusarium* en hortalizas y flor cortada, y en oomicetos asociados a la seca de la dehesa. Durante todos estos años dedicados a la Fitopatología hay algo que no he dejado de hacer y ha sido intentar mantenerme en la realidad de los problemas a los que se enfrentan los agricultores. Entre ellos las enfermedades de sus cultivos. Por eso una parte importante de mi tiempo lo he dedicado a trasladarles los avances que íbamos realizando en el sector correspondiente.



Muestreo de suelo en un campo de aguacates en La Mayora en el verano de 1993



Haciendo una lectura de síntomas de manchas foliares en ajo con Curro y Ana en la primavera de 1994

¿Qué te hizo dedicarte a la investigación?

No tenía precedentes familiares, pero sí había agricultores en mi familia materna. Y tanto mi padre como mi madre me inculcaron el interés de conocer. Cuando acabé Biológicas intenté hacer la Tesina de Licenciatura, pero al no pertenecer Alvarado a la Universidad y carecer en aquél momento de un laboratorio donde realizarla tuve que posponerla hasta mi llegada a Córdoba en 1980. A partir de ese momento todos mis esfuerzos se han concentrado en investigar y transferir los resultados obtenidos.

En tu larga trayectoria investigadora has tenido ocasión de formar a nuevos Doctores en Fitopatología ¿Qué diferencias y semejanzas encuentras entre los Doctorandos de antes y los de ahora?

Creo que en general las nuevas generaciones dedican menos tiempo al trabajo que la nuestra y las inmediatamente posteriores. Les hemos hablado y predicado sobre la importancia de luchar con tesón para conseguir objetivos, pero aunque la carrera investigadora es muy bonita y gratificante exige mucho sacrificio y dedicación y los jóvenes, por regla general, anteponen sus intereses vitales, posiblemente debido al gran desencanto que sufren por la falta de

expectativas profesionales.

Durante tu carrera investigadora has abordado el estudio de diversas enfermedades fúngicas en una gran variedad de cultivos, ¿cómo han evolucionado los conocimientos en esta materia en los últimos años? y ¿cuáles consideras serán los aspectos clave que deben ser abordados en el futuro?

Desde hace años, el conocimiento en estas enfermedades y en la mayoría de ellas, se está centrando de manera mayoritaria en estudios moleculares, muchos de ellos estudios taxonómicos. A mi juicio se está perdiendo el verdadero sentido de nuestras investigaciones. Se está anteponiendo el interés personal de hacerse rápidamente con un Curriculum vitae muy nutrido de publicaciones reconocidas en el ámbito científico, al social de resolver problemas reales en el ámbito agrario, porque eso conlleva un excesivo sacrificio (muchas salidas al campo con climatología no siempre favorable y varios años de investigación para obtener resultados concluyentes y publicables) y una ralentización en la carrera profesional. El conocimiento de la epidemiología de las enfermedades para facilitar la elección de las medidas de control más adecuadas para cada problema me parece fundamental, así como la búsqueda de resistencia que no vaya en

detrimento de la calidad de los productos agrícolas

¿Qué hitos destacarías de tu carrera investigadora?

En primer lugar mi formación entre las Universidades de Sevilla y Córdoba, donde me ilusionaron y enseñaron la importancia de ser meticuloso. En segundo lugar vendrían los demás logros siempre fruto de un trabajo en equipo muy estimulante. Al inicio, el conocimiento de las enfermedades (Mildiu del girasol y Fusariosis del garbanzo) a nivel microscópico, de la mano de Rafael M. Jimenez Diaz y Hava Rapoport. Posteriormente el descubrimiento de los problemas en el campo en el que me introdujeron varios compañeros (Pepe Melero y Francisco Mansilla, entre otros). Pero si tuviera que destacar alguno de los trabajos de investigación que he llevado a cabo, me quedaría con los realizados con

Stemphylium vesicarium. Creo que ha sido una de las experiencias más estimulantes de mi trayectoria.

¿Ha cambiado mucho la Fitopatología en España desde que comenzaste en este “oficio”?

En lo fundamental creo que no, pero sí en la manera de abordarla. Se ha dado un paso adelante en la detección y diagnóstico de enfermedades mediante herramientas moleculares. Pero la experiencia nos muestra que no son infalibles y que deben complementar los métodos tradicionales de aislamiento, identificación y pruebas de patogenicidad. En el tema de control también hay muchas innovaciones, dándose de lado a los químicos de síntesis en favor de métodos más razonables para el entorno, como la utilización de diferentes residuos agrícolas y ganaderos.



En 2008 con parte del equipo que ha realizado estudios de control en la Fusariosis del clavel en Chipiona

¿Cómo ves el futuro?

En la naturaleza hay una fuente inagotable de soluciones para el control de enfermedades. Creo que se potenciarán

las investigaciones para la identificación y la experimentación con principios activos obtenidos de las propias plantas y de los residuos que se generan en su cultivo.

¿Cuáles serían tus consejos para las nuevas generaciones de fitopatólogos?

Que reflexionen acerca de la priorización de las investigaciones. Los conocimientos que se generen deberían ir encaminados principalmente a la resolución de problemas reales en el sector agrario español, ya que los recursos disponibles son cada vez más escasos. Que divulguen sus conclusiones con mayor intensidad en medios asequibles para los agricultores de forma que estos puedan sacar partido del esfuerzo económico y humano realizado.

¿Qué relación has tenido con la SEF?

Fui vocal de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Fitopatología de 2004 a 2008, con José M^a Melero y Emilio Montesinos de presidentes. Fue una experiencia muy enriquecedora que me permitió “descubrir” a personas interesantes y entrañables a la par.

¿Cuáles son ahora tus principales actividades?

Elaborar los últimos resultados para su publicación. Acudir a clases de Fitoterapia en la Facultad de Farmacia. El uso de plantas medicinales siempre me ha interesado y no había tenido tiempo en el pasado para estudiar sobre ellas y sus efectos en la salud humana. Dar largos paseos a la hora que me apetezca. Pintar acuarelas. Viajar. Compartir tiempo con la gente que quiero.

¿Sientes alguna añoranza de tu actividad profesional anterior en esta nueva etapa de tu vida?

Aunque he dedicado mi vida a una profesión que me ha interesado desde el minuto cero, no tengo añoranza. No soy muy dada a echar la vista atrás y tengo otras ilusiones que cumplir. Aunque eso sí, la curiosidad permanece.

Muchas gracias Pepa por atender nuestra invitación. Te deseamos todo lo mejor en esta nueva etapa de tu vida profesional y personal.



Fiesta de celebración de la jubilación con compañeros y amigos, en noviembre de 2016

MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL

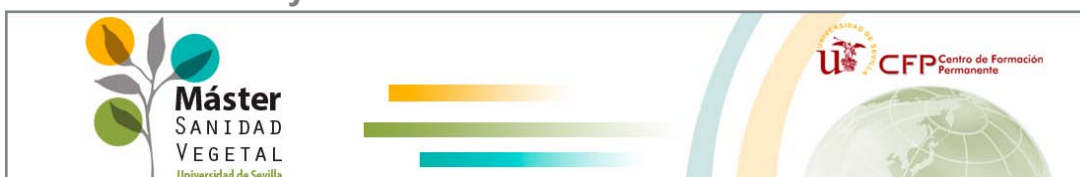
Fechas: 2016 y 2017

INFORMACIÓN: <http://www.bit.etsia.upm.es/master.php>**PlantHealth – European Master Degree in PLANT HEALTH IN SUSTAINABLE CROPPING SYSTEMS**

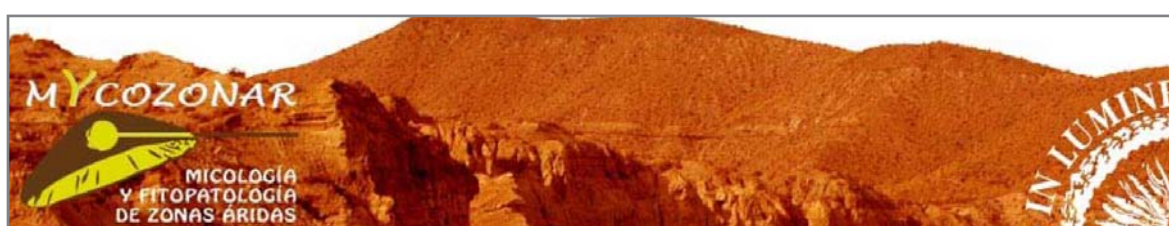
Fechas: 2016 y 2017

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

Jerson Garita-Cambronero



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Genómica comparativa de cepas de *Xanthomonas arboricola* asociadas a *Prunus* spp.: caracterización de los procesos asociados de infección de la mancha bacteriana de frutales de hueso y almendro” en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas-Universidad Politécnica de Madrid. La Tesis ha sido dirigida por el Dr. Jaime Cubero Dabrio (INIA) y Dra. María M. López González (IVIA). El tribunal estuvo constituido por los doctores Dr. Emilio Montesinos Seguí (Universidad de Girona), Dra. Emilia López Solanilla (Universidad Politécnica de Madrid), Dr. Cayo Ramos Rodríguez (Universidad de Málaga), Dra. Ana Palacio Bielsa (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón), Dr. Rafael Rivilla Palma (Universidad Autónoma de Madrid). La Tesis Doctoral obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



De izquierda a derecha: Rafael Rivilla Palma, Ana Palacio Bielsa, Emilio Montesinos Seguí, Jerson Garita Cambronero, Cayo Ramos Rodríguez, Emilia López Solanilla y Jaime Cubero Dabrio

Xanthomonas arboricola es una especie bacteriana que tradicionalmente ha sido asociada al desarrollo de enfermedades en una amplia gama de huéspedes. Las cepas patógenas de esta especie han sido clasificadas en nueve grupos

infraespecíficos ó patovares, cada uno de los cuales presenta una gama limitada de huésped así como diversas variantes a nivel fenotípico y genético. Recientemente, se han descrito en diversidad de huéspedes una serie de cepas no virulentas o

saprófitas que no pertenecen a ninguno de los grupos patógenos y a diferencia de estos presentan una mayor diversidad genética.

Dentro de los grupos infraespecíficos descritos para esta especie destacan, debido a su especial interés fitopatológico, los patovares *corylina*, *juglandis* y *pruni* los cuales causan enfermedad e importantes pérdidas en la producción del avellano, el nogal y los frutales del género *Prunus* respectivamente. En lo que respecta al patovar *pruni* (*Xap*), a pesar de haber sido descrito en Estados Unidos desde inicios del siglo XX y encontrarse en las

principales zonas productoras de *Prunus* a nivel mundial, no es hasta finales del siglo XX cuando inicia su estudio a profundidad en el continente Europeo, donde este patógeno es considerado de cuarentena. En España la presencia de *Xap* se informó por primera vez en el año 2002, desde entonces, ha sido informado como agente causal de enfermedad en variedad de especies del género *Prunus*. Dentro de las cuales destacan el almendro, el ciruelo y el melocotonero, en los cuales la mancha bacteriana causa daños en tronco, ramas, hojas y frutos (Figura 1).



Figura 1. Sintomatología propia de la mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas arboricola* en hojas de melocotonero.

En este trabajo, inicialmente, mediante un análisis de secuencias multilocus (MLSA), se estudió la variación molecular de las cepas de *Xanthomonas arboricola* aisladas de *Prunus* spp. durante los brotes de la mancha bacteriana registrados en España, encontrándose que además de un grupo mayoritario de cepas caracterizado como *Xap*, se identificaba un grupo minoritario de cepas de *X. arboricola* que no pertenecía a ninguno de los patovares descritos para la especie. Tanto los resultados del MLSA

como el análisis de caracteres fenotípicos basados en aspectos asociados con mecanismos iniciales de la infección (utilización de compuestos de carbono, motilidad, quimiotaxis, producción de sustancias surfactantes) y el estudio de la patogenicidad en diferentes huéspedes, determinó el carácter atípico de estas cepas de *X. arboricola* aisladas de *Prunus*.

Dos cepas de *Xap*, CITA 33 e IVIA 2626.1, así como tres de las cepas

atípicas de *X. arboricola* aisladas de *Prunus* spp. (CITA 14, CITA 44 y CITA 124), fueron seleccionadas para la secuenciación de sus genomas, con el fin de determinar, mediante la comparación de sus genomas, aquellos factores moleculares que pudiesen estar relacionados al desarrollo de la

mancha bacteriana. Se determinó que las cepas de *X. arboricola* aisladas de *Prunus*, independientemente de su virulencia compartían 3.103 secuencias codificantes de proteínas, siendo más similares entre sí, en cuanto a su contenido génico, las dos cepas de *Xap* (Figura 2).

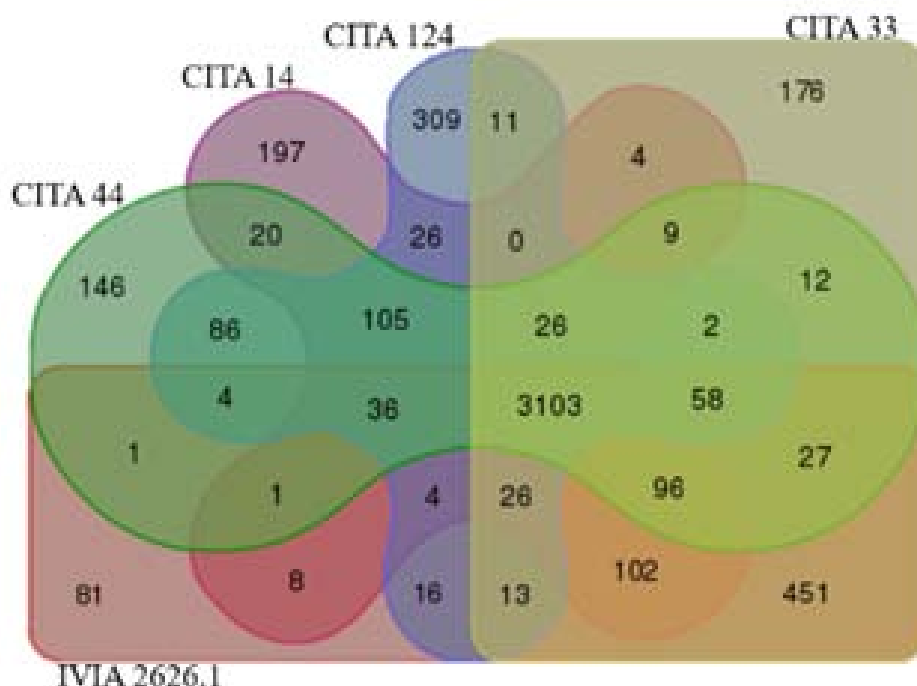


Figura 2. Potenciales grupos de genes orthólogos en *Xanthomonas arboricola*. Diagrama de Venn mostrando aquellos grupos de genes ortólogos compartidos por cinco genomas de cepas virulentas (CITA 33 e IVIA 2626.1) y cepas no virulentas (CITA 14, CITA 44 y CITA 124) de *X. arboricola* aisladas de *Prunus* spp.

Un posterior análisis filogenético basado en el “core genome” así como un análisis pangenómico que incluyó los genomas disponibles para la especie *X. arboricola*, permitió determinar que las cepas atípicas de *X. arboricola* se agruparon filogenéticamente con un grupo de cepas no virulentas o poco virulentas, aisladas de diversidad de huéspedes, mientras que las cepas de *Xap* formaban un grupo con otras cepas de este patovar aisladas de melocotonero (Figura 3).

Se analizó, para ambos grupos, la presencia de genes homólogos a los genes descritos en otras especies de *Xanthomonas*, así como en otros grupos bacterianos, relacionados con los transportadores dependientes de TonB (TBDTs), sensores del sistema regulador de dos componentes

(STCRs), proteínas quimiorreceptoras de grupos metilo (MCPs), quimiotaxis, quorum-sensing, estructura y regulación del flagelo, estructura y regulación del pilus tipo IV, adhesinas no fimbriales, producción de xanthano, enzimas degradadoras de pared celular, componentes estructurales y de regulación de los sistemas de secreción II, III y IV, los efectores del sistema de secreción tipo III y la presencia del plásmido pXap41 asociado con virulencia y descrito en *Xap*.

