

TRANSFORMACIÓN DE *Podosphaera xanthii* MEDIANTE *Agrobacterium tumefaciens* Y SU APLICACIÓN PARA EL ESTUDIO DE EFECTORES

J. Martínez-Cruz*, D. Romero, A. de Vicente, A. Pérez-García

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" - Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Bulevar Louis Pasteur 31, 29071 Málaga. E-mail: jesusmcruz@uma.es

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren células vivas para completar su ciclo de vida. Esto se debe a que estos hongos patógenos desarrollan una estructura especializada en el interior de las células de la planta, denominada haustorio, estableciendo una íntima relación con su hospedador. El haustorio es el responsable de la toma de nutrientes y el intercambio de factores con la planta. Estos factores son los denominados efectores, pequeñas proteínas secretadas por el patógeno responsables de la inhibición o modificación de la defensa innata de la planta. El análisis de estos efectores ha focalizado un gran interés en los últimos años, haciéndose necesaria la puesta a punto de técnicas para la manipulación genética de estos patógenos.

Hasta la fecha, se han desarrollado varios métodos para transformar hongos filamentosos, sin embargo, debido al estilo de vida de estos patógenos, estas estrategias de transformación o no son adecuadas o no han dado resultados satisfactorios. Recientemente, se han desarrollado metodologías para el estudio y análisis de efectores usando la planta como vector para la expresión de construcciones para el silenciamiento o la sobreexpresión de estas proteínas, sin embargo, la localización y el mecanismo de secreción de los efectores sigue siendo desconocido. En este trabajo hemos desarrollado un método para la transformación de *Podosphaera xanthii*, el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas, usando *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transformación. Mediante este método, hemos obtenido transformantes estables para una variedad de construcciones: i) plásmidos expresando el gen *egfp* bajo el control de promotores constitutivos o inducibles de *Aspergillus nidulans*, ii) plásmidos expresando el casete de resistencia a higromicina B o un alelo de β -tubulina de *P. xanthii* que confiere resistencia a fungicidas MBC. Tras la transformación, las colonias de los transformantes fueron analizadas mediante microscopía confocal, resultando ser estables tras sucesivas generaciones cuando se aplicaba el marcador de resistencia y presentando el mismo aspecto que las colonias no transformadas del parental. Además, los análisis moleculares mostraron la presencia del T-DNA en las colonias transformadas de *P. xanthii*.

El objetivo de este trabajo es poner a punto un método para el estudio de los posibles efectores de *P. xanthii*. Por ello, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal con fusiones traduccionales de efectores candidatos de *P. xanthii* fusionados a GFP. Entre los efectores ensayados, destacó la presencia de una amplia familia de efectores localizados en la papila y en pequeñas vesículas del haustorio, así como un efector de localización en la membrana del hongo. Estos resultados demuestran la fiabilidad de este método para la transformación de *P. xanthii* y abre una nueva vía para el estudio de efectores candidatos directamente en el patógeno sin mediar la planta.

Este trabajo ha sido financiado con una ayuda del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-41939-R), cofinanciado con fondos FEDER (UE).