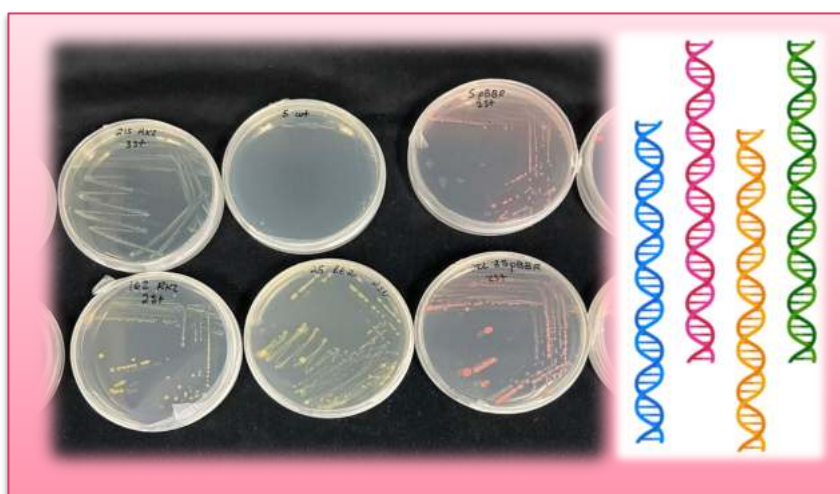


MODIFICACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS
CON PROTEÍNAS FLUORESCENTES PARA
EVALUAR SU CAPACIDAD ANTAGONISTA
FRENTE A PATÓGENOS VASCULARES EN
CÁMARAS DE MICROFLUÍDICA
SIMULANDO LOS HACES DEL XILEMA



ALUMNADO:

Loreena Montealegre Rockstad (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Elena Peña Armenta (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Idaira Pérez Sirvent (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Paula Rubio Grande (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Lucía Toledano Medina (1º Bach, CES Lope De Vega (Córdoba))
Lourdes María Villaverde Cabello (1º Bach, CES Lope De Vega (Córdoba))

PROFESORA COORDINADORA:

Dra. Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba)

INVESTIGADORES:

Dra Blanca B. Landa del Castillo
María del Pilar Velasco Amo
Giovana Prado Fortuna
Luis Felipe Arias-Giraldo

ÍNDICE

ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	4
2.- OBJETIVOS	4
3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
3.1.- CONJUGACIÓN BACTERIANA	6
3.2.-CULTIVOS DE MICROORGANISMOS	7
3.3.-PCR	7
3.3.- ELECTROFORESIS	7
3.4.- CÁMARAS DE MICROFLUIDOS.....	8
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1.- MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS	8
4.2.- EXTRACCIÓN DEL ADN	9
4.3.- MÉTODO DE CONJUGACIÓN BACTERIANA.....	10
4.4.- COMPROBACIÓN DE TRANSCONJUGANTES	11
4.5.- MONTAJE DE MICROCHIPS DE MICROFLUIDOS	12
4.6.- MATERIAL EXPERIMENTAL	13
4.7.-PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	15
5.- RESULTADOS	16
5.1.- INOCULACIÓN EN MEDIO DE CULTIVO DE <i>E. COLI</i> TRANSFORMADA CON PLÁSMIDOS DE INTERÉS	16
5.2.- CONJUGACIÓN BACTERIANA CON BACTERIAS DE LA SAVIA DEL OLIVO (BXOL: BACTERIAS DEL XILEMA DEL OLIVO) Y CEPAS <i>E.COLI</i> PORTADORAS DE PLÁSMIDOS DE INTERÉS	18
5.3.- COMPROBACIÓN A TRAVÉS DE PCR DE LOS TRANSCONJUGANTES, ASÍ COMO LA CORRECTA INSERCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	20
8. CONCLUSIONES	22
9. AGRADECIMIENTOS	22
10. BIBLIOGRAFÍA	23

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 Grande², E. Peña Armenta², I. Pérez Sirvent², L. Montealegre Rockstad², L. Toledano Medina³, L. María Villaverde Cabello³, E. León Rodríguez²,
M. P. Velasco Amo¹, G. Prado Fortuna¹, L. F. Arias-Giraldo¹; B. B. Landa del Castillo¹,
, M.;¹ Instituto Agricultura Sostenible IAS-CSIC (Córdoba)
² I.E.S. Fidiána (Córdoba)
³ 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 estos 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.