Con respecto a las cepas no virulentas, las cepas de *Xap* presentaron dos STCRs y una MCP únicas. En relación al flagelo, se encontró un polimorfismo en la flagelina que podría estar relacionado con la inhibición de la activación de la respuesta inicial de defensa de la planta. Para el pili tipo IV, solamente las cepas de *Xap* presentaron

homólogos para los genes codificantes de las pilinas menores, asociados a especificidad de huésped y virulencia. El perfil de adhesinas no fimbriales de *Xap* presentó dos adhesinas únicas. Además, *Xap* presentó dos sistemas de secreción tipo II y un repertorio de enzimas degradadoras de pared que contenía una pectato liasa, una xilanasas y una xilosidasa no compartidas con las cepas no virulentas. *Xap* presentó homólogos para el sistema de secreción tipo IV VirB/VirD4 pero no se encontró ningún efector de este sistema. Además solamente las cepas virulentas presentaron el sistema *tfc* asociado a la transferencia horizontal de material genético.

La diferencia más característica entre ambos grupos se basó en la variación en la presencia del sistema de secreción tipo III *hrc/hrp* el cual solamente estaba presente en las cepas de *Xap* y en una de las cepas atípicas. En cuanto al perfil de efectores para este sistema, las cepas de *Xap* presentaron al menos 21 genes, mientras que la cepa atípica presentó

solamente 6. Las dos cepas atípicas restantes no presentaron homólogos para ninguno de los componentes del T3SS ni para sus efectores asociados. En este trabajo además se describió la presencia de un nuevo efector único para *Xap* denominado XopAQ. Además, las cepas no virulentas, a diferencia de *Xap*, no presentaron el plásmido pXap41.

Por último, debido a que los actuales métodos de detección e identificación de *Xap* generaban falsos positivos al identificar como *Xap* las cepas atípicas caracterizadas en este trabajo, se procedió a desarrollar un nuevo método de PCR en tiempo real basado en la amplificación parcial del gen *xopE3* de *Xap* en conjunto con la amplificación parcial del gen *ftsX*. Un doble resultado positivo para estos genes permite determinar la cepa como *Xap* mientras que un resultado positivo solo para el gen *ftsX*, permite identificar a aquellas cepas atípicas de *X. arboricola* aisladas de *Prunus* (Figura 3).

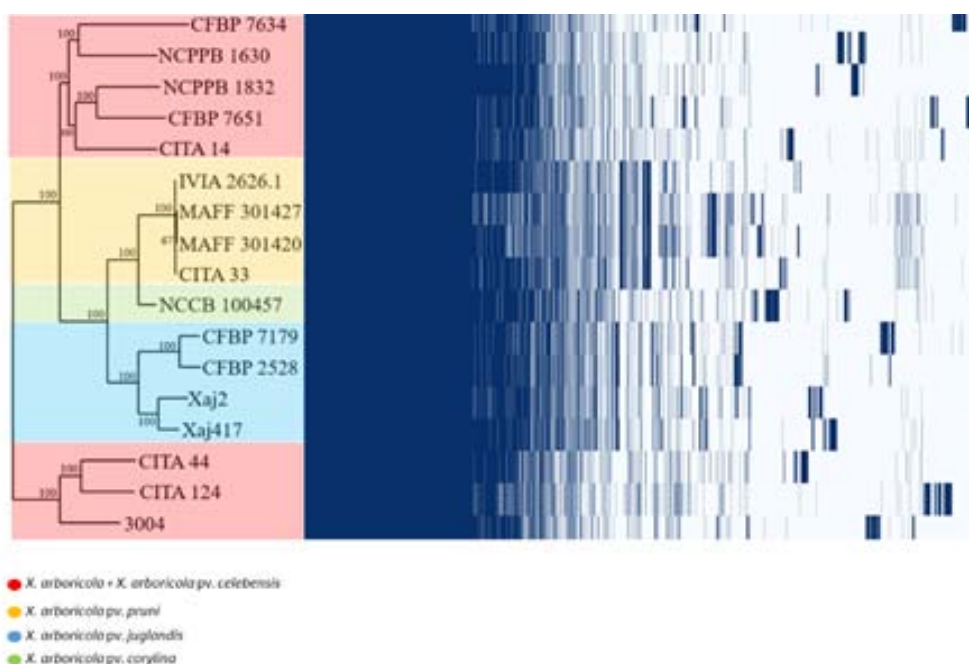


Figura 3. Análisis filogenético de 17 cepas de *Xanthomonas arboricola* basado en el “core genome” (2.714 potenciales grupos de genes ortólogos), así como la representación de la distribución de los 7.074 potenciales grupos de genes ortólogos que conforman el pangenoma de la especie. Las secuencias fueron alineadas usando PRANK. El análisis de Maximum likelihood se realizó con RaxML. Se muestran los valores de bootstrap (1.000 réplicas) para cada uno de los diferentes clados.

El conjunto de resultados de este trabajo abre la puerta a futuros estudios funcionales que confirmarán la implicación o no de los genes identificados aquí como presumiblemente involucrados en las diferentes etapas de infección en la mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Garita-Cambronero J., Sena-Vélez M., Palacio-Bielsa A., Cubero J. 2014. Draft genome sequence of *X. arboricola* pv. *pruni* strain Xap33, causal agent of bacterial spot disease on almond. *Genome Announcements* 2(3): e00440-14.

Garita-Cambronero J., Palacio-Bielsa A., López M. M., Cubero J. 2016. Draft genome sequence for virulent and avirulent strains of *Xanthomonas arboricola* isolated from *Prunus* spp. in Spain. *Standards in Genomic Sciences* 11:12.

Garita-Cambronero J., Palacio-Bielsa A., López M. M., Cubero J. 2016. Draft genome sequence of two strains of *Xanthomonas arboricola* isolated from *Prunus persica* which are dissimilar to strains that cause bacterial spot disease on *Prunus* spp. 4(5): e00974-16.

Garita-Cambronero J., Palacio-Bielsa A., López M. M., Cubero J. 2016. Comparative genomic and phenotypic characterization of pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* reveals insights into the infection process of bacterial spot disease of stone fruits. *PLoS ONE* 11(8): e0161977.

Garita-Cambronero J., Palacio-Bielsa A., López M. M., Cubero J. 2017. Pan-genomic analysis permitted to differentiate virulent and non-virulent strains of *Xanthomonas arboricola* that cohabit *Prunus* spp. and elucidate bacterial virulence factors. *Enviado a Frontiers in Microbiology*. En revisión.



Cristina Prieto Recio



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Factores bióticos, abióticos y de gestión involucrados en el Decaimiento de *Pinus pinaster* en la Península Ibérica” en Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Valladolid. La Tesis la han dirigido los Drs. Dr. Julio Javier Díez Casero y Felipe Bravo Oviedo. El Tribunal estuvo formado por los Drs. Oscar Santamaría (UNEX), Fernando Alves (UVa), Leticia Botella (Mendel University, República Checa), Juan Pajares (UVa), Juan Antonio Martín (UPM), La Tesis recibió la calificación de Sobresaliente *Cum Laude con Mención Internacional*.



Cristina Prieto junto a los Directores de la Tesis y miembros del Tribunal el día de la defensa de su Tesis Doctoral: Julio Javier Díaz Casero, Leticia Botella, Felipe Bravo Oviedo, Oscar Santamaría, Fernando Alves Santos, Juan Pajares y Juan Antonio Martín

El decaimiento de un bosque se puede definir, como una enfermedad compleja causada por la interacción de un número intercambiable de factores, tanto abióticos como bióticos que producen el deterioro general y gradual de una masa forestal, y cuya última consecuencia puede ser la muerte de los árboles. Estos factores pueden ser de predisposición, de incitación

o contributivos. *Pinus pinaster* Ait. es una de las especies forestales más relevantes de la Península Ibérica, tanto por su valor económico como por su carácter protector. Durante las últimas décadas, el Pino Negral ha sufrido un proceso de decaimiento progresivo en la Península Ibérica con unos síntomas característicos: la inusual transparencia de copa, el enanismo en

las acículas, la decoloración del follaje y la muerte prematura de los árboles. El objetivo general de esta Tesis doctoral fue el de revelar los factores tanto bióticos (agentes patógenos) como abióticos incluyendo los factores antropogénicos (clima, propiedades del suelo y manejo forestal), involucrados en el decaimiento *Pinus pinaster* en la Península Ibérica. Así como, desentramar que papel está jugando cada uno de ellos, es decir, si actúa como factor de predisposición, de incitación o de contribución al decaimiento. Para ello, se han muestreado 27 parcelas circulares de 15 m de radio ubicadas en las principales áreas de distribución natural de la especie en Castilla y León. Dentro de cada parcela se han tomado las medidas dasométricas de todos los árboles (1208 en total), se han evaluado sanitariamente 24 árboles (648 en total) y se han tomado muestras de 3 árboles sanos, 3 con síntomas de decaimiento y 3 muertos en pie. Estas muestras fueron de dos tipos: dos canutillos por cada árbol a la altura de pecho, para obtener el crecimiento de los 20 últimos años en pies con distinto estado de decaimiento (486 en total) y un chaspe de madera de la base del tronco, para detectar a través de cámara húmeda, aislamiento en placa y posterior análisis molecular, la presencia de hongos patógenos (243 en total). También se obtuvieron los parámetros edáficos básicos y los datos climáticos de cada una de las parcelas de estudio. Los principales resultados de esta tesis han sido:

i) Para los factores abióticos y de gestión: Se confirmó que las masas muestreadas presentaban decaimiento, con casi el 40 % de los árboles muertos o dañados (10 y 30 %, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a regiones procedencia de la especie. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas según la zona de muestreo, siendo la zona de la Ribera del Duero en Burgos una de las más afectadas. Se observó un mejor estado sanitario en masas puras que en masas mixtas. A su vez, las masas en las que se habían realizado claras, presentaban mejor estado sanitario que las masas donde no se habían aplicado claras. En particular, los altos

valores de la altura total y de la precipitación de primavera parecen indicar un mejor estado sanitario, mientras que la alta densidad de la masa se asoció a estados fitosanitarios más pobres. Estos resultados parecen sugerir que el déficit de agua y la competencia estarían actuando como factores de predisposición al decaimiento de *Pinus pinaster* en la Península Ibérica. Por otro lado, se detectaron diferencias en los patrones de crecimiento entre los árboles con diferentes condiciones fitosanitarias dentro de las diferentes zonas de muestreo. Se observaron de forma frecuente y constante eventos de alta aridez principalmente durante dos periodos: a principios de la década de los 90, en 1994 y sobre todo durante el año 2005. Los correlogramas entre el crecimiento y la aridez generaron respuestas significativas en función del estado sanitario de los árboles y de la densidad de las masas. Las correlaciones significativas de los árboles muertos se localizaron a lo largo de un intervalo estrecho del eje del tiempo, mientras que los árboles sintomáticos y sanos se localizaron en intervalos medios y más amplios, respectivamente. Estos resultados sugirieron que los periodos de sequía de las dos últimas décadas, podrían estar actuando como factores de incitación al decaimiento.

ii) Para los factores bióticos: Se aisló e identificó mediante técnicas morfológicas y moleculares la presencia de *Heterobasidion annosum* en *Pinus pinaster* por primera vez en España (primera cita). Por otra parte, se identificaron quince especies de hongos, que se dividieron en dos grupos distintos en función de su ecología: seis especies saprófitas y nueve especies patógenas con diferentes grados de virulencia. Las especies patógenas identificadas pertenecieron principalmente al grupo de los hongos Ophiostomatales o del azulado de la madera destacando entre ellas *Ophiostoma minus*, *Ophiostoma ips*, *Ophiostoma piliferum* y *Ophiostoma ranaculosum*. También se identificó el hongo de pudrición de la raíz *Heterobasidion annosum*. La zona de muestreo de la Ribera del Duero en Burgos albergó el mayor número de especies de hongos patógenos, mientras que la zona de Soria fue la que presentó el menor número.

Finalmente se realizó por primera vez hasta la fecha, un ensayo de patogenicidad de aislados españoles de *Heterobasidion annosum* sobre plántulas de dos años de *Pinus pinaster*. Las tasas de mortalidad, la longitud de las necrosis, los síntomas de marchitamiento de las acículas y el porcentaje de raíces finas de las plántulas

inoculadas, difirieron significativamente de las plantas control. Por lo tanto, este estudio demostró la susceptibilidad del pino Negral a *Heterobasidion annosum* en España, lo que nos sugiere, que este patógeno podría ser uno de los principales agentes contributivos al decaimiento.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

Prieto-Recio, C., Martín-García, J., Bravo, F., Diez, J.J., 2015. Unravelling the associations between climate, soil properties and forest management in *Pinus pinaster* decline in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*. 356, 74–83. doi:10.1016/j.foreco.2015.07.033. Factor de impacto (JCR) 2.66.

Prieto-Recio, C., Martín-García, J., Diez, J.J., 2014. Pathogenicity of Spanish isolates of *Heterobasidion annosum* s.s. in *Pinus pinaster* seedlings. *Forest Pathology* 44, 163–165. doi:10.1111/efp.12091. Factor de impacto (JCR) 1.37.

Prieto-Recio, C., Romeralo, C., Bezos, D., Martín-García, J., Martínez-Álvarez, P., Botella, L., Diez, J.J., 2012. First Report of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinaster* in Spain. *Plant Disease* 96, 770. doi:10.1094/PDIS-10-11-0890-PDN. Factor de impacto (JCR) 3.02.

Próximos envíos a revistas científicas (sin publicar):

Prieto-Recio, C., Lara, W., Riofrío, J., Diez, J.J., Bravo, F., 2016. A multilevel approach for modelling tree growth and aridity in relation to stand competition and health status of *Pinus pinaster* in Spain. *Agricultural and Forest Meteorology*.

Prieto-Recio, C., Roder, G., Diez, J.J., 2016. Blue-stain and root rot fungi associated with the *Pinus pinaster* decline in the Iberian Peninsula. *Silva Fennica*.

Prieto-Recio, C., Bravo, F., Diez, J.J., Martín-García, J., 2016. Influence of environmental and silvicultural factors on *Pinus pinaster* health status at individual tree level in central Spain. *Annals of Forest Science*.

Noticias publicadas en internet sobre la Tesis

La Vanguardia: <http://www.lavanguardia.com/vida/20161028/411406444462/estudio-revela-las-causas-de-decaimiento-de-los-pinos-y-como-mejorar-su-salud.html>

Heraldo de Soria: <http://www.heraldodesoria.es/noticias/castilla-leon/2016/10/28/un-estudio-revela-las-causas-del-decaimiento-los-pinos-como-mejorar-salud-1135791-1511034.html>

DICYT: <http://www.dicyt.com/noticias/desvelan-que-factores-estan-matando-al-pino-negral-y-como-es-posible-mejorar-su-salud?platform=hootsuite>

NCYT: <http://noticiasdelaciencia.com/not/21675/desvelan-que-factores-estan-matando-al-pino-negral-y-como-es-posible-mejorar-su-salud/>

El Norte de Castilla: http://www.elnortedecastilla.es/palencia/201610/31/palencia-investiga-pinos-resineros-20161031114139.html?ns_campaign=rrss&ns_mchannel=boton&ns_fee=0&ns_source=fb&ns_linkname=palencia

Revista “Agro” de elEconomista: reportaje de dos páginas sobre la Tesis (páginas 28 y 29): <http://diario.eleconomista.es/i/752706-eleconomista-agro-19-noviembre-2016?token=>

Ángela Varo Suárez



Ha defendido su Tesis Doctoral titulada “Evaluación de microorganismos, enmiendas orgánicas y productos naturales para el control biológico de la Verticilosis del olivo” el 16 de dicimembre de 2016 en la Universidad de Córdoba (UCO). La Tesis se realizó en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes bajo la dirección del Dr. Antonio Trapero Casas. El tribunal estuvo constituido por los Drs. Francisco J. López Escudero (UCO), Jordi Luque i Font (IRTA) y Paula Baptista (Instituto Politécnico de Bragança, Portugal). La Tesis obtuvo la calificación Sobresaliente *Cum Laude* con Mención Internacional.



La autora junto con el Tribunal y el Director de la Tesis Doctoral. De izquierda a derecha: Jordi Luque i Font, Francisco J. López Escudero, Ángela Varo Suárez, Antonio Trapero Casas y Paula Baptista

Uno de los retos más importantes de la olivicultura actual es el control de la Verticilosis causada por el hongo *Verticillium dahliae*. Estimaciones realizadas en varios países de la cuenca mediterránea señalan incidencias medias de 1–5% de olivos afectados, aunque en algunas áreas se ha constatado una incidencia superior al 50% y una elevada mortalidad de árboles. La gran dificultad que presenta el control

de esta enfermedad, junto a la falta de productos químicos eficaces, tanto para el tratamiento del suelo como de la planta, ha motivado la búsqueda de métodos alternativos de control. Dentro de este contexto, surge el control biológico como una estrategia eficaz y sostenible. Por esta razón, la identificación de potenciales tratamientos biológicos para el control de la Verticilosis es un objetivo prioritario

DE LOS SOCIOS

para el desarrollo de una estrategia integrada de control de la enfermedad.

