

**XXIII CONGRESO
NACIONAL DE
MICROBIOLOGÍA**

SEM

11-14 JULIO-2011

SALAMANCA

XXIII
CONGRESO

SEM
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

Enriqueta Arias
Juan José Borrego
Francisco Javier Carballo
Ernesto García
José Antonio Gil
Tomás González Villa
Ricardo Guerrero
Jorge Lalucat
Montserrat Llagostera
Germán Larriba
Ana M^a Martín
José Pedro Martínez
José Antonio Mirón
María Molina
Juan Luis Muñoz
Jesús Murillo
Amparo Querol
José Luis Revuelta
Asunción de los Ríos
Luis Rodríguez
Carlos Rodríguez-Vázquez de Aldama
Yolanda Sánchez
Eulogio Valentín
Antonio Ventosa
Miguel Viñas

P.14. Hongos filamentosos y levaduras

HL P42 Estudio de la relación funcional entre las proteínas tetraspán Dni1p, Dni2p y Prm1p en el proceso de conjugación de *Schizosaccharomyces pombe*

M.A. Curto, M.R. Sharifmoghdam, N. De León, M. Hoya, C. Doncel, J.A. Clemente-Ramos, E. Calpena, M.H. Valdivieso. emecur@usal.es. Departamento de Microbiología y Genética/IBFG Universidad de Salamanca/CSIC.

Dni1p, Dni2p y Prm1p son proteínas con cuatro dominios transmembrana (tetraspán) de *Schizosaccharomyces pombe* cuya expresión se induce durante el proceso de conjugación. Además, Dni1p y Dni2p comparten con las claudinas la presencia de unas cisteínas en posiciones conservadas del primer dominio extracelular. Las tres proteínas se localizan en un subdominio concreto de la membrana plasmática, en la zona de contacto entre los parentales que están conjugando. Dni1p y Dni2p colocalizan. Dni1p no se localiza correctamente en un mutante *dni2⁻* y Dni2p no se localiza correctamente en un mutante *dni1⁻*, lo que sugiere que Dni1p y Dni2p forman un complejo. La localización de Prm1p es independiente de Dni1p y Dni2p, y viceversa. La ausencia de Dni1p, de Dni2p, o de ambas proteínas conduce a un defecto en la fusión celular durante la conjugación que sólo se manifiesta a temperaturas medio-altas. La ausencia de Prm1p produce un defecto en la fusión celular drástico a cualquier temperatura. Un análisis al microscopio electrónico ha demostrado que en los mutantes *dni1⁻*, *dni1⁻ dni2⁻* y *prm1⁻* hay una grave desorganización de la membrana plasmática y de la pared celular en la zona de contacto entre los parentales. La sobreexpresión del gen *dni1⁺* es letal, y esta letalidad se acompaña por la presencia de grandes invaginaciones en la membrana plasmática. La sobreexpresión de *dni2⁺* o de *prm1⁺* no causa defectos en las células, pero la sobreexpresión de *dni1⁺* en mutantes *dni2⁻* o *prm1⁻* no es letal porque Dni1p no se localiza en la membrana plasmática. Finalmente, se han realizado análisis genéticos y se ha determinado que Dni1p y Dni2p actúan en la misma ruta funcional, mientras que Prm1p actúa en una ruta diferente.

HL P43 El Dominio CNH de Rgf1p (GEF de Rho1p en *Schizosaccharomyces pombe*) es necesario para su función en NETO (New End Take Off)

Sofía Muñoz, Elvira Manjón, Patricia García y Yolanda Sánchez. Instituto de Biología funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca and Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. E-mail: sofiamf@usal.es

