



**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<sup>a</sup> 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*<sup>-</sup> y Dni2p no se localiza correctamente en un mutante *dni1*<sup>-</sup>, 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*<sup>-</sup>, *dni2*<sup>-</sup> y *prm1*<sup>-</sup> 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*<sup>+</sup> es letal, y esta letalidad se acompaña por la presencia de grandes invaginaciones en la membrana plasmática. La sobreexpresión de *dni2*<sup>+</sup> o de *prm1*<sup>+</sup> no causa defectos en las células, pero la sobreexpresión de *dni1*<sup>+</sup> en mutantes *dni2*<sup>-</sup> o *prm1*<sup>-</sup> 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: sofiamp@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 (Citron 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*<sup>-</sup> 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 Rgf1p-CNH<sup>-</sup> y Rgf1p-DEP<sup>-</sup> es similar a la cantidad de Rgf1p 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.<sup>1</sup>, Belo, H.<sup>1</sup>, Jorge, L.<sup>1,2</sup>, González, F.<sup>4</sup>, Monte, E.<sup>3</sup> and Choupina, A.<sup>1,2</sup>  
Email: vaz.madalena@gmail.com  
<sup>1</sup>Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. <sup>2</sup>CIMO- Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. <sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain. <sup>4</sup>Centro 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  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -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.

Benitez, 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, IM<sup>1,2</sup>, Martins, F.<sup>1</sup>, Belo, H.<sup>1</sup>, Vaz, M.<sup>1</sup> and Choupina, A.<sup>1,2</sup>  
e-mail: ivonemaris@ipb.pt

<sup>1</sup>Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. <sup>2</sup>CIMO- 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.