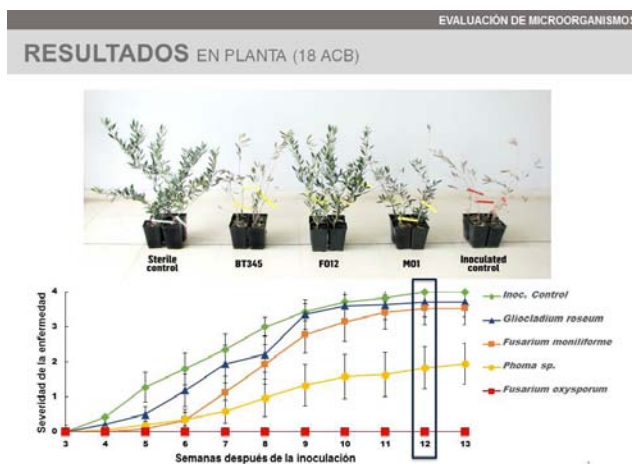
El primer objetivo de la Tesis doctoral realizada fue la puesta a punto de un método de infestación del suelo que reprodujese las condiciones

naturales de infección. Previamente, para superar la limitación que presentaban determinados aislados recalcitrantes de *V. dahliae* para la producción de las estructuras de resistencia (microesclerocios), se realizó la evaluación y optimización



de un medio de cultivo para producir dichas estructuras e infestar el suelo. No obstante, el mejor método de infestación del suelo seleccionado en base a la respuesta severa, consistente y homogénea de las plantas fue el medio arena-harina de maíz-agua (AMA) a una dosis del 20% (peso/peso). Este método de infestación permitió establecer diferentes rangos de eficacia, desde altamente eficaces (>90% de reducción de la enfermedad) hasta levemente eficaces (<10% de reducción de la enfermedad).

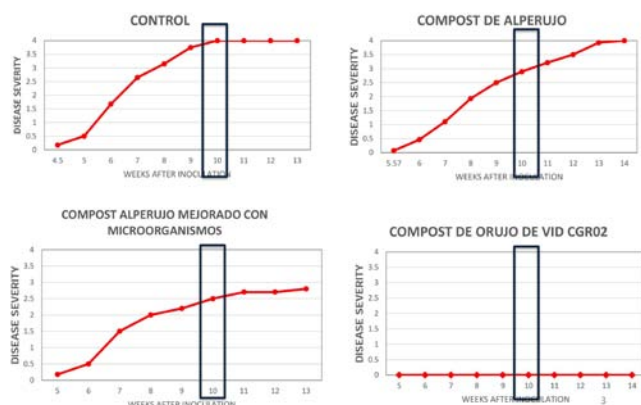
El siguiente objetivo fue la evaluación de diferentes microorganismos (hongos, bacterias y su extractos), enmiendas orgánicas (residuos de animales y de la industria agroalimentaria) y sustancias naturales (aceites esenciales y extractos vegetales) para el control de *V. dahliae*, mediante el desarrollado de una metodología de selección de los tratamientos biológicos en cuatro etapas: 1) *in vitro*, por su efecto sobre el crecimiento micelial o la germinación de esporas del patógeno, 2)



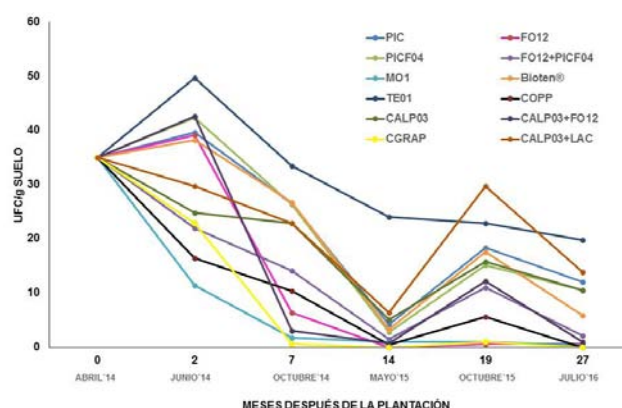
en suelo, por su efecto sobre la reducción de microesclerocios del patógeno en un suelo naturalmente infestado, 3) en planta, por su efecto sobre la infección de plantones de olivo en condiciones controladas, y 4) en campo, por su efecto sobre la enfermedad en condiciones de infección natural.

En base a los resultados de la evaluación de 162 tratamientos en condiciones controladas, se seleccionaron 14 tratamientos biológicos para ser evaluados en tres experimentos de campo, uno de estos experimentos, FT3, aún está en curso. La cepa no patógena de *Fusarium oxysporum* FO12, y el orujo de vid CGR03, fueron los candidatos más prometedores, alcanzando casi el 100% de la inhibición de la enfermedad en condiciones controladas y la erradicación del patógeno en suelo naturalmente infestado. No obstante, éstos y otros potenciales tratamientos deben ser confirmados en futuros experimentos en campo con diferentes densidades de inóculo y condiciones edafoclimáticas.

EVALUACIÓN ENMIENDAS ORGÁNICAS RESULTADOS EN PLANTA



ENSAYOS EN CAMPO EXPERIMENTO 2. FINCA "EL CALVARIO" VILLANUEVA DE LA REINA, JAÉN



Los resultados obtenidos suponen un avance significativo con relación al control de la Verticilosis del olivo en campo, puesto que algunos de los candidatos seleccionados en este trabajo podrían estar disponibles en un futuro próximo como tratamientos biológicos eficaces que ayuden a controlar esta importante enfermedad.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Varo, A., Mulero, A., Adem, M., Roca L., Raya, M.C., López-Escudero, F.J., Trapero, A. (2017) Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive. *Crop Protection* 92: 168-175.

Varo, A., Raya-Ortega M.C., García-Ortiz Civantos, C., Fernández-Hernández, A., Agustí-Brisach, C., Trapero, A. (2017). Identifying potential organic amendments to suppress the *Verticillium* wilt disease of olive. *Plant Pathology*. (In press).

Varo, A., Raya, M.C., Trapero, A. (2016) Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Applied Microbiology* 121: 767-777.

Varo, A., Raya, M.C., Trapero, A. (2016) Enhanced production of microsclerotia in recalcitrant *Verticillium dahliae* isolates and its use for inoculation of olive plants. *Journal of Applied Microbiology* 121: 473-484.

García-Ruiz, G., Trapero, C., Varo-Suárez, A., Trapero, A., López-Escudero, F.J. (2015) Identifying resistance against *Verticillium* wilt in local Spanish olive cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* 54: 453-460.

Varo, A., Moral, J., Lozano-Tóvar, M.D., Trapero, A., 2016. Development and validation of an inoculation method to assess the efficacy of biological treatments against *Verticillium* wilt in olive trees. *BioControl* 61: 283-292.

Rybakova, D., Schmuck, M., Wetzlinger, U., Varo-Suárez, A., Murgu, O., Müller, H., Berg, G. (2016) Kill or cure? The interaction between endophytic *Paenibacillus* and *Serratia* strains and the host plant is shaped by plant growth conditions. *Plant and Soil* 405: 65-79

Ariadna Giné Blasco



Ha defendido el pasado 21 de diciembre de 2016 su Tesis Doctoral titulada “Population dynamics of *Meloidogyne* spp. on tomato and cucumber and biologically-based management strategies” en el Departament d’Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Universitat Politècnica de Catalunya bajo la dirección de los doctores Francisco Javier Sorribas Royo y César Ornat Longaron. El tribunal estuvo constituido por los doctores Pablo Castillo Castillo (IAS-CSIC), Luis Vicente Lopez Llorca (Universidad de Alicante) y Francisco Luis Sepulcre Sanchez (Universitat Politècnica de Catalunya). La Tesis obtuvo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude*.



De izquierda a derecha, Luis Vicente López Llorca, Pablo Castillo Castillo, Ariadna Giné Blasco, Francisco Luis Sepulcre Sánchez y Francisco Javier Sorribas

Meloidogyne es el principal género de nematodos fitoparásitos limitante de la producción vegetal a nivel mundial, estando presente en la mayoría de las zonas hortícolas en España causando pérdidas económicas. El objetivo general de la tesis fue determinar la dinámica de

población de *Meloidogyne* spp. en tomate y pepino, las pérdidas de producción que causa, y el efecto de diversos métodos de gestión, de base biológica, para reducir la tasa de crecimiento de la población del nematodo y el daño que causa a los cultivos.



Figura 1. Daños causados por *Meloidogyne incognita* en el tomate susceptible cv. Durinta



Figura 1. Daños causados por *Meloidogyne incognita* en pepino cv. Dasher II

Los objetivos específicos y los resultados más relevantes son los siguientes: i) Elaborar modelos fenológicos de *Meloidogyne* spp. en cucurbitáceas. Los requerimientos térmicos de *M. incognita* y *M. javanica* en pepino y calabacín fueron similares, pero diferentes de los de sandía. En sandía, los requerimientos térmicos de *M. incognita* y *M. javanica* para completar el ciclo de vida difirieron.

ii) Caracterizar la dinámica de población de *M. incognita* en pepino y tomate y las pérdidas de producción ocasionadas por el nematodo. La tasa de crecimiento de la población de *M. incognita* en cultivo de pepino fue mayor en el cultivo de verano-otoño que en el de primavera-verano, pero el límite de tolerancia y la mínima producción relativa no difirieron entre periodos de cultivo. En tomate, la tasa de crecimiento de la población en el cultivar resistente fue menor que en el susceptible. El límite de tolerancia no difirió entre cultivares, pero la mínima producción relativa fue mayor en el cultivar resistente. La tasa de crecimiento de la población en el cultivar resistente incrementó con los años de cultivo reiterado. La evolución de los parámetros poblacionales a lo largo del tiempo permitió detectar precozmente la selección de virulencia.

iii) Caracterizar el efecto del patrón

híbrido de calabaza RS841 sobre la dinámica de población de *M. incognita* y la producción de pepino en invernadero. La tasa de crecimiento de la población del nematodo en el pepino injertado fue mayor que en el no injertado, sin mostrar diferencias en el límite de tolerancia y la mínima producción relativa. En nuestras condiciones, el patrón RS841 no es resistente al nematodo ni aporta más tolerancia al cultivo.

iv) Detección de hongos parásitos de huevos de *Meloidogyne* spp. en parcelas de producción comercial de hortalizas. Se muestrearon un total de 40 parcelas de producción hortícola, 10 en producción ecológica y 30 en producción integrada. Se detectaron hongos parásitos de huevos de *Meloidogyne* spp. en todas las parcelas ecológicas y en la mayoría de integradas. El nivel de parasitismo superaba el 40% en algunas de ellas. *Pochonia chlamydosporia*, *Fusarium* sp. y *Plectosphaerella cucumerina*, fueron los hongos más frecuentes, pero solo la frecuencia relativa de *P. chlamydosporia* estuvo relacionada con el porcentaje de parasitismo.

v) Caracterizar suelos supresivos a *Meloidogyne* spp. en parcelas de producción ecológica de hortalizas. Se realizó un estudio del seguimiento de la fluctuación de las densidades de *Meloidogyne* spp. y del parasitismo de huevos en dos parcelas

de producción ecológica en invernadero. Además, se realizaron bioensayos en contenedor para certificar la supresividad de estos suelos. Paralelamente, se obtuvieron perfiles microbianos mediante DGGE y se compararon con un suelo conductivo. Los resultados demostraron la supresividad de los suelos. Los perfiles microbianos revelaron patrones diferentes en los suelos supresivos y el conductivo. vi) Determinar el efecto de la resistencia vegetal y la aplicación de BioAct WG (*Purpureocillium lilacinus* cepa

251) sobre *M. incognita* en una rotación tomate-pepino en invernadero. La resistencia vegetal fue el único factor que disminuyó la reproducción del nematodo y aumentó el rendimiento del cultivo, sin apreciarse ningún efecto de BioAct WG. No obstante, en los ensayos *in vitro*, el hongo mostró gran capacidad de control. Las condiciones ambientales durante el cultivo, la composición del formulado comercial, y/o las características fisicoquímicas del suelo podrían haber afectado a su actividad.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Giné, A., Bonmatí, M., Sarro, A., Stchigel, A., Valero, J., Ornat, C., Fernández, C., Sorribas, F. J. 2013. Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *BioControl* 58, 407-416.

Giné, A., Lopez-Gómez, M., Vela, M. D., Ornat, C., Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J. 2014. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. *Plant pathology* 63, 1446-1453.

López-Gómez, M., Giné, A., Vela, M. D., Ornat, C., Sorribas, F. J., Talavera, M., Verdejo-Lucas, S. 2014. Damage functions and thermal requirements of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* on watermelon. *Annals of Applied Biology* 165, 466-473.

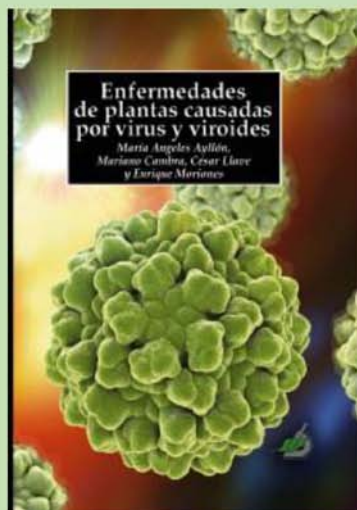
Vela, M. D., Giné, A., López-Gómez, M., Sorribas, F. J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Talavera, M. 2014. Thermal time requirements of root-knot nematodes on zucchini squash and population dynamics with associated yield losses on spring and autumn cropping cycles. *European journal of plant pathology* 140, 481-490.

Giné, A., Carrasquilla, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Sorribas, F. J. 2016. Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic horticulture in plastic greenhouse. *Frontiers in Plant Science*, 7, 164.

Giné, A., Sorribas, F. J. 2016. Effect of plant resistance and BioAct WG (*Purpureocillium lilacinum* strain 251) on *Meloidogyne incognita* in a tomato-cucumber rotation in a greenhouse. *Pest Management Science*, 880-887.

Giné, A., González, C., Serrano, L., Sorribas, F. J. 2017 Population dynamics of *Meloidogyne incognita* on cucumber grafted onto the Cucurbita hybrid RS841 or ungrafted and yield losses under protected cultivation. *European Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1007/s10658-016-1135-z

Giné A., Sorribas, F. J. 2017 Quantitative approach for the early detection of virulence selection of *Meloidogyne incognita* on resistant tomato in plastic greenhouse. *Plant pathology*. DOI: 10.1111/ppa.12679



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.