En levaduras, la GTPasa Rho1p regula la integridad celular coordinando la disposición del citoesqueleto de actina y microtúbulos con la secreción y la biosíntesis de la pared celular en las zonas de crecimiento. Nosotros estamos estudiando los principales activadores de Rho1p (Rgf1p, Rgf2p y Rgf3) en *S. pombe*. Los tres pertenecen a la familia de proteínas GEF (guanine nucleotide exchange factors) que actúan modificando el estado de unión a nucleótido de la GTPasa y de este modo influyen en su localización y su activación. Rgf1p activa a la GTPasa Rho1p durante el crecimiento polarizado y participa al menos en tres procesos diferentes: la síntesis de la pared celular, el mantenimiento de la integridad celular y el crecimiento polarizado (1). Rgf1p es una proteína con cuatro dominios altamente conservados: DEP (Dishevelled, Egl-10 y Pleckstrin), DH (Dbl Homology), PH (Pleckstrin Homology) y CNH (Citrón Kinase Homology). De ellos solo se conoce la contribución del dominio DH-PH que es esencial para su función catalítica.

Nosotros hemos obtenido mutantes en cada uno de los dominios de la proteína y hemos visto que el dominio CNH que está presente en proteínas de señalización como NIK y citrón kinasas, es esencial para la localización de la proteína en el polo nuevo de crecimiento. Las células que carecen de los últimos 165 aminoácidos (aa) son monopolares igual que la cepa *rgf1⁻* sin embargo a diferencia del mutante nulo que muestra un 30% de lisis, estas células no pierden la integridad. Hemos realizado mutagénesis por PCR degenerada del extremo C-terminal y hemos visto que la eliminación de los últimos 34 aa produce células incapaces de activar el crecimiento por el polo nuevo.

El dominio DEP también es importante en la localización de Rgf1p puesto que la delección parcial de este dominio libera la mayor parte de la proteína Rgf1p de los polos y la concentra en el núcleo. Tanto en los mutantes obtenidos en el dominio CNH como los obtenidos en el dominio DEP, las diferencias en la localización son debidas exclusivamente a la pérdida del anclaje a la membrana de las proteínas mutadas o a la falta de interacción con otras proteínas, puesto que la cantidad de Rgf1-CNH y Rgf1-DEP es similar a la cantidad de Rgf1 silvestre.

- (1) GARCIA, P., et al. "The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast". 2009 Mol Biol Cell. 20: 721-731

HL P44 Isolation and analysis of lip2 gene from *Trichoderma harzianum*

Vaz, M.¹, Belo, H.¹, Jorge, L.^{1,2}, González, F.⁴, Monte, E.³ and Choupina, A.^{1,2}
Email: vaz.madalena@gmail.com

¹Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. ²CIMO- Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. ³Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain. ⁴Centro de Investigación del Cáncer. Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

Trichoderma spp. covers a group of fungi extremely common in soils of all climatic areas. These fungi are efficient enzyme producers, with industrial applications, or in nature, involved in the degradation of the cell wall of the phytopathogens as well as in the degradation of other fungi, organic matter and nutrients secreted by roots.

Trichoderma strains produce extracellular enzymes and antibiotics with antifungal effects, mainly *T. harzianum*, *T. virens* and *T. viride*, being by this way used as biocontrol agents. Among the degradation enzymes of the cell walls we find β -1,3 and β -1,6 glucanases, chitinases and proteases. Lipases could also be involved in enzymatic activity related with biocontrol.

This work intention was the isolation and study of the *lip2* gene from *T. harzianum*.

lip2 gene was cloned in an expression system, using the pET-28a(+) vector, and the expression evaluation of the Lip2 protein was made in a SDS-PAGE gel at different induction times.

The obtained results in the cloning showed a 6584 bp band indicating that the cloning was well succeeded. The protein expression was verified at 8 hours of induction by the presence of a band with an estimated molecular weight of 44 kDa, in a SDS-PAGE gel.

Benítez, T., et al., Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. 2004. International Microbiology, 7:249-260.

Harman, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. 2006. Phytopathology, 96:190-194.

Monte, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. 2001. International of Microbiology, 4:1-4.

Acknowledgements: The Project COMBATINTA/SP2.P11/02 Interreg IIIA – Cross-Border Cooperation Spain-Portugal, financed by The European Regional Development Fund, and the Project "Identification, characterization and role of molecular factors associated with the mechanisms of infection of *Fagaceae* species by *Phytophthora cinnamomi*" (PTDC/AGR-AAM/67628/2006) FCT, supported this work.

