

# MODIFICACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS CON PROTEÍNAS FLUORESCENTES PARA EVALUAR SU CAPACIDAD ANTAGONISTA FRENTE A PATÓGENOS VASCULARES EN CÁMARAS DE MICROFLUÍDICA SIMULANDO LOS HACES DEL XILEMA

P. Rubio Grande<sup>2</sup>, E. Peña Armenta<sup>2</sup>, I. Pérez Sirvent<sup>2</sup>, L. Montealegre Rockstad<sup>2</sup>, L. Toledano Medina<sup>3</sup>, L. María Villaverde Cabello<sup>3</sup>, E. León Rodríguez<sup>2</sup>  
M. P. Velasco Amo<sup>1</sup>, G. Prado Fortuna<sup>1</sup>, L. F. Arias-Giraldo<sup>1</sup>; B. B. Landa del Castillo<sup>1</sup>,  
, M.;<sup>1</sup> Instituto Agricultura Sostenible IAS-CSIC (Córdoba)  
<sup>2</sup> I.E.S. Fidiana (Córdoba)  
<sup>3</sup> CES Lope de Vega (Córdoba)

Los patógenos *Xylella fastidiosa* y *Verticillium dahliae* son dos patógenos que tienen características en común como el crecimiento confinado en el xilema donde causa oclusión de los vasos, que tienen una gran capacidad patogénica en sus poblaciones y que se dispersan a larga distancia sólo con material vegetal infectado. Por ello, son una amenaza para la producción de ciertas especies de plantas y ello tiene grandes repercusiones socioeconómicas. El objetivo principal de este proyecto de investigación fue modificar genéticamente bacterias silvestres, aisladas de la savia del xilema de diferentes cultivares del olivo, mediante conjugación bacteriana para su uso como agente de biocontrol frente a patógenos vasculares. Se usaron tres tipos de plásmidos insertados previamente en *E. coli* (PBBR, RK2 y Tn7), marcados con genes reporteros de proteínas fluorescentes y de resistencia a antibióticos. Se observó que las bacterias habían adquirido el plásmido que les proporcionaba fluorescencia tras la realización de la inoculación en medio de cultivo de *E. coli* transformada con los plásmidos de interés. Posteriormente, se realizó la conjugación bacteriana con bacterias aisladas de la savia del olivo (BXOL: Bacterias del Xilema del Olivo) y las cepas *E. coli* portadoras de los plásmidos de interés. Se observó que las bacterias tuvieron un desarrollo y crecimiento correcto. La adquisición de los plásmidos fluorescentes y la inserción correcta de los mismos se determinó mediante PCR. Finalmente, se concluyó que los transconjugantes válidos fueron BXOL 162 que corresponde al género *Variovorax*, usada como control de la conjugación con los plásmidos RK2 y PBBR, también la BXOL 5 (género *Variovorax*) conjugada con los plásmidos RK2 y PBBR y por último la BXOL 25 (*Pseudomonas*) conjugada con el plásmido RK2.

**Palabras clave:** *Xylella fastidiosa*, conjugación, plásmidos fluorescentes, biocontrol, xilema

The pathogens *Xylella fastidiosa* and *Verticillium dahliae* are two pathogens with common characteristics such as confined growth in the xylem where they cause vessel occlusion, have a high pathogenic capacity in their populations and spread over long distances only with infected plant material. They are therefore a threat to the production of certain plant species and this has major socio-economic repercussions. The main objective of this research project was to genetically modify wild bacteria, isolated from the xylem sap of different olive cultivars, by bacterial conjugation for use as a biocontrol agent against vascular pathogens. Three types of plasmids previously inserted into *E. coli* (PBBR, RK2 and Tn7), tagged with fluorescent protein and antibiotic resistance reporter genes, were used. Bacteria were observed to have acquired the plasmid providing fluorescence after inoculation into *E. coli* culture medium transformed with the plasmids of interest. Subsequently, bacterial conjugation was performed with bacteria isolated from olive sap (BXOL: Bacteria from Olive Xylem) and the *E. coli* strains carrying the plasmids of interest. It was observed that the bacteria developed and grew well. The acquisition of the fluorescent plasmids and their correct insertion was determined by PCR. Finally, it was concluded that the valid transconjugants were BXOL 162 corresponding to the genus *Variovorax*, used as a control for conjugation with plasmids RK2 and PBBR, also BXOL 5 (genus *Variovorax*) conjugated with plasmids RK2 and PBBR and finally BXOL 25 (*Pseudomonas*) conjugated with plasmid RK2.

**Key words:** *Xylella fastidiosa*, conjugation, fluorescent plasmids, biocontrol, xylem.