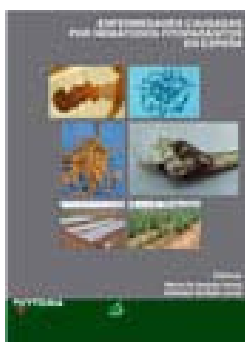
Disponible en:

<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

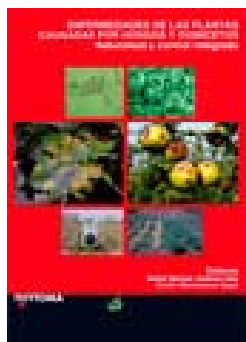


CONTENIDO: Nematodos fitoparásitos. Detección, extracción y diagnóstico de nematodos fitoparásitos. Interacción planta-nematodo: Mecanismos de patogénesis celular. Interacciones planta-nematodo: Resistencia vegetal. Dinámica de poblaciones, epidemiología y umbrales de daño. Estrategias de control integrado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

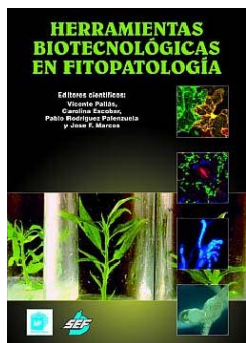


CONTENIDO: Los Hongos y Oomicetos Fitopatógenos. Infección y Patogénesis en las Micosis Vegetales. Manejo Integrado de Enfermedades Causadas por Hongos. Muerte de Plántulas. Podredumbre Radical de la Encina y el Alcornoque. Colapso del Melón Asociado a Hongos Fitopatógenos. Enfermedades Fúngicas de la 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

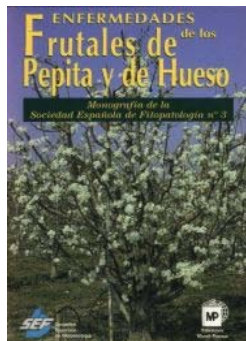


CONTENIDO: Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas. Patogénesis de virus de plantas. Resistencia a virus de plantas. ARNs satélites y ARNs defectivos interferentes. Viroides. Diagnóstico de virosis: técnicas clásicas. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. Técnicas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

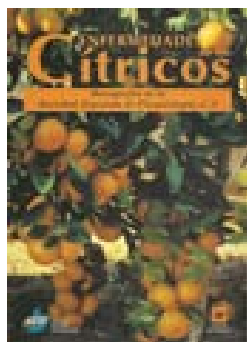


CONTENIDO: Introducción. Enfermedades causadas por viroides, virus, fitoplasmas o transmisibles por injerto. Enfermedades causadas por bacterias. Enfermedades causadas por hongos. Enfermedades causadas por nematodos. Enfermedades de replantación en frutales. Anejos. Relación de patógenos citados en este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

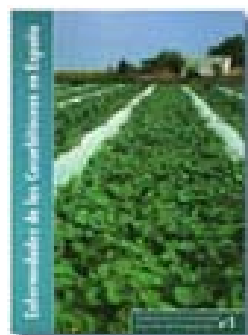


CONTENIDO: En este libro se describen las distintas enfermedades que afectan a los cítricos en España. Se ha dedicado un capítulo a describir las medidas generales de prevención y control de enfermedades, como al saneamiento, cuarentena y certificación que completan las medidas específicas recomendadas 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-Ruiz, 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



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

Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat (*Eriobotrya japonica*) in Spain. González-Domínguez, E., Alves, A., León, M., Armengol, J. 2017. Plant Pathology 66: 77-89. DOI: 10.1111/ppa.12556.

Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat trees in Italy and description of *Diplodia rosacearum* sp. nov. Giambra, S., Piazza, G., Alves, A., Mondello, V., Berbegal, M., Armengol, J., Burruano, S. 2016. Mycosphere 7 (7): 978–989. Doi 10.5943/mycosphere/si/1b/9. Incluye aislado español de *D. rosacearum*.

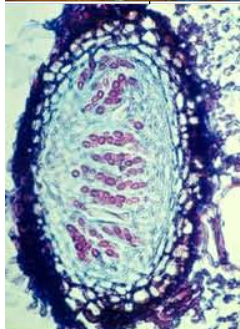
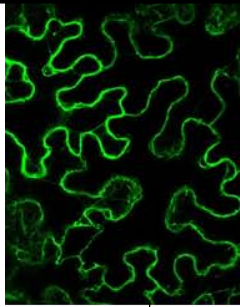
First report of wilting, root rot, and stunting caused by *Pythium aphanidermatum* on sweet pepper (*Capsicum annuum*) in Southeastern Spain. De Cara, M., Pérez-Hernández, A., Aguilera-Lirola, A., Gómez-Vázquez, J. 2017. Plant Disease, *Firt look*, PDIS-11-16-1581-PDN

First report of the highly virulent race 705 of *Plasmopara halstedii* (downy mildew of sunflower) in Portugal and in Spain. De Cara, M., Pérez-Hernández, A., Aguilera-Lirola, A., Gómez-Vázquez, J. 2017. Plant Disease, *Firt look*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0289-PDN>

PATÓGENOS EN ESPAÑA

Further support of conspecificity of oak and mango Powdery mildew and first report of *Erysiphe quercicola* and *Erysiphe alphitoides* on mango in mainland Europe. Desprez-Loustau, M.-L., Massot, M., Feau, N., Fort, T., de Vicente, A., Torés, J.A., Fernández Ortuño, D. Plant Disease, *First look*, PDIS-01-17-0116-RE

First report of root rot on *Rosmarinus officinalis* caused by *Ceratorhiza fragariae* (binucleate *Rhizoctonia*) in Spain. Gonzalez, V., Garcés-Claver, A., Ibarra, N. Plant Disease, *First look*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0462-PDN>



BACTERIAS

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 101 (3): 502, DOI:10.1094/PDIS-09-16-1251-PDN

***Pectobacterium parmentieri* causing Soft rot on potato tubers in Southern Europe.** Suárez, M.B., Fera, F.J., Martín-Robles, M.J., Del Rey, F.J., Palomo, J.L. Plant Disease, *First look*, PDIS-01-17-0013-PDN

VIRUS y VIROIDES

First report of *Grapevine Pinot gris virus* in grapevine in Spain. Ruiz-García, A.B., Olmos, A. Plant Disease, *First look*, PDIS-12-6-1858-PDN

First report of *Persimmon cryptic virus* in Spain. Ruiz-García, A.B., Chamberland, N., Martínez, C., Massart, S., Olmos, A. 2016. Journal of Plant Pathology 99 (1): 287

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

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE EFECTORES DE OÍDIOS

Jesús Martínez-Cruz, Diego Romero, Antonio de Vicente y
Alejandro Pérez-García

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”–Universidad de Málaga–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Campus Universitario de Teatinos s/n. 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es

Trabajo galardonado con Accesit SEF para COMUNICACIONES ORALES en el XVIII Congreso SEF celebrado en Palencia en septiembre de 2016

LOS OÍDIOS

Entre las enfermedades causadas por hongos, los oídios constituyen probablemente el grupo de enfermedades más importantes de nuestros cultivos. Estas enfermedades, comúnmente conocidas como cenizas o cenicillas, son causadas por hongos ascomicetos del orden *Erysiphales* y la familia *Erysiphaceae*, (Bindschedler *et al.*, 2016). Estos hongos patógenos están ampliamente distribuidos, infectando una gran variedad de especies de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Braun y Cook, 2012). El número de especies de oídio reconocidas ha aumentado de 515 especies en 1987 (Braun, 1987) a más de 820 especies actualmente (Braun y Cook, 2012). Las enfermedades causadas por los oídios se caracterizan por la aparición de manchas blanquecinas pulverulentas fácilmente reconocibles tanto en la superficie de la hoja (Fig. 1), como en peciolo y tallos, y ocasionalmente en frutos (Pérez García *et al.*, 2009). Estos patógenos, debido a su peculiar estilo de vida como biotrofos obligados, no matan directamente a su huésped, ya que necesitan de las células vivas del mismo para establecerse y proliferar (Vogel *et al.*, 2004).



Figura 1. Sintomatología típica de los oídios. Hoja de calabacín completamente infectada por colonias de oídio de cucurbitáceas *Podosphaera xanthii*. La imagen fue tomada de Pérez-García *et al.* (2009).

Uno de los mayores desafíos que enfrentan los agricultores y los investigadores es el manejo de las enfermedades causadas por los oídios. El uso de prácticas culturales, cultivares resistentes, fungicidas y organismos antagonistas son herramientas principales para el control de estas enfermedades. El control de las condiciones del suelo, la nutrición de la planta, la densidad de los cultivos, el saneamiento y la rotación de los

mismos, también afectan a la intensidad de la infección (Zeriuoh *et al.*, 2014). En la actualidad, se implementan estrategias de control integrado que combinan muchas de estas herramientas (Zeriuoh *et al.*, 2014). Desafortunadamente, estos patógenos presentan una gran capacidad de adaptación y han conseguido desarrollar resistencias frente a un gran número de fitosanitarios, lo que ha llevado a los agricultores a utilizar herramientas muy diferentes para combatirlos y a los investigadores a buscar nuevas alternativas. El desarrollo de programas apropiados de manejo de estas enfermedades requiere una buena comprensión de la biología de los oídios. La identificación de los aspectos clave que subyacen a las interacciones moleculares patógeno-huésped puede ser un camino que permita el desarrollo de fitoterapias alternativas en el futuro,

sin embargo, el estilo de vida de los oídios como biotrofos obligados representa un obstáculo importante para los investigadores, que ha limitado el estudio y la comprensión de la biología celular y molecular de estos patógenos.

ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Una de las características de los oídios es que su ciclo de vida consta de dos fases, una fase asexual y una fase sexual. La fase sexual ocurre únicamente cuando dos hifas de tipos de compatibilidad opuestos se encuentran. Como consecuencia, se forma un tipo de cuerpo fructífero, denominado casmotecio, que en el caso de *Podosphaera xanthii*, el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas, contiene sólo un asca que alberga ocho ascosporas o esporas sexuales (Fig. 2).

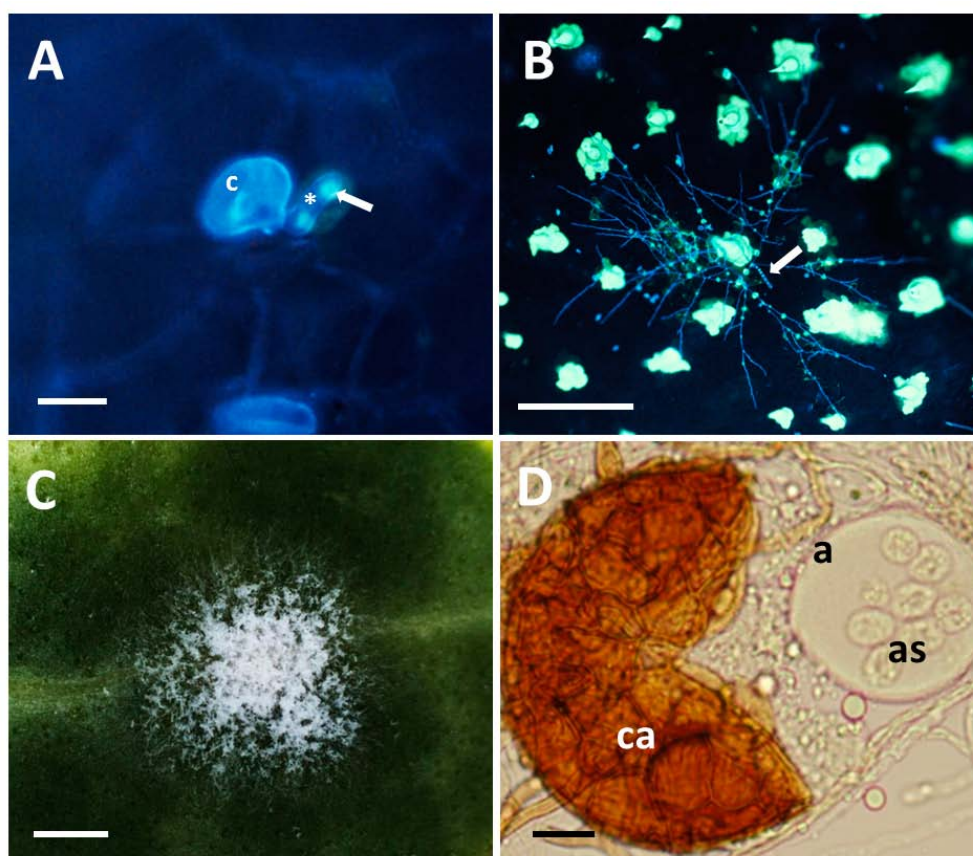


Figura 2. Estructuras de desarrollo de los oídios. A, un conidio germinado de *P. xanthii* (c) que muestra un apesorio (asterisco) desarrollado sobre una hoja de melón. La flecha indica el punto de penetración. B, una colonia *P. xanthii* a las 72 horas de la inoculación mostrando un conidióforo (flecha). C, detalle de una colonia de *P. xanthii*. D, un casmotecio de *P. xanthii* (ca) que contiene un asca (a) con ocho ascosporas (as). Barras de escala: 250 µm en A, 1000 µm en C, 10 µm en B y D. La imagen D fue tomada de Pérez-García *et al.* (2009).

La fase de vida asexual comienza con la deposición de conidios en la superficie de la hoja de un huésped apropiado. Después de aterrizar en un huésped susceptible, los conidios producen un tubo germinal primario corto que detecta la naturaleza de la superficie (Pérez-García *et al.*, 2009; Martínez-Cruz *et al.*, 2015) terminando en un primer apresorio diferenciado (Fig. 2), que es responsable de la penetración en el huésped (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). Una combinación de estrategias que incluyen una degradación enzimática de la cutícula y pared celular y una alta presión de turgencia generada por el apresorio, permite que una hifa diferenciada a partir del apresorio o hifa de penetración, penetre en la célula epidérmica.

Después de penetrar la pared celular de la célula epidérmica, la hifa de penetración se agranda para producir el cuerpo haustorial (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). A partir de esta estructura, se desarrollan algunas prolongaciones llamadas lóbulos haustoriales (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). Tras el desarrollo de los lóbulos, el cuerpo haustorial se ensancha, provocando la invaginación de la membrana plasmática de la planta, lo que resultará en la membrana extrahaustorial (EHM). La EHM es una modificación de la membrana de la planta, siendo muy diferente de la membrana original en su composición molecular (Hückelhoven y Panstruga, 2011) y estructura, ya que varias proteínas de la membrana del huésped no están presentes en la EHM (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). Sin embargo, el origen de la membrana extrahaustorial sigue siendo incierto y ha dado lugar a dos teorías: i) el origen de la EHM es consecuencia de la alta modificación de la composición de la EHM a lo largo del tiempo por el hongo, o ii) la EHM es consecuencia de una síntesis *de novo* durante el desarrollo del haustorio (Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

La membrana extrahaustorial y la membrana haustorial están selladas en el cuello del cuerpo haustorial por dos

regiones, denominadas bandas del cuello (Wang *et al.*, 2009). Por esta razón, entre la pared haustorial y la EHM hay un espacio compuesto por una materia amorfa, denominada matriz extrahaustorial (EHMx) (Gil y Gay, 1977) que parece ideal para la absorción de nutrientes del huésped por el patógeno (Gil y Gay, 1977). El conjunto del cuerpo haustorial, los lóbulos, EHMx y EHM se denomina el “complejo haustorial” (Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

Una vez establecido el primer haustorio funcional, el micelio epifítico prolifera y produce un apresorio secundario, que dará lugar a un haustorio adicional. Posteriormente, la hifa primaria se ramifica para formar hifas secundarias como estructuras morfológicamente distintas. Después de aproximadamente 5-6 días tras la inoculación, las colonias son visibles a simple vista en la superficie de la hoja y, a partir de entonces, los conidióforos emergen verticalmente para producir grandes masas de conidios que diseminarán el hongo a otras plantas (Fig. 2) (Both *et al.*, 2005).

ASPECTOS GENÉTICOS Y MOLECULARES DE LOS OÍDIOS

En los últimos 15 años, ha habido un aumento en las publicaciones sobre aspectos moleculares de los oídios muy notable. Desde 2001, con la publicación de la primera colección EST de una especie de oídio, ha habido un crecimiento exponencial de publicaciones de carácter molecular (Fig. 3). Uno de los avances que ha facilitado el estudio de los aspectos moleculares de los oídios ha sido la aparición de los nuevos sistemas de secuenciación o tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), cuyo progreso en términos de velocidad, longitud de lectura, número de lecturas y rendimiento, además de la reducción en los costes, han permitido la rápida proliferación de estudios moleculares. Las tecnologías NGS permiten, entre otras aplicaciones, la secuenciación de genomas completos, transcriptomas específicos de célula, RNA-seq, ChIP-seq y metagenómica (Buermans

y Dunnen, 2014). No obstante, pesar del bajo coste y la disponibilidad de las tecnologías NGS, los oídios constituyen

el grupo más grande de patógenos vegetales que permanece aún por caracterizar a nivel genético y molecular.