HL P45 Characterization of a glucanase inhibitor protein from *Phytophthora cinnamomi* involved in plant defense responses

Martins, I.M.^{1,2}, Martins, F.¹, Belo, H.¹, Vaz, M.¹ and Choupina, A.^{1,2}
e-mail: ivonemaris@ipb.pt

¹Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. ²CIMO- Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal.

Oomycetes from the genus *Phytophthora* are fungus-like plant pathogens that are devastating for agriculture and natural ecosystems. Due to their particular physiological characteristics, no efficient treatments against diseases caused by these microorganisms are presently available. To develop such treatments, it appears essential to dissect the molecular mechanisms that determine the interaction between *Phytophthora* species and host plants.

One of the most widely distributed *Phytophthora* specie, with nearly 1000 host species is *Phytophthora cinnamomi*. This pathogen is able to secrete a glucanase inhibitor protein (GIP) that inhibit the activity of endoglucanases (EGases), involved in plant defense responses, including during the plant infection process of *Castanea sativa* Mill by *P. cinnamomi*.

In this work we report the sequencing and characterization of a class of glucanase inhibitor proteins secreted by *P. cinnamomi*. The *gip* gene from *P. cinnamomi* has a total length of 1301 bp comprising a 940 bp ORF which encodes a 313 aa protein. In order to understand its function gene expression was studied during growth in different carbon sources (glucose, cellulose and sawdust), by RT-qPCR and a time course of GIP production was achieved. Analysis of homologous expression (in *P. cinnamomi*) and heterologous expression (in *Pichia pastoris*), was also performed. We also report function gene expression *in vivo* at different times of infection of *C. sativa* roots with the fungus.

These and other results will be presented.

Hein, I., et al., The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. 2009, Molecular Plant Pathology, 10(4): 547-562.

Kamoun, S., A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. 2006 Annual Review Phytopathological, 44(10): 41-60.

Acknowledgements: The Projects COMBATINTA/SP2.P11/02 Interreg IIIA – Cross-Border Cooperation Spain-Portugal, financed by The European Regional Development Fund, and "Identification, characterization and role of molecular factors associated with the mechanisms of infection of *Fagaceae* species by *Phytophthora cinnamomi*" (PTDC/AGR-AAM/67628/2006) FCT, supported this work.

P.14. Hongos filamentosos y levaduras

HL P46 MOLECULAR METHODS FOR IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FACTORS IN *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

Choupin, A.^{1,2}, Martins, F.¹, Vaz, M.¹, Dominguez, A.³ and Martins, I.M.^{1,2}.
email: albracho@ipb.pt
¹Instituto Politécnico de Bragança, escola superior agrária, campus de santa apolónia, ²Cimo- centro de investigação de montanha, campus de Santa Apolónia, 1172, 5301-854 Bragança, Portugal ³Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca Salamanca, Spain.

The culture of the chestnut tree is extremely important in the northern region of Portugal, occupying a significant proportion of useful agricultural area. The annual average chestnut production in Portugal can reach 20 000 tons. New plantation areas have increased in the last few decades. However the ink disease caused by the oomycete *Phytophthora cinnamomi* has damaged and killed many trees and up to now no concrete solutions have been offered to control the illness. The oomycetes form a phylogenetically distinct group of eukaryotic micro-organisms that includes some of the most notorious pathogens of plants. Among these, members of the genus *Phytophthora* cause enormous economic losses on crop species as well as environmental damage in natural ecosystems. *P. cinnamomi* is the most widely distributed *Phytophthora* species, with nearly 1000 host species.

Fungicides rarely control them and the few anti-oomycete products are often overcome by resistant pathogen variants. There are no eradication methods available to combat these species. Oomycetes species can manipulate biochemical and physiological processes in their host plants through a diverse array of virulence or avirulence molecules, known as effectors. In susceptible plants, these effectors promote infection by suppressing defense responses, enhancing susceptibility, or inducing disease symptoms. Alternatively, in resistant plants, effectors are recognized by the products of plant resistance genes, resulting in host cell death and effective defense responses known as the hypersensitive response (hr).

We've identified and characterized some proteins involved in mechanisms of infection by *P. cinnamomi*: endo-1,3-beta-glucanase (complete cds), exo-glucanase (partial cds), glucanase inhibitor protein (gip) (complete cds), necrosis-inducing phytophthora protein 1 (npp1) (complete cds), transglutaminase, under the projects identification, characterization and role of molecular factors associated with the mechanisms of infection of fagaceae species by *P. cinnamomi*, pldc/agr-aam/67628/2006, funding by fct; combating by molecular methods to ink-disease of chestnut and other regional cultures, Combatinta/sp2.p11/02 - Interreg IIIa, funding by Feder, among others.

Several technologies, such as reverse transcriptase PCR, in vivo expression technology, and bioinformatics tools have been used to study the expression of selected genes from fungi during infection. In this work we intend to integrate the necessary bioinformatics tools that were used in this investigation. These tools include the use of databases and associated homology programs as Fasta and Clustal, and several programs for sequence analysis and design of experiments such as PCR.

HL P47 La oligomerización de Chs3 en la regulación de la síntesis de quitina en *Saccharomyces cerevisiae*

Sacristán, C., Arcones, I., Roncero, C. e-mail: csacris@usal.es
Departamento de Microbiología y Genética, IBFG (Universidad de Salamanca/CSIC).

Chs3 es la principal quitina sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Es una proteína con varios dominios transmembrana que requiere de una serie de proteínas accesorias a lo largo de la ruta de secreción para su llegada a la membrana plasmática (MP) en una conformación activa.

Mediante ensayos de dos híbridos después confirmados mediante inmunoprecipitación hemos demostrado que Chs3 forma oligómeros. La interacción proteica se produce a través del extremo N-terminal de la proteína y parecen ser imprescindibles los primeros 125 aminoácidos de la misma. La forma truncada de la proteína en los primeros 125 aminoácidos (1-126-Chs3) presenta una mayor retención en el retículo endoplásmico (RE), sugiriendo que la correcta oligomerización de Chs3 es necesaria para la salida eficiente del mismo. La sobreexpresión de Chs7, la chaperona específica de Chs3, alivia la retención observada en el RE, permitiendo la llegada de la proteína 1-126-Chs3 a la MP. Una vez que 1-126-Chs3 llega a la MP es capaz de promover la síntesis de quitina hasta niveles silvestres. Sin embargo, la proteína truncada se endocita deficientemente lo que promueve su acumulación anormal en la MP que va acompañada de su redistribución a lo largo de la misma, reduciéndose su acumulación en el cuello. En su conjunto, estos resultados permiten reconciliar la resistencia a calcofluor de la cepa 1-126-Chs3 con la mayor acumulación de esta proteína en la MP y la mayor cantidad de CSIII.

Por tanto, la oligomerización de Chs3 es necesaria tanto para el correcto empacquetamiento de la proteína en vesículas de tipo COPII que le permitan salir del RE, como para garantizar su correcto reciclado endocítico una vez llegada a la MP. Estos datos refuerzan la importancia del correcto plegamiento proteico de las quitina sintasas en la regulación de la biosíntesis de quitina en hongos, en este caso directamente ligado a la formación de oligómeros proteicos.

HL P48 Identificación molecular de hongos productores de micotoxinas en cultivos de maíz transgénico y convencional en España

Arias, M.1, Farinós, G. P. 1, Patiño, B.2 e-mail: belenp@bio.ucm.es
¹ Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. ² Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. José Antonio Novais 2, 28040 Madrid.

La contaminación de cultivos de maíz por hongos productores de micotoxinas es un problema que afecta principalmente a la salud pública, pero también causa pérdidas en la agricultura, en la industria de transformación de sus productos y en la ganadería. La identificación de las especies fúngicas implicadas y su distribución geográfica y climática nos permite predecir el establecimiento de determinadas especies y el riesgo potencial de contaminación con toxinas de este alimento. Uno de los principales géneros fúngicos toxigenos que afecta al maíz durante la etapa de precosecha es *Fusarium* spp., productor de fumonisinas y trico tecenos, entre otras toxinas. Desde 1998 en España se cultiva comercialmente un maíz modificado genéticamente que expresa la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* (maíz Bt). Este maíz es resistente a dos especies de lepidópteros que son importantes plagas del cultivo: los taladros *Sesamia nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*. El daño producido por estos insectos es un factor que puede predisponer a la contaminación por micotoxinas, ya que producen heridas que favorecen la colonización por *Fusarium*. Por ello, uno de los posibles beneficios indirectos de la adopción del maíz Bt podría ser la reducción de las concentraciones de micotoxinas, al reducirse el nivel de daño producido por estas plagas.