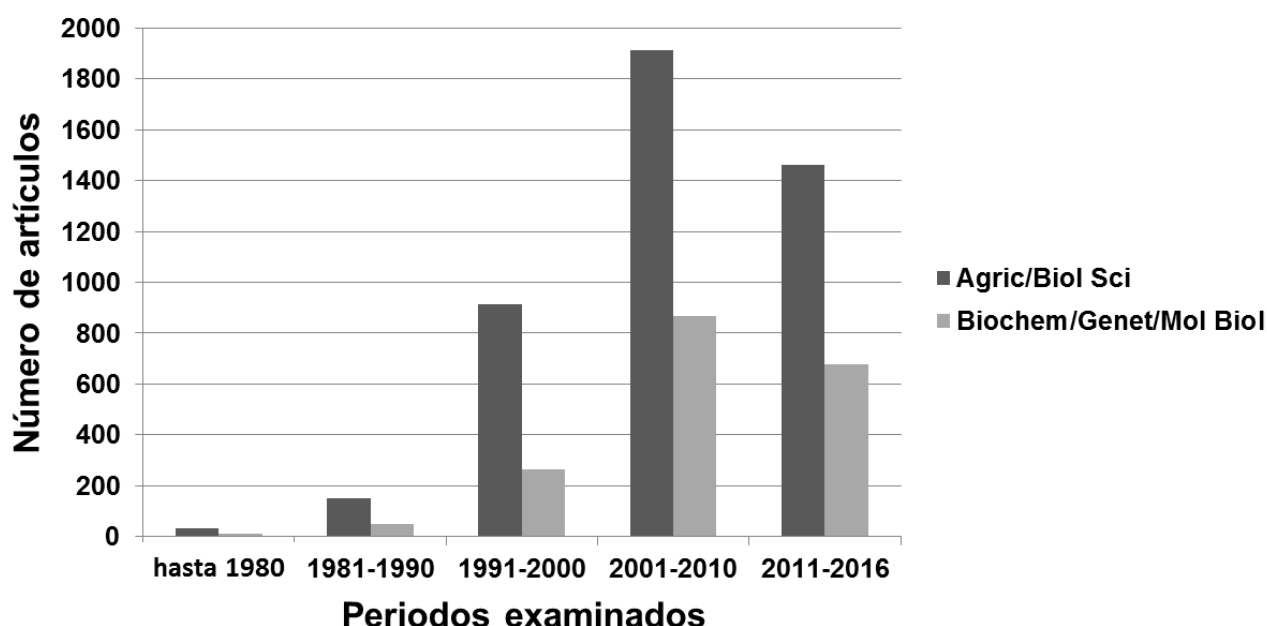


Figura 3. Serie histórica de artículos relacionados con los oídios. Se utilizó la base de datos Scopus (área de Ciencias de la Vida) para el análisis y el término "powdery mildew" se introdujo como parámetro de búsqueda. Se seleccionaron los artículos de investigación originales incluidos en los campos "Agricultura y Ciencias de la Vida" (gris oscuro) y "Bioquímica, Genética y Biología Molecular" (gris suave).

Sin lugar a dudas, la publicación de los primeros genomas de oídio (Spanu *et al.*, 2010) ha marcado un antes y un después en la biología de los oídios. Desde 1996, con la secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996), hasta hoy, hay más de 100 genomas secuenciados de diferentes especies de hongos (Sharma, 2016). Sin embargo, a pesar de que hay más de 820 especies de oídios que causan grandes pérdidas en la cantidad y calidad de los frutos, se sabe muy poco acerca de su genética. Desde 1996, cuando se secuenció el primer genoma de un hongo, no fue hasta 2010 cuando se publicó el primer genoma de una especie de oídio (Spanu *et al.*, 2010). La secuenciación del genoma del oídio de la cebada *B. graminis* f. sp. *hordei* y su comparación con los borradores de genoma del oídio del guisante *Erysiphe pisi* y el oídio de *Arabidopsis Golovinomyces orontii*, reveló aspectos

muy interesantes de la biología de estos patógenos. Uno de estos aspectos fue la constatación de la pérdida de ciertos genes que codifican enzimas de los metabolismos primario y secundario, enzimas responsables del procesado de carbohidratos y transportadores de membrana, lo que probablemente refleja su redundancia para un estilo de vida exclusivamente biotrofo (Spanu *et al.*, 2010).

Una de las características de los genomas de los oídios que suscitó gran interés fue su gran tamaño. El tamaño que mostraban los genomas de las tres especies de oídio analizadas era muy similar entre sí, sin embargo, era varias veces mayor que el genoma de otros hongos e incluso de otros miembros de la misma clase (*Leotiomycetes*), siendo más cercano en tamaño a los genomas de basidiomicetos fitopatógenos muy alejados filogenéticamente. Curiosamente, el tamaño del genoma

de los hongos necrotrofos es de 20-40 Mb, 30-90 Mb en hemibiotrofos y 80-180 Mb en hongos biotrofos obligados. Sin embargo, a pesar del gran tamaño de sus genomas, la densidad génica de estos es muy baja en comparación con otros hongos filamentosos no biotrofos (Bindschedler *et al.*, 2016). Analizando el número de genes, oídios como *B. graminis* f. sp. *hordei*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* o *Erysiphe necator*, presentan aproximadamente 6.500 genes codificantes de proteínas (Pedersen *et al.*, 2012; Wicker *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014). Este número es significativamente menor en comparación con otras especies de hongos filamentosos tales como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* o *Aspergillus niger*, que contienen entre 12.000 y 14.000 genes codificantes de proteínas en sus genomas (Pel *et al.*, 2007; Amselem *et al.*, 2015). Esta diferencia entre el número de genes y el tamaño del genoma de los oídios es causada por la gran acumulación de ADN repetitivo, fundamentalmente debida a la gran cantidad de elementos transponibles (TE) que contienen sus genomas (Wicker *et al.*, 2014; Amselem *et al.*, 2015).

El cambio del milenio marcó la proliferación de estudios de transcriptómica en oídios. En 2001 se realizó la primera aproximación para estudiar el transcriptoma de *B. graminis* f. sp. *hordei* a partir del análisis de marcadores de secuencias expresadas (EST). Para ello, se generaron dos bibliotecas de ADNc a partir de ARN aislado de conidios no germinados y conidios germinados sobre una placa de vidrio. La secuenciación de 2.676 clones seleccionados al azar resultó en 4.908 EST, a partir de las cuales se identificaron 1669 secuencias individuales (Thomas *et al.*, 2001). La mayoría de las secuencias obtenidas mostraron poca o ninguna homología con genes de función conocida. Además, a partir de esas secuencias mostraron que la mayoría de los genes se expresaron en las primeras etapas del desarrollo, lo que sugiere que las primeras etapas de desarrollo del hongo es un

proceso complejo.

Recientemente, se ha secuenciado el transcriptoma epifítico del oídio de las cucurbitáceas *P. xanthii*. Utilizando una plataforma 454 GS FLX, se obtuvieron 676.562 lecturas ensambladas en 39.346 contigs, identificándose 8.798 genes. Como se describió anteriormente para otros oídios, se observó la pérdida de un conjunto similar de genes, lo que podría explicar el estilo de vida como biotrofos obligados de los oídios (Vela-Corcía *et al.*, 2016). Haciendo mención especial a lo expuesto anteriormente sobre el gran número de elementos transponibles en los genomas de los oídios, el transcriptoma epifítico de *P. xanthii* también mostró transcritos derivados de TE como se ha observado previamente en el oídio de la vid *E. necator* (Jones *et al.*, 2014), lo que sugiere que los TE son transcripcionalmente activos en *P. xanthii*.

Centrándonos en los aspectos moleculares involucrados en la interacción hongo-planta, hay un grupo de proteínas secretadas que ha llamado la atención por su papel en la virulencia de estos patógenos fúngicos, son las denominadas proteínas efectoras o efectores. Weßling y colaboradores (2012) llevó a cabo el análisis del transcriptoma de haustorios aislados de *G. orontii*, obteniendo 7.077 contigs. El análisis de los transcritos reveló que los genes codificantes de proteínas con papel en el plegamiento de proteínas, la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y patogénesis fúngica estaban altamente representados en el transcriptoma haustorial. Sorprendentemente, una alta proporción de los transcritos (38%) codificaban proteínas predichas para ser secretadas, incluyendo 70 PEC (proteínas efectoras candidatas) (Tabla 1). Los secretomas de *B. graminis* f. sp. *hordei* y *E. necator* contienen 491 y 150 PEC, respectivamente (Tabla 1). Recientemente, el análisis del secretoma epifítico de *P. xanthii* reveló 138 posibles proteínas secretadas, incluyendo 56 PEC (Tabla 1).

Tabla 1. Datos genómicos, transcriptómicos y proteómicos actualmente disponibles para algunas especies de oídios.

Especie	Hospedador	Genoma			Transcriptoma	Proteoma	Proteínas secretadas/PEC	Referencia
		Tamaño (Mb)	Genes	Proteínas				
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	Cebada	120	7061	6495	Completo	Completo	491/278	Pedersen <i>et al.</i> , 2012
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Trigo	180	6538	6525	-	-	602/-	Wicket <i>et al.</i> , 2013
<i>Erysiphe pisi</i>	Guisante	151	-	-	Conidia	-	-	
<i>Erysiphe necator</i>	Viña	126	6533	6482	Conidia y micelio	-	607/150	Jones <i>et al.</i> , 2014
<i>Golovinomyces orontii</i>	<i>Arabidopsis</i>	160	-	-	Haustorio	-	157/70	Webbing <i>et al.</i> , 2011
<i>Podosphaera xanthii</i>	Cucurbitáceas	-	-	-	Conidia y micelio	-	138/54	Vela-Corcia, 2014

EFFECTORES: MODERADORES EN EL DIÁLOGO PATÓGENO-PLANTA

Para mantener una estrecha relación con el huésped a través del haustorio, el patógeno tiene que manipular los mecanismos de defensa de la planta para evitar su reconocimiento, modulando así las respuestas defensivas de la misma. Para ello, estos patógenos se sirven de una amplia batería de proteínas relacionadas con la virulencia denominadas efectores (Pennington *et al.*, 2016).

Los efectores se definen como proteínas secretadas por el patógeno que alteran la estructura de la fisiología de la célula huésped, modulan la respuesta de defensa de la planta y protegen la integridad fúngica para permitir la colonización y proliferación (Pedersen *et al.*, 2012). En el caso de los oídios, se han descrito una serie de características generales comunes entre las proteínas efectoras candidatas (PEC). En términos de tamaño, la mayoría de las PEC descritas en *B. graminis* f. sp. *hordei* codifican principalmente pequeñas proteínas secretadas con un tamaño de menos de 300 aminoácidos (Pedersen *et al.*, 2012). Una característica inherente de ser proteínas secretadas es que la cantidad de residuos de cisteína que poseen las PEC es significativamente

mayor que la observada en proteínas no PEC. Esto se debe a que las cisteínas pueden formar puentes disulfuro entre sí, lo que proporcionaría protección contra las proteasas del huésped (Hacquard *et al.*, 2012). En relación a su capacidad de ser secretadas, un motivo común, Y/F/WxC, fue identificado entre 107 PEC de una librería de ADNc haustorial de *B. graminis* f. sp. *hordei* (Godfrey *et al.*, 2010). Se sugirió que este motivo era responsable de la translocación de los efectores a la célula vegetal como ocurre con los efectores de oomicetos, los cuales presentan dos clases de secuencias consenso, RxLR y LxFLAK, importantes para la translocación de proteínas en las células huésped (Schmidt *et al.*, 2014).

Los efectores se agrupan según su localización en efectores apoplásticos o citoplasmáticos (Pedersen *et al.*, 2012). Dentro de los de localización citoplasmática, los efectores pueden tener destinos muy diferentes, como localización nuclear, membrana plasmática o retículo endoplásmico, entre otros (Stergiopoulos y de Wit, 2009). Tan diversa es su localización en la célula huésped como es su papel en la interacción planta-patógeno. Hasta la fecha, los efectores han estado involucrados en la modulación de las respuestas de defensa de las plantas, la manipulación del metabolismo de

las plantas y la remodelación de la célula huésped (Pliego *et al.*, 2013; Pennington *et al.*, 2016).

¿CÓMO ABORDAR EL ESTUDIO DE LOS EFECTORES DE OÍDIOS?

Debido al estilo de vida de los oídios como biotrofos obligados, su estudio en la práctica es realmente complicado y su manipulación genética resulta difícil (Micali *et al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado metodologías alternativas para llevar a cabo la identificación y análisis de genes de efectores candidatos de oídios, que permiten superar la problemática impuesta por su peculiar estilo de vida. Una de las estrategias para el estudio de los efectores es la manipulación genética. En otras especies de hongos filamentosos, se han desarrollado y empleado diferentes técnicas de transformación, resultando en fenómenos de transformación estables (Jiang *et al.*, 2013). Los métodos de transformación de hongos filamentosos incluyen la transformación de protoplastos mediante polietilenglicol (PEG), el bombardeo de partículas, la electroporación, la transformación vírica y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (Michielse *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013; Martínez-Cruz *et al.*, 2016).

La transformación de protoplastos mediante PEG no puede aplicarse a los oídios ya que requiere la degradación de la pared celular y la posterior regeneración de la misma en medio artificial. Debido a su estilo de vida, los oídios no crecen en medios artificiales y no pueden regenerar su pared celular sobre la superficie de la hoja. La biobalística fue empleada por primera vez para transformar *B. graminis* f. sp. *hordei*, obteniendo transformantes que expresaban el gen de la β -galactosidasa (Christiansen *et al.*, 1995; Chaure *et al.*, 2000). Sin embargo, este método ha resultado poco reproducible y con una aplicabilidad muy limitada. Otro método empleado ha sido la electroporación de conidios de *P. xanthii*. Sin embargo, este método ha dado resultados similares a los

obtenidos con la biobalística, además de resultar un método demasiado agresivo con las esporas (Vela-Corcía *et al.*, 2015).

En las dos últimas décadas, después de la publicación de de Groot y colaboradores (1998), ha ganado gran interés un nuevo método de transformación de hongos filamentosos basado en el uso de *A. tumefaciens*. El denominado sistema de transformación mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) se ha aplicado con éxito para la transformación de muchas especies de hongos ya que tiene una ventaja sobre otros métodos, *A. tumefaciens* puede transformar fácilmente hongos a través de recombinación no homóloga e inserción del T-ADN en sitios al azar (Michielse *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013). Recientemente llevamos a cabo el uso de *A. tumefaciens* como vector para introducir construcciones en conidios de *P. xanthii*. Nuestros resultados proporcionan una fuerte evidencia de que el sistema ATMT es un método inofensivo y reproducible que puede superar las limitaciones técnicas de otras aproximaciones que dificultan la transformación de *P. xanthii*. Mediante este método se han obtenido colonias resistentes a higromicina B y carbendacima, las cuales mostraban además la expresión de GFP (Martínez-Cruz *et al.*, 2016). Hasta la fecha se ha empleado la expresión transitoria de genes de efectores candidatos en una única célula epidérmica de hoja usando bombardeo con partículas para la localización de efectores *in planta* (Schmidt *et al.*, 2014). Sin embargo, este sistema presenta varios inconvenientes entre los que destaca la identificación de falsas localizaciones de efectores. Por lo tanto, el sistema de transformación desarrollado para *P. xanthii* abre una nueva ruta para el estudio de la secreción y localización de efectores en oídios puesto que se trata de una herramienta rápida, reproducible y fiable para la expresión de una o más construcciones (Martínez-Cruz *et al.*, 2016).

A pesar de haberse puesto a punto un método de transformación de conidios de *P. xanthii* mediante *A. tumefaciens*, debido al

estilo de vida como biotrofos obligados que impide diferenciar la patogénesis del crecimiento en el huésped, la manipulación genética de los oídios presenta ciertas limitaciones, por ejemplo, la construcción de mutantes, por lo que se han desarrollado métodos indirectos para el estudio de los efectores. Una de los aspectos más importantes del estudio de los efectores es la identificación de las interacciones proteína-proteína. Para ello se emplean los sistemas de “pull-down” y de doble híbrido en levadura (Y2H). Estos sistemas son importantes herramientas para el estudio de la interacción efector-proteína huésped *in vitro*. En el sistema “pull-down”, la proteína de interés (en este caso el efector candidato), llamada «cebo», se marca e inmoviliza por afinidad a un soporte que contiene un ligando específico para la marca. Este soporte que contiene la proteína cebo se incuba a continuación con una fuente de proteínas del huésped, denominada «presa», tal como un lisado celular. De este modo, las posibles interacciones proteicas pueden ser identificadas posteriormente (Kool *et al.*, 2011). Estos resultados se plantean como un enfoque inicial para la identificación previa de interacciones proteína-proteína desconocidas, que posteriormente son confirmados por el sistema Y2H (Pennington *et al.*, 2016). El sistema Y2H permiten la detección de interacciones entre proteínas, cebo (por ejemplo, efector) y presa (por ejemplo, proteína del huésped), en células de levadura vivas, activando genes indicadores que permiten el crecimiento en medios específicos o una producción de color (Pennington *et al.*, 2016). Finalmente, se requiere la confirmación de las interacciones proteína-proteína en el propio huésped. Para ello, se recurre a la técnica denominada complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC). Este método se basa en la fusión separada de dos dominios de una proteína fluorescente (por ejemplo, YFP) a dos proteínas de interés (por ejemplo, un efector fúngico y una proteína del huésped). La interacción

de las proteínas en estudio permite el acercamiento de las dos dominios de la proteína fluorescente, permitiendo la restauración completa del fluoróforo y, por tanto, la visualización de la fluorescencia (Ahmed *et al.*, 2015). A través de este sistema, se confirman las interacciones efector-proteína huésped obtenidas por “pull-down” o el sistema Y2H (Schmidt *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015).

Actualmente, el sistema denominado silenciamiento génico inducido por el hospedador (HIGS) ha surgido como una herramienta eficaz para caracterizar la participación de un efector candidato en el establecimiento de la enfermedad causada hongos biotrofos obligados (Yin *et al.*, 2015). Este método se basa en la estrecha relación que el patógeno mantiene con su huésped y en la capacidad del patógeno para tomar ARN bicatenario (ARNds) o pequeños ARN interferentes (ARNsi) a través de las estructuras de absorción de nutrientes (haustorio en el caso de los oídios) y el posterior silenciamiento del gen, aunque el mecanismo preciso por el cual este proceso tiene lugar es aún desconocido. En cuanto a los oídios, se ha empleado el sistema HIGS para el análisis funcional de genes de efectores candidatos de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* durante el establecimiento de la enfermedad (Pliego *et al.*, 2013). Pliego y colaboradores (2013) analizaron cincuenta efectores candidatos de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* por el sistema HIGS, de los cuales ocho fueron identificados por contribuir al establecimiento de la infección (Pliego *et al.*, 2013).

Hasta ahora, el método utilizado para la introducción de construcciones de silenciamiento en células vegetales ha sido el bombardeo de partículas (Pliego *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2015). Este método tiene varias desventajas tales como el alto coste del equipo y los materiales, la baja eficiencia de transformación, el daño a las células vegetales y la dispersión de

las células transformadas (Hardwood *et al.*, 2009). Recientemente, hemos sustituido el sistema de biolística por un método más natural y menos agresivo con la planta que emplea *A. tumefaciens*, denominado ATM-HIGS. El uso de *A. tumefaciens* para la transformación de células vegetales mejora los resultados obtenidos por el sistema HIGS tradicional y permite obtener «islas» de células transformadas en lugar de células aisladas, y es un sistema altamente eficiente y más barato (Hardwood *et al.*, 2009). Además, esta herramienta presenta una ventaja muy importante para el estudio de los efectores, la posibilidad de estudiar la evolución de la respuesta de la planta durante el crecimiento de una colonia. Mediante este sistema, se ha llevado a cabo el silenciamiento en cotiledones de melón de 8 posibles efectores de *P. xanthii*, analizándose el crecimiento del hongo y la respuesta de defensa de la planta en los estadios iniciales de desarrollo de la

enfermedad. Para ello se llevó a cabo la tinción de discos de melón con 3,3' diaminobencidina (DAB), un compuesto que al reaccionar con H₂O₂ forma precipitados marrones en las células vegetales. A partir de discos teñidos con DAB se llevó a cabo el recuento de puntos de penetración que se muestran como puntos densamente teñidos y la cuantificación de células vegetales con H₂O₂. Tras el silenciamiento y análisis de los 8 posibles efectores, se identificaron los primeros 7 verdaderos efectores de *P. xanthii*. Además, el sistema ATM-HIGS, a diferencia de métodos anteriores, nos ha permitido estudiar la evolución en el tiempo del silenciamiento de los efectores, observándose que el silenciamiento repercute de distinta forma en la respuesta de la planta y en el crecimiento del hongo según el efector y obteniéndose 4 tipos de respuestas estadísticamente diferentes: respuesta nula, respuesta baja, respuesta intermedia y respuesta alta (Fig. 4).

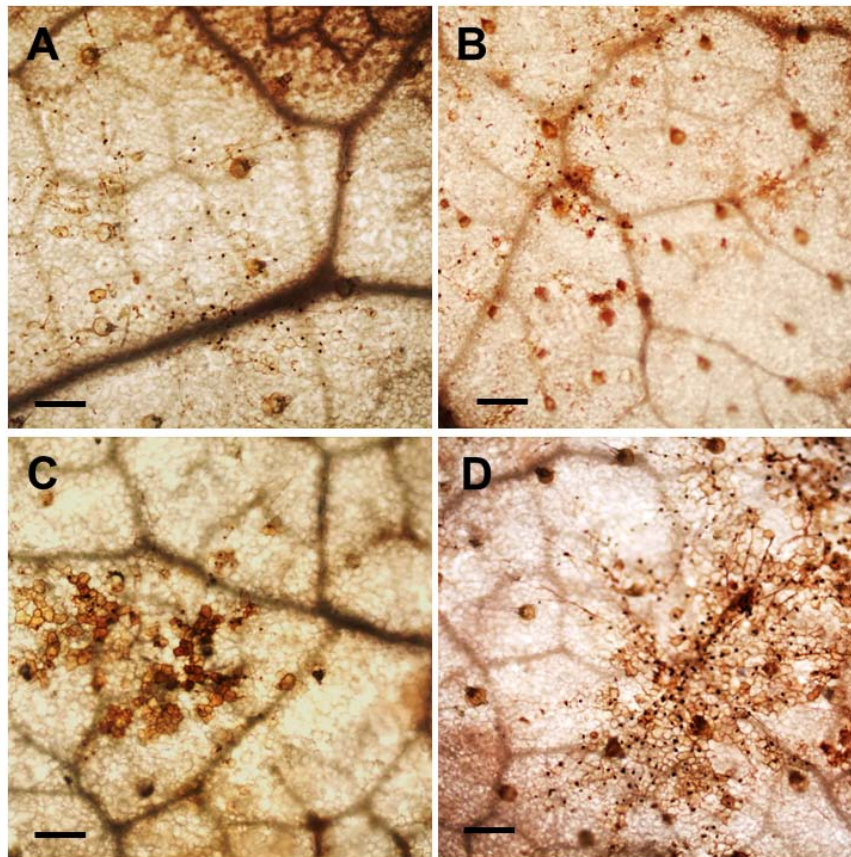


Figura 4. Análisis funcional de efectores candidatos de oídios. Detección histoquímica de peróxido de hidrógeno acumulado en células epidérmicas de cotiledones de melón tras el silenciamiento génico de varios PEC de *P. xanthii* mediante el sistema ATM-HIGS. Se presentan diferentes respuestas de defensa de la planta según el efector silenciado: respuesta nula (A), respuesta baja (B), respuesta intermedia (C), respuesta alta (D). Las imágenes fueron tomadas a las 72 hpi. Barras de escala: 200 μ m.

ANÁLISIS Y PREDICCIONES BIOINFORMÁTICAS

El análisis *in vivo* de los efectores proporciona información muy importante sobre la función que el posible efector desempeña. Sin embargo, en muchos casos, la información obtenida es muy limitada e insuficiente. Además, la falta de genes de oídio anotados en las bases de datos agrava el problema. En el caso de los PEC, una de las problemáticas que presentan la mayoría de los efectores es que sus secuencias no suelen presentar homología con ninguna proteína de función conocida. Además, los dominios ampliamente conservados entre las diferentes especies de hongos filamentosos no arrojan ninguna información en el caso de las PEC. Sin embargo, en los últimos años, las herramientas computacionales de análisis y predicción de funciones han ganado fuerza, permitiendo dar respuesta a preguntas que aún no han sido resueltas (Abe *et al.*, 2008). Por ello, para abordar el estudio completo de la función que podrían desempeñar los efectores candidatos hemos llevado a cabo complejos análisis informáticos basados en el uso de diferentes paquetes de software. El estudio de los efectores de los oídios es complejo, por lo que su análisis debe ser complejo también. Por lo tanto, hemos trazado un flujo de trabajo para el estudio de efectores candidatos basados en la suma de los resultados obtenidos de ensayos *in vivo* (silenciamiento y localización) y análisis informáticos (modelado, predicción de función y ligandos), obteniendo de esta manera predicciones muy fiables para proteínas desconocidas.

El conjunto de todos los resultados obtenidos nos lleva a obtener una idea más clara de la funcionalidad que puede tener un efector candidato y, por lo tanto, diseñar el ensayo *in vitro* apropiado para probar la actividad de la proteína efectora candidata. En el caso de los 7 primeros

efectores identificados de *P. xanthii*, a partir de las predicciones realizadas sobre los modelos proteicos de estos efectores, hemos identificado 7 posibles funciones diferentes: un modulador del tráfico de vesículas, una metiltransferasa, un factor de transcripción, una cerato-platanina, un modulador de la membrana plasmática del huésped y una α -manosidasa. Estas primeras indicaciones del posible papel de los efectores nos dan pistas del posible papel que desempeñan estas proteínas en las interacciones patógeno-planta y qué ensayos debemos llevar a cabo para proceder a su validación experimental.

CONCLUSIONES

Los oídios han sido unos patógenos tradicionalmente difíciles de estudiar, por tanto, el estudio de los efectores de este grupo de patógenos supone un reto para los investigadores y, a la vez, la clave principal para comprender las bases moleculares de la interacción hongo-planta. En la actualidad, con el aumento del número de genomas y transcriptomas de oídios disponibles, la identificación de nuevos efectores candidatos experimentará un aumento considerable, así como el número de efectores con participación en el establecimiento de la enfermedad. Además, la puesta a punto de nuevas herramientas para la manipulación genética de los oídios, así como las técnicas indirectas desarrolladas para el estudio de los efectores, han supuesto un importante salto a la hora de abordar el estudio de las bases moleculares de la interacción oídio-planta. El sistema HIGS ha resultado ser la herramienta más fiable para la identificación de efectores verdaderos y la transformación genética mediante *A. tumefaciens* se presenta como la principal herramienta para la expresión de fusiones traduccionales que permitan, por ejemplo, la localización de efectores. Estas técnicas, junto con la creciente fiabilidad de las predicciones informáticas, permitirán el análisis funcional de los efectores candidatos

para identificar aquéllos que tengan un papel clave en el establecimiento de la enfermedad. La identificación de estas nuevas dianas será el primer paso para el desarrollo de nuevas herramientas de fitoprotección contra los oídios.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo pasado y en curso a su línea de trabajo sobre oídio de cucurbitáceas al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España (AGL2007-65340; AGL2010-21848; AGL2013-41939; AGL2016-76216), cofinanciada con fondos FEDER (Unión Europea).

Referencias

- Abe, T., Kanaya, S., Uehara, H. and Ikemura, T. 2009. A novel bioinformatics strategy for function prediction of poorly-characterized protein genes obtained from metagenome analysis. *DNA Res.* **16**: 287-297.
- Ahmed, A.A., Pedersen, C., Schultz-Larsen, T., Kwaaitaal, M., Jørgensen, H.J. and Thordal-Christensen, H. 2015. The barley powdery mildew candidate secreted effector protein CSEP0105 inhibits the chaperone activity of a small heat shock protein. *Plant Physiol.* **168**: 321-333.
- Amselem, J., Vigouroux, M., Oberhaensli, S., Brown, J.K.M., Bindschedler, L.V., Skamnioti, P., Wicker, T., Spanu, P.D., Quesneville, H. and Sacristán, S. 2015. Evolution of the *EKA* family of powdery mildew avirulence-effector genes from the ORF 1 of a LINE retrotransposon. *BMC Genomics.* **16**: 917.
- Bindschedler, L.V., Panstruga, R. and Spanu, P.D. 2016. Mildew-omics: How global analyses aid the understanding of life and evolution of powdery mildew. *Front. Plant Sci.* **7**: 123.
- Both, M., Eckert, S.E., Csukai, M., Müller, E., Dimopoulos, G. and Spanu, P. 2005. Transcript profiles of *Blumeria graminis* development during infection reveal a cluster of genes that are potential virulence determinants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 125-133.
- Braun, U. and Cook, R.T. 2012. Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildew). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centr. Pp. 707.
- Buermans, H.P.J. and den Dunnen, J.T. 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta.* **1842**: 1932-1941.
- Chaure, P., Gurr, S.J. and Spanu, P. 2000. Stable transformation of *Erysiphe graminis* an obligate biotrophic pathogen of barley. *Nat. Biotechnol.* **18**: 205-207.
- Christiansen, S.K., Knudsen, S. and Giese, H. 1995. Biolistic transformation of the obligate plant pathogenic fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Curr. Genet.* **29**: 100-102.
- Gil, F. and Gay, J.L. 1977. Ultrastructural and physiological properties of the host interfacial components of haustoria of *Erysiphe pisi* in vivo and in vitro. *Physiol. Plant Pathol.* **10**: 1-12.
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J. and Thordal-Christensen, H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics.* **11**: 317.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**: 563-567.
- de Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J. and Beijersbergen, A.G. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* **16**: 839-842.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey,

- P., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R.C. and Duplessis, S. 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**: 279-293.
- Hückelhoven, R. and Panstruga, R. 2011. Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 738-746.
- Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K.Q. and Yang, J. 2013. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. *Biotechnol. Adv.* **31**: 1562-1574.
- Jones, L., Riaz, S., Morales-Cruz, A., Amrine, K.C.H., McGruire, B., Gubler, W.D., Walker, M.A. and Cantu, D. 2014. Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. *BMC Genomics.* **15**: 1081.
- Kool, J., Jonker, N., Irth, H. and Niessen, W.M.A. 2011. Studying protein-protein affinity and immobilized ligand-protein affinity interactions using MS-based methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **40**: 1109-1125.
- Martínez-Cruz, J., Romero, D., Dávila, J.C. and Pérez-García, A. 2014. The *Podosphaera xanthii* haustorium, the fungal Trojan horse of cucurbit-powdery mildew interactions. *Fungal Genet. Biol.* **71**: 21-31.
- Martínez-Cruz, J., Romero, D., de Vicente, A. and Pérez-García, A. 2016. Transformation of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *New Phytol.* **213**: 1961-1973.
- Micali, C., Göllner, K., Humphry, M., Consonni, C. and Panstruga, R. 2008. The powdery mildew disease of *Arabidopsis*: A paradigm for the interaction between plants and biotrophic fungi. *The Arabidopsis book.* **6**: e0115.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J., van den Hondel, C.A. and Ram, A.F. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nat. Protoc.* **3**: 1671-1678.
- Pedersen, C., Ver Loren van Themaat, E., McGuffin, L.J., Abbott, J.C., Burgis, T.A., Barton, G., Bindschedler, L.V., Lu, X., Maekawa, T., Weßling, R., Cramer, R., Thordal-Christensen, H., Panstruga, R. and Spanu, P.D. 2012. Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics.* **13**: 694.
- Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E., van der Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X. et al. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell Factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* **25**: 221-231.
- Pennington, H.G., Gheorghe, D.M., Damerum, A., Pliego, C., Spanu, P.D., Cramer, R. and Bindschedler, L.V. 2016. Interactions between the powdery mildew effector BEC1054 and barley proteins identify candidate host targets. *J. Proteome Res.* **15**: 826-839.
- Pérez-García, A., Romero, D., Fernandez-Ortuño, D., López-Ruiz, F.J., de Vicente, A. and Torés, J.A. 2009. The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. *Mol. Plant. Pathol.* **10**: 153-160.
- Pliego, C., Nowara, D., Bonciani, G., Gheorghe, D. M., Xu, R., Surana, P., Whigham, E., Nettleton, D., Bogdanove, A. J., Wise, R. P., Schweizer, P., Bindschedler, L. V. and Spanu, P. D.