El objetivo de este estudio es comparar las especies de hongos productores de micotoxinas presentes en mazorcas procedentes de campos comerciales de maíz Bt y no Bt de distintas zonas geográficas de España. Las mazorcas se recogieron justo antes de la recolección del maíz. Una vez procesadas las muestras, la identificación de los hongos se realizó mediante métodos moleculares, utilizando cebadores y protocolos específicos de PCR diseñados en nuestro laboratorio.

Se han analizado 16 especies de hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, habiéndose detectado únicamente hasta el momento *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *Aspergillus flavus* y *A. niger*, con algunas diferencias de frecuencia de aparición de especies entre el maíz transgénico y el convencional.

Esta investigación ha sido financiada por el MICINN a través del proyecto AGL2009-088113

HL P49 Alteraciones fenotípicas, transcripcionales y en rutas de señalización del mutante de glicosilación *mmn9Δ* de *Candida albicans*

Civicos, C., Durán, L.; López, M.C.; Domínguez, A. carloscivicos@usal.es
Departamento de Microbiología y Genética, CIETUS, IBFG/CSIC. Universidad de Salamanca.

La N-glicosilación de proteínas es una modificación que sufren las proteínas durante su paso por la ruta de secreción; muchas de ellas serán exportadas a la superficie celular. En levaduras, la zona más externa de la pared celular se encuentra enriquecida en manoproteínas, las cuales constituyen del 30 al 40% del peso seco de la misma. Teniendo en cuenta que la pared celular juega un papel muy importante en procesos como la plasticidad morfológica y la adhesión y virulencia en *Candida albicans*, al tratarse del primer punto de contacto con el huésped, el estudio de las alteraciones en mutantes afectados en la N-glicosilación de proteínas contribuirá a profundizar en los mecanismos de diferenciación morfológica y virulencia de este hongo patógeno oportunista de humanos.

El mutante *Cmmn9Δ* carece de una N-manosiltransferasa que cataliza la adición de manosas en enlaces β-1,6 en el Complejo de Golgi, una vez añadida la primera man al núcleo oligosacárido de las glicoproteínas en este orgánulo. Este mutante es incapaz de llevar a cabo la transición morfológica, presenta alteraciones en la superficie de la pared celular y una capacidad de virulencia atenuada, respecto a la cepa parental, en un modelo murino de infección sistémica. De los análisis de los perfiles globales de transcripción del mutante, respecto a la cepa parental, creciendo como levadura a 28°C, cabe destacar la sobreexpresión de genes relacionados con pared celular, que podría explicarse como una respuesta adaptativa compensatoria y la subexpresión de genes de biogénesis y ensamblaje de ribosomas y de genes relacionados con las mitocondrias. En condiciones de inducción de la filamentación a 37°C, y entre los genes menos expresados en el mutante, también se encuentra muy representada esta última categoría, mientras que muchos de los genes de la ruta de la glicólisis se encuentran sobreexpresados. Las categorías de secreción, transporte vesicular así como de crecimiento filamentoso, están significativamente representadas por genes menos expresados en el mutante, lo que podría explicar su incapacidad para formar hifas verdaderas. Hemos observado, mediante experimentos de "western blotting", que durante el crecimiento a 28°C este mutante presenta activadas las MAP kinasas Cek1 (de la ruta de señalización de crecimiento filamentoso) y Mkc1 (de integridad celular). Nuestros resultados apoyan la idea de que defectos en la extensión de las cadenas oligosacáridicas externas de las glicoproteínas, desencadenan respuestas celulares a través de estas rutas de señalización.