2013. Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonucleases-like effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* **26**: 633-642.
- Schmidt, S.M., Kuhn, H., Micali, C., Liller, C., Kwaaitaal, M. and Panstruga, R. 2014. Interaction of a *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* effector candidate with a barley ARF-GAP suggests that host vesicle trafficking is a fungal pathogenicity target. *Mol. Plant Pathol.* **15**: 535-549.
- Sharma, K.K. 2015. Fungal genome sequencing: basic biology to biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**: 743-759.
- Spanu, P.D., Abbott, J.C., Amselem, J., Burgis, T.A., Soanes, D.M., Stüber, K., Ver Loren van Themaat, E., Brown, J.K., Butcher, S.A., Gurr, S.J. *et al.* 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science.* **330**: 1543-1546.
- Stergiopoulos, I. and de Wit, P.J. 2009. Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**: 233-263.
- Thomas, S.W., Rasmussen, S.W., Glaring, M.A., Rouster, J.A., Christiansen, S.K. and Oliver, R.P. 2001. Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence Tag analysis. *Fungal Genet. Biol.* **33**: 195-211.
- Vela-Corcía, D., Romero, D., Torés, J.A., de Vicente, A. and Pérez-García, A. 2015. Transient transformation of *Podosphaera xanthii* by electroporation of conidia. *BMC Microbiol.* **15**: 20.a
- Vela-Corcía, D., Bautista, R., de Vicente, A., Spanu, P.D. and Pérez-García, A. 2016. *De novo* analysis of the epiphytic transcriptome of the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera xanthii* and identification of candidate secreted effector proteins. *PLoS One.* **11**: e0163379.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Somerville, C.R. and Somerville, S.C. 2004. Mutations in *PMR5* result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant J.* **40**: 968-978.
- Weßling, R., Schmidt, S.M., Micali, C.O., Knaust, F., Reinhardt, R., Neumann, U., van Themaat, E.V.L. and Panstruga, R. 2012. Transcriptome analysis of enriched *Golovinomyces orontii* haustoria by deep 454 pyrosequencing. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 470-482.
- Wicker, T., Oberhaensli, S., Parlange, F., Buchmann, J.P., Shatalina, M., Roffler, S., Ben-David, R., Doležal, J., Šimková, H., Schulze-Lefert, P., Spanu, P.D., Bruggmann, R., Amselem, J., Quesneville, H., Ver Loren van Themaat, E., Paape, T., Shimizu, K.K. and Keller, B. 2013. The wheat powdery mildew genome shows the unique evolution of an obligate biotroph. *Nat. Genet.* **45**: 1092-1098.
- Yin, C., Downey, S.I., Klages-Mundt, N.L., Ramachandran, S., Chen, X., Szabo, L.J., Pumphrey, M. and Hulbert S.H. 2015. Identification of promising host-induced silencing targets among genes preferentially transcribed in haustoria of *Puccinia*. *BMC Genomics.* **16**: 579.
- Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A. and Romero, D. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melón phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.* **16**: 2196-2211.

EL RÉGIMEN DE LUZ REGULA LA PATOGÉNESIS EN *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

Santamaría-Hernando, S.¹, del Río Álvarez, I.¹, Rodríguez-Hervá, J.J.^{1,2}, López-Solanilla, E.^{1,2}

1. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Campus Montegancedo UPM. 28223-Pozuelo de Alarcón (Madrid), Spain.

2. Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, UPM, 28040-Madrid, Spain.

Trabajo galardonado con Accedit SEF para COMUNICACIONES ORALES en el XVIII Congreso SEF celebrado en Palencia en septiembre de 2016

Las enfermedades bacterianas de las plantas se producen en todos los ambientes, especialmente en lugares húmedos y cálidos, y afectan a todo tipo de plantas. La ocurrencia de enfermedades bacterianas en los cultivos es dramática y causa importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Bajo condiciones ambientales favorables, estas enfermedades pueden ser extremadamente destructivas limitando la producción, destruyendo los rendimientos en postcosecha y promoviendo el crecimiento de organismos patógenos (1).

Las bacterias patógenas se desarrollan principalmente en la planta huésped como parásitos, en la superficie de la planta como epífitas, y en los desechos vegetales o en el suelo como saprofitas (1). La patogenicidad y la virulencia varían según el género bacteriano. Además, basándose en el ciclo de vida durante la infección y en los síntomas producidos, se pueden describir diferentes “estilos patogénicos”. A pesar de la variabilidad en el estilo patogénico, todas las

bacterias fitopatógenas viven fuera de la planta sin causar enfermedad hasta que son capaces de entrar en la planta a través de heridas o aberturas naturales. Una vez dentro, activan mecanismos de resistencia para hacer frente a las condiciones desfavorables que encuentran en el interior del huésped. A continuación, activan mecanismos de virulencia, que son los responsables de la aparición de los síntomas. Por lo tanto, la supervivencia bacteriana en la fitosfera, las semillas, el suelo, los residuos de materiales y cultivos o el agua es crítica y determina la propagación y la aparición de la enfermedad. Las estrategias disponibles para el manejo de enfermedades bacterianas comprenden prácticas integradas para minimizar la aparición de la enfermedad, que en muchos casos involucra la destrucción de las plantas. Estas estrategias podrían incluir el uso de bactericidas en situaciones concretas en las que la enfermedad este favorecida, para restringir la propagación del patógeno o prevenir el inicio de la infección. Sin embargo, este enfoque es difícil

ya que el número de sustancias activas aprobadas por la Comisión Europea con actividad bactericida es extremadamente reducido (Reglamento (CE) nº 1107/2009). Esta nueva regulación evita el uso de productos con efectos nocivos para el medio ambiente como los antibióticos. Este escenario hace esencial ampliar el conocimiento sobre las etapas vulnerables en el ciclo de vida del patógeno con el fin de desarrollar estrategias alternativas para prevenir o restringir la enfermedad bacteriana.

Para todas las bacterias patógenas vegetales, como para todo organismo vivo, un aspecto clave durante su ciclo de vida es la capacidad de adaptarse al entorno cambiante en el que viven. Para ello, las bacterias poseen mecanismos para detectar cambios en la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes o la luz, entre otros, y elaborar una respuesta óptima en esas condiciones. El éxito de esta respuesta se basa en la capacidad de detectar señales (químicas y físicas) y reprogramar la expresión génica para promover o inhibir un determinado producto génico, lo que a su vez contribuirá a afrontar estas nuevas condiciones favorables / desfavorables. Durante su vida en la filosfera, las bacterias presentan adaptaciones específicas a un ambiente caracterizado por la limitación de nutrientes, la disponibilidad fluctuante de agua, la exposición a la radiación ultravioleta o la presencia de compuestos antimicrobianos producidos por plantas u otros microorganismos (31).

Desde principios de los años ochenta, se han utilizado varias cepas del patógeno bacteriano *P. syringae* como modelo para comprender las interacciones planta-bacteria. En 1991, se reportó que *P. syringae* pv. tomato DC3000 (PsPto), el agente causal de la mancha bacteriana de tomate, era capaz de infectar la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Debido a este hallazgo, PsPto se convirtió en

un modelo para la comprensión de las interacciones planta-bacteria en las décadas posteriores (33).

PsPto sobrevive como saprofita en desechos de la planta, en el suelo y en la superficie de la hoja, y es dispersado mediante la lluvia y los aerosoles. Los síntomas de la mancha bacteriana del tomate son manchas marrones-rojizas rodeadas de un halo clorótico en las hojas, manchas superficiales de color oscuro en la fruta y motas verdes rodeadas por una zona de la maduración retrasada en la fruta madura (23). Todo esto reduce enormemente el valor del tomate en el mercado.

El crecimiento epifito es un componente clave en el ciclo de vida de *P. syringae*. El éxito de un epifito reside en funciones como la adhesión, quimiotaxis, formación de microcolonias, absorción de nutrientes, antibiosis y resistencia a estrés UV (23). Por otra parte, se ha demostrado que la motilidad en *P. syringae* está regulada por mecanismos de “quorum sensing” durante la etapa epifita (25) y que además está asistida por quimiotaxis hacia nutrientes o moléculas vegetales (11). Eventualmente, *P. syringae* entra en el interior de la hoja donde se multiplica explotando células vivas del huésped asistida por el Sistema de Secreción de Tipo III (T3SS), que inyecta proteínas efectoras (T3E) en las células de la planta. En patógenos de plantas, el T3SS se denomina comúnmente sistema de respuesta hipersensible y de patogenicidad (Hrp), ya que los mutantes de secreción pierden su capacidad para inducir la respuesta hipersensible asociada a la defensa en plantas no hospedadoras, y de crecer parasíticamente o ser patogénicos en plantas huésped (2). Las T3Es logran la supresión de la inmunidad, usando diversas estrategias que incluyen interferencia con la señalización iniciada por el reconocimiento mediado por receptores, bloqueo de las vías del ARN y

del tráfico vesicular (8, 14, 23). Las T3E también pueden alterar la función de ciertos orgánulos, como el cloroplasto y la mitocondria (7, 28). A su vez, las plantas han evolucionado para reconocer estas proteínas efectoras (16). Además del T3SS, muchas cepas de *P. syringae* producen fitotoxinas que inducen clorosis o necrosis. La coronatina es una fitotoxina inductora de clorosis producida por varios patovares de *P. syringae* (incluido pv tomato). La coronatina contribuye al crecimiento bacteriano, a la formación de lesiones y a la expansión en la planta huésped (10), pero también altera el cierre estomático (20). Otros factores que contribuyen a la virulencia de *P. syringae* son la producción de exopolisacáridos (EPS) como el alginato (34) y la producción de fitohormonas como la auxina ácido indol-3-acético (13).

Las bacterias habitan la filosfera, donde están altamente expuestas a la luz, entre otros factores ambientales. La luz y el ciclo circadiano regulan los mecanismos de defensa en las plantas (6, 17, 27, 32). Los patógenos de las plantas pueden haber evolucionado para detectar condiciones de luz asociadas con diferentes niveles de resistencia de las plantas. De hecho, las bacterias poseen mecanismos para la detección de la luz, que les permiten cambiar el comportamiento motil (fototaxis) y otros procesos fisiológicos para la adaptación al medio ambiente (3, 24). El efecto de la luz ha sido ampliamente estudiado en bacterias fototróficas y sólo recientemente se ha examinado en las bacterias no-fototróficas (12), lo que sugiere que el uso de la luz como fuente de información podría ser una ventaja evolutiva. Una de las explicaciones razonables a considerar es que esta capacidad para detectar la luz tiene una ventaja en el desarrollo de un programa de protección contra ciertas longitudes de onda de luz nocivas. Sin embargo,

las revisiones recientes han puesto de manifiesto que en muchas bacterias, la luz gobierna otras decisiones importantes en su estilo de vida (15). Los dominios bacterianos implicados en la percepción de luz incluyen: (i) el módulo de detección de luz azul de tipo LOV (luz, oxígeno, voltaje), perteneciente a la familia de dominios PAS (Per-Arnt-Sim), BLUF (detección de luz azul utilizando FAD), PYP (proteína amarilla fotoactiva) y la familia de los criptocromos/fotoliasas; (ii) proteorodopsinas; y (iii) los bacteriofitocromos que detectan luz roja. El control de la expresión génica inducido por la luz implica una amplia gama de mecanismos reguladores asociados con otras respuestas de estrés (12). Aunque las propiedades fotoquímicas de diferentes tipos de fotorreceptores han sido analizadas en algunos patógenos animales y vegetales (4, 5, 19, 22, 29, 30), el papel putativo de estas proteínas en la regulación de la virulencia sigue siendo poco conocido. Trabajos recientes muestran la implicación de proteínas fotosensoras en el control de respuestas adaptativas en *Agrobacterium tumefaciens* (21), *Rhizobium leguminosarum* (9) y *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (18).

Recientemente, en nuestro laboratorio, hemos analizado la presencia de fotorreceptores de luz azul y roja en un grupo de *Pseudomonas* (26). Los resultados muestran que la presencia de proteínas LOV asociadas a la percepción de luz azul se encuentran principalmente en bacterias patógenas de plantas asociadas a una localización foliar. Mientras que otras bacterias no fitopatógenas, a pesar de poder encontrarse asociadas a las mismas, no poseen este tipo de proteínas. Sin embargo los fotorreceptores tipo fitocromos se encuentran ampliamente distribuidos entre distintos tipos de fitopatógenas y otras *Pseudomonas* (Figura 1).

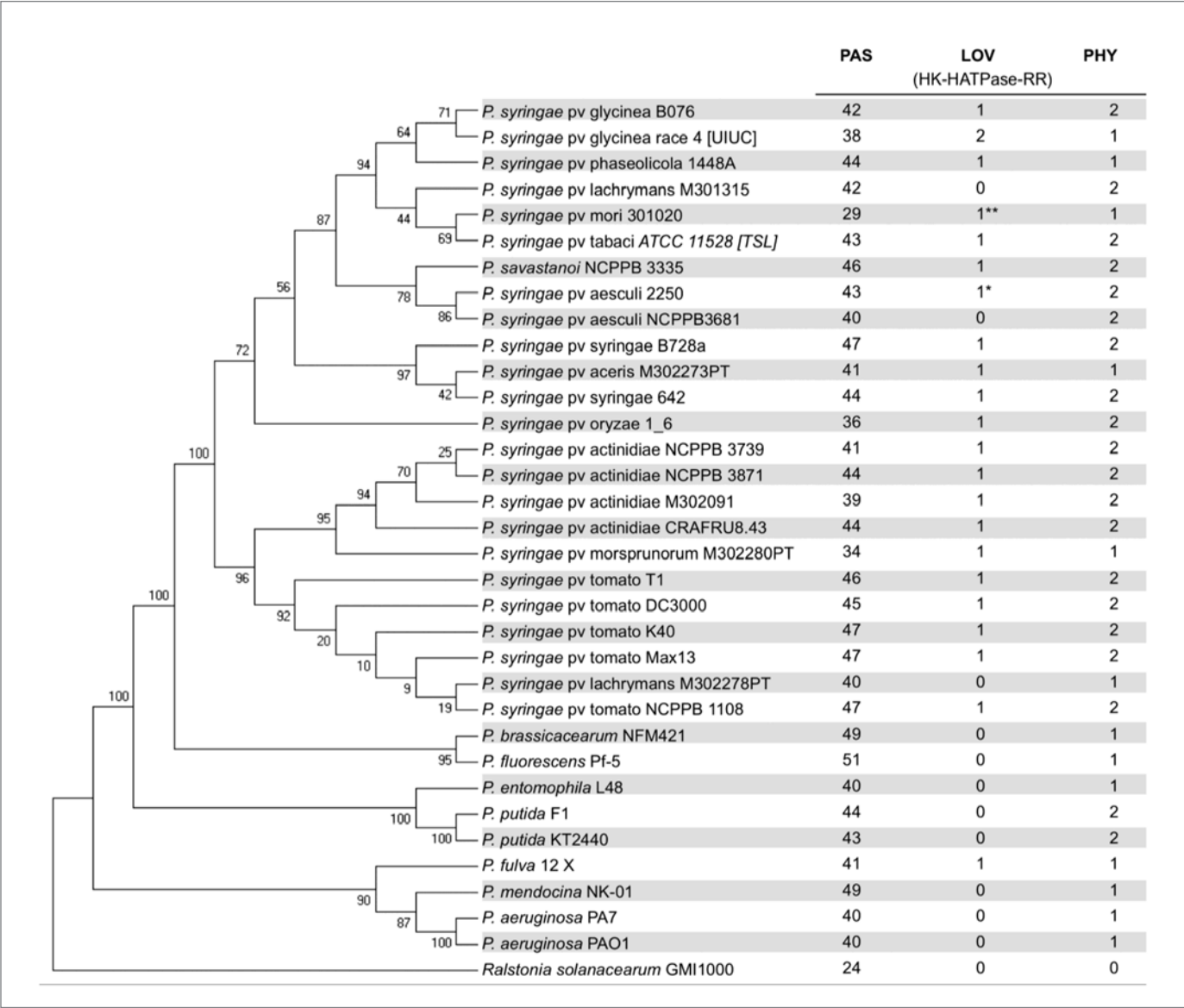


Figura 1. Presencia de proteínas fotosensoras en cepas de Pseudomonas. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Similitud basado en el modelo JTT. Bootstrap test (500 replicates). PAS (per (period circadian protein) arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein) sim (single minded protein), LOV (light oxygen voltage), HK-HATPase (Histidine Kinase containing ATPase domain), RR (response regulator) y PHY (phytochrome).* La proteína contienen el módulo LOV-HK-HATPase pero carece del dominio RR. ** La proteína contienen el módulo LOV-HK pero carece de los dominios HATPase y RR. El genoma de *Ralstonia solanacearum* fue incluido como control externo para el análisis filogenético. Figura adaptada de (26).

Así mismo, hemos estudiado el efecto de la luz blanca, azul y roja sobre diversas características de PsPto relacionadas con la aptitud epífita. Nuestros resultados muestran que la luz blanca y la azul inhiben la motilidad, sin embargo, la adhesión de las bacterias a las hojas de la planta se ve favorecida (Figura 2). Estos cambios controlados por la luz durante la etapa epífita causan una reducción de la

virulencia, resaltando la relevancia de la motilidad durante el proceso de entrada al apoplasto de la planta (Figura 3). Además, estos fenotipos están alterados en un mutante en el receptor de luz azul de tipo LOV de PsPto (Figura 4). Este estudio demuestra el papel clave de la percepción de la luz en el cambio de fenotipo en PsPto y su efecto sobre la virulencia.

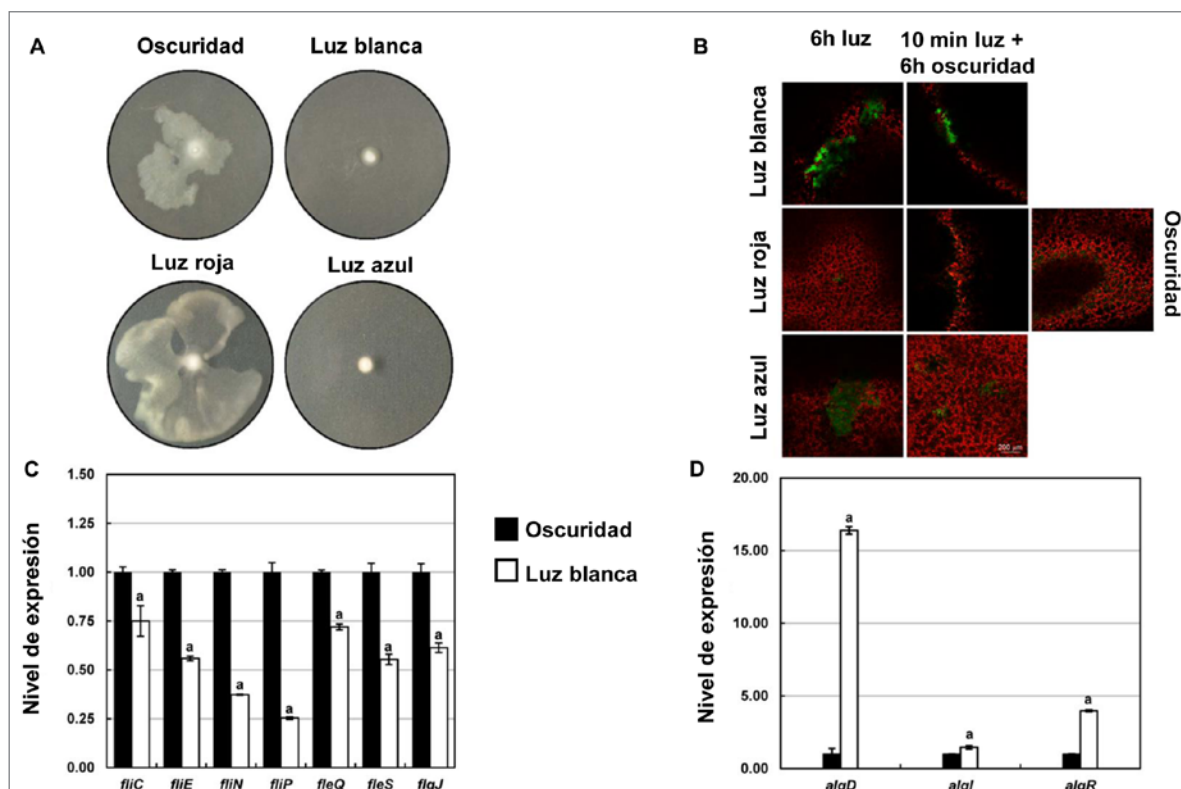


Figura 2. Las condiciones de luz afectan la motilidad tipo swarming y la adhesión a hojas en PsPto. A. Placas KB agar (0.3%) inoculadas con la cepa silvestre (WT) usando palillos estériles e incubadas durante 16h a 28°C. Las condiciones de luz empleadas fueron: oscuridad, luz blanca (70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), luz roja (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and luz azul (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). B. Ensayos de adhesión a hoja empleando PsPto marcada con la proteína verde fluorescente GFP. 10 μL de una suspensión de PsPto ($2 \times 10^7 \text{cfu/ml}$) fueron depositados en el envés de hojas de *A. thaliana*. Las hojas fueron incubadas bajo condiciones de luz constante durante 6h (blanca, roja o azul), 10 min bajo luz (blanca, roja o azul), seguido de 6 h de oscuridad o 6 h en oscuridad. Se muestran imágenes de microscopía confocal donde se superpone la señal GFP con la señal de autofluorescencia de la clorofila. C. La expresión diferencial de genes involucrados en la biosíntesis del flagelo y (D) en la biosíntesis de alginato (polisacárido implicado en la adhesión) fue evaluada a través de experimentos de qRT-PCR sobre muestras obtenidas de cultivos bacterianos tras un tratamiento de 10 min. con luz blanca (barras blancas) respecto a un tratamiento en oscuridad (barras negras). Se muestran medias de tres experimentos independientes. Las barras de error representan valores de error standard. (a) las diferencias significativas se determinaron a través de un análisis estadístico empleando el test Student's t ($P < 0.05$). Figura adaptada de (26).

Inicialmente, nuestro objetivo de análisis de la percepción de la luz y del control de los mecanismos de virulencia se centró en el estudio de la luz blanca (luz visible) como señal. El espectro de luz visible se compone de diversas longitudes de onda en el rango de 400 a 700 nm que van desde la luz azul (con la longitud de onda más corta y el nivel más alto de energía) a la luz roja (con la longitud de onda más larga y la energía asociada inferior). Por lo tanto, la intensidad de la luz varía en un lugar dado durante el día, y depende de varios factores como la presencia de nubes o el nivel de contaminación. Además, la calidad de la luz

también cambia, y la contribución relativa de cada tipo de luz (por ejemplo, azul versus rojo) es diferente en diferentes momentos del día. Durante la parte central del día, la luz con longitudes de onda del componente azul es más abundante que la del componente rojo. Por lo tanto, la luz es una señal clave utilizada por los patógenos de las plantas para regular las «decisiones de estilo de vida» que, a su vez, podrían determinar el establecimiento de la enfermedad. El estudio en bacterias que habitan la filosfera de los efectos de la luz blanca y las luces monocromáticas en la expresión génica, surge como un enfoque importante para entender este fenómeno.

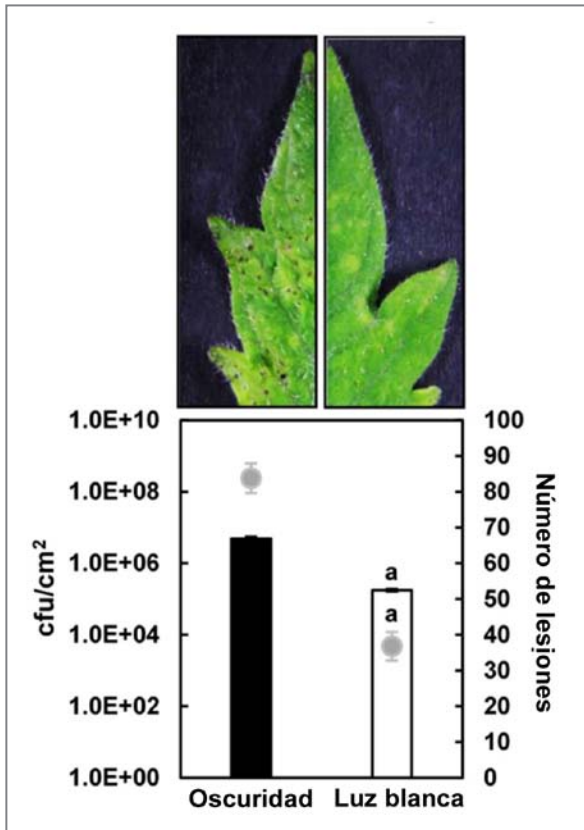


Figura 3. El tratamiento de luz antes de la infección reduce los síntomas y el desarrollo de la población bacteriana. Población bacteriana por unidad de área (barras) y número de lesiones (puntos) en plantas de tomate determinadas 6 días tras la inoculación por sumergimiento de las hojas en una suspensión bacteriana de 108 cfu/ml pretratadas con 10 min de luz blanca o mantenidas en la oscuridad. Se muestran medias de 5 réplicas. (a) las diferencias significativas se determinaron a través de un análisis estadístico empleando el test Student's t ($P < 0.05$). Todos los experimentos mostrados son resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes. Figura adaptada de (26).

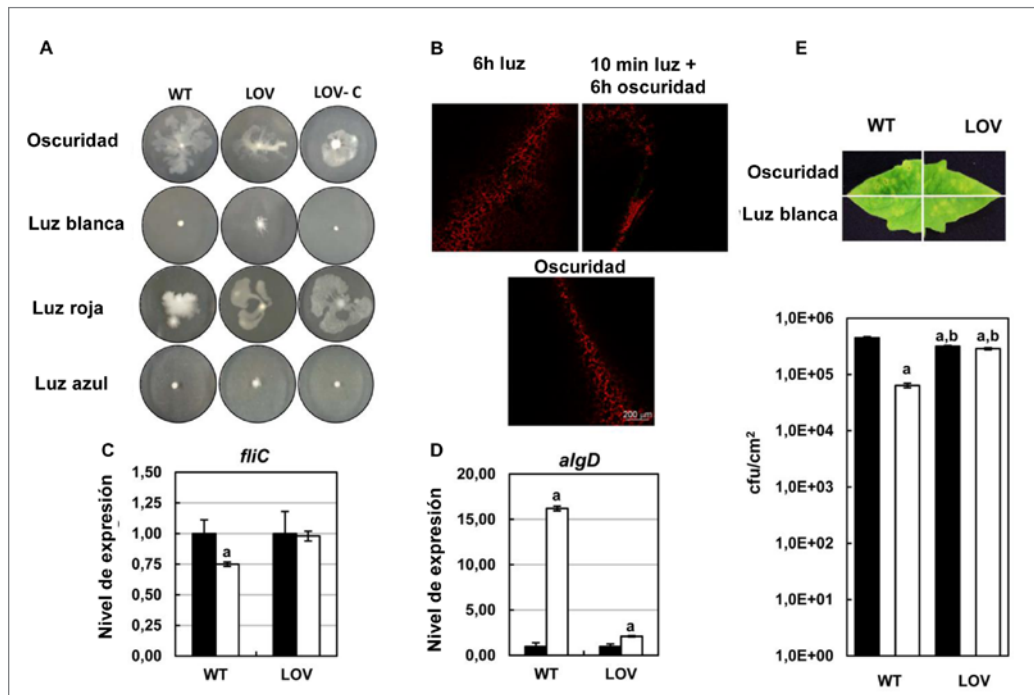


Figura 4. La respuesta a la luz en un mutante LOV está alterada. A. Placas KB agar (0.3%) inoculadas con la cepa silvestre (WT), el mutante LOV y el mutante LOV complementado, usando palillos estériles e incubadas durante 16h a 28°C. Las condiciones de luz empleadas fueron: oscuridad, luz blanca (70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), luz roja (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and luz azul (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). B. 10 μL de una suspensión del mutante LOV (2×10^7 cfu/ml) fueron depositados en el envés de hojas de *A. thaliana*. Las hojas fueron incubadas bajo condiciones de luz constante durante 6h (blanca, roja o azul), 10 min bajo luz (blanca, roja o azul), seguido de 6 h de oscuridad o 6 h en oscuridad. Se muestran imágenes de microscopía confocal donde se superpone la señal GFP con la señal de autofluorescencia de la clorofila. C. La expresión diferencial de genes involucrados en la biosíntesis del flagelo y (D) en la biosíntesis de alginato (polisacárido implicado en la adhesión) fue evaluada a través de experimentos de qRT-PCR sobre muestras obtenidas de cultivos bacterianos del mutante LOV tras un tratamiento de 10 min. con luz blanca (barras blancas) o en oscuridad (barras negras)

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo en esta línea es la siguiente: el análisis de los rasgos regulados por señales ambientales y de la planta, que determinan el inicio de la infección, podría ayudar al diseño de estrategias interferentes del proceso de infección. Para ello, en la actualidad, el grupo persigue estos objetivos principales: (A) Describir el programa de expresión génica del patógeno modelo *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000 bajo diferentes condiciones de luz. Incluyendo luces monocromáticas. (B) Análisis transcripcional del mutante en el receptor de luz azul (LOV) en respuesta a luces monocromáticas. (C) Análisis fenotípico de cepas mutantes afectadas en los fotorreceptores conocidos en respuesta a diferentes condiciones de luz. (D) Análisis transcripcional de poblaciones bacterianas en la filosfera de tomate tratadas con distintos tipos de luces.

Los resultados preliminares de estas aproximaciones muestran un efecto claro de la luz sobre los mecanismos activos de virulencia de PsPto que definen el momento óptimo de la infección durante el ciclo lumínico del día. El control de la expresión génica a través de la luz se dirige fundamentalmente a caracteres íntimamente relacionados con la patogénesis y la adaptación al ambiente epifito. Así mismo los distintos tipos de luces monocromáticas sugieren una adaptación del patógeno a la prevalencia de las mismas en distintos momentos del día.

Estos datos contribuyen al mejor conocimiento del ciclo infectivo de este patógeno y de la influencia que los factores ambientales como la luz tienen sobre el mismo.

REFERENCIAS

1. Agrios, G. *Plant Pathology*, 4th Ed. (Elsevier Academic press, New York; 2005).
2. Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42: 385-414.
3. Armitage, J.P. and Hellingwerf, K.J. (2003) Light-induced behavioral responses ('phototaxis') in prokaryotes. *Photosynth Res* 76: 145-155.
4. Barkovits, K. et al. (2008) Expression of the phytochrome operon in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the alternative sigma factor RpoS. *FEMS Microbiol Lett* 280: 160-168.
5. Barkovits, K. et al. (2011) Function of the bacteriophytochrome BphP in the RpoS/Las quorum-sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157: 1651-1664.
6. Bhardwaj, V. et al. (2011) Defence responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Pseudomonas syringae* are regulated by the circadian clock. *PLoS One* 6: e26968.
7. Block, A. et al. (2010) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. *Cell Microbiol* 12: 318-330.
8. Block, A. and Alfano, J.R. (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol* 14: 39-46.
9. Bonomi, H.R. et al. (2012) Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12135-12140.
10. Brooks, D.M. et al. (2004) Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 162-174.
11. Cuppels, D.A. (1988) Chemotaxis by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl Environ Microbiol* 54: 629-632.
12. Elias-Amanz, M. et al. (2011) Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14: 128-135.
13. Glickmann, E. et al. (1998) Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe*

- Interact* 11: 156-162.
14. Gohre, V. and Robatzek, S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 46: 189-215.
 15. Gomelsky, M. and Hoff, W.D. (2011) Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol* 19: 441-448.
 16. Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
 17. Kangasjarvi, S. et al. (2012) Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *J Exp Bot* 63: 1619-1636.
 18. Kraiselburd, I. et al. (2012) A LOV protein modulates the physiological attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri relevant for host plant colonization. *PLoS One* 7: e38226.
 19. Lamparter, T. et al. (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11628-11633.
 20. Melotto, M. et al. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
 21. Oberpichler, I. et al. (2008) Light affects motility and infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ Microbiol* 10: 2020-2029.
 22. Ondrusch, N. and Kreft, J. (2011) Blue and red light modulates SigB-dependent gene transcription, swimming motility and invasiveness in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* 6: e16151.
 23. Preston, G.M. (2000) *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol Plant Pathol* 1: 263-275.
 24. Purcell, E.B. and Crosson, S. (2008) Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 11: 168-178.
 25. Quiñones, B. et al. (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 682-693.
 26. Río-Álvarez, I. et al. (2014) Light regulates motility, attachment and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Environ Microbiol* 16: 2072-2085.
 27. Roden, L.C. and Ingle, R.A. (2009) Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions. *Plant Cell* 21: 2546-2552.
 28. Rodriguez-Herva, J.J. et al. (2012) A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cell Microbiol* 14: 669-681.
 29. Rottwinkel, G. et al. (2010) Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria. *J Bacteriol* 192: 5124-5133.
 30. Swartz, T.E. et al. (2007) Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317: 1090-1093.
 31. Vorholt, J.A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10: 828-840.
 32. Wang, W. et al. (2011) Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* 470: 110-114.
 33. Xin, X.F. and He, S.Y. (2013) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol* 51: 473-498.
 34. Yu, J. et al. (1999) Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol* 33: 712-720.

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