1.- INTRODUCCIÓN

Xylella fastidiosa (Xf) es una bacteria gramnegativa que causa enfermedades en una amplia gama de plantas huésped, más de 600 tipos de plantas huésped, incluidos cultivos de gran importancia económica en la agricultura y la silvicultura, con valor cultural y patrimonial. Por lo que supone un patógeno vegetal grave desde el punto de vista de las repercusiones socioeconómicas.

Por otro lado, *Verticillium dahliae* (Vd) es un hongo que habita en el suelo y que ataca al cultivo del pistacho, algodón, remolacha, olivo, girasol, alfalfa, pimiento, tomate y berenjena. Provoca una enfermedad vascular conocida como verticilosis. Hay variedades de *Verticillium* dependiendo de si ataca desde el suelo o directamente al árbol. Vd puede llegar a permanecer en el suelo durante 15 años.

Ambos patógenos Xf y Vd tienen características en común como el crecimiento confinado en el xilema donde causa oclusión de los vasos, que tienen una gran gama de plantas huésped con o sin síntomas de enfermedad, que existe gran variabilidad genética y patogénica en sus poblaciones y que se dispersan a larga distancia sólo con material vegetal infectado. Para ambos patógenos no existen medidas de control de naturaleza química (xilema/sistémico) por lo tanto son necesarias medidas de detección temprana, el uso de variedades resistentes o tolerantes o el desarrollo de nuevas herramientas de biocontrol.

Nuestra primera hipótesis es que se puede llevar a cabo la modificación genética mediante conjugación bacteriana de bacterias presentes en la savia del olivo que han sido seleccionados como posibles agentes de control biológico de patógenos vasculares, e introducirles genes reporteros que codifican para proteínas fluorescentes. La segunda hipótesis es que esta modificación genética permitirá visualizar mediante microscopio confocal mezclas de estas bacterias marcadas con diferentes colores utilizando cámaras de microfluidos, que son unos dispositivos que simulan los haces vasculares del xilema de una planta, y monitorizar su crecimiento diferencias fenotípicas así como comprobar si existe antagonismo microbiano entre ellas.

2.- OBJETIVOS

Este proyecto de investigación tuvo como objetivo general la modificación genética de bacterias con proteínas fluorescentes para su uso como agente de biocontrol frente a patógenos vasculares en cámaras microfluídicas simulando los haces vasculares del xilema. Para conseguir este objetivo general se siguieron los siguientes objetivos específicos:

1. Modificación genética de bacterias mediante conjugación usando tres tipos de plásmidos insertados previamente en *E. coli* (PBBR, RK2 y Tn7), marcados con genes reporteros de proteínas fluorescentes (GFP-verde, mScarlet-rojo ,sYFP-amarillo) y resistencia a antibiótico (tetraciclina).
2. Purificación de los transconjugantes y comprobación mediante técnicas moleculares la correcta inserción del plásmido en los transconjugantes bacterianos.

3. Visualización al microscopio de fluorescencia de las bacterias transformadas en cámaras de microfluidos para observar los procesos asociados con la colonización (fuerza de adhesión, motilidad, etc.) y competición, inhibición entre dos bacterias marcadas con diferente color.

3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Algunas enfermedades más conocidas producidas por *Xylella fastidiosa* (*Xf*) son el decaimiento súbito del olivo (OQDS), la clorosis variegada en los cítricos (CVC), la enfermedad de Pierce de la vid (PD), el phony peach del melocotonero, el escalado del ciruelo, el quemado de hojas en otras leñosas y el enanismo de la alfalfa, entre otras. Por lo tanto, este fitopatógeno tiene un gran potencial de causar impactos socioeconómicos en la UE, en todas las categorías sociales, económicas y medioambientales.

Un estudio reciente realizado por Centro Común de Investigación (CCI) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estimó que, debido a esta bacteria, se podría perder más de 5,5 millones de euros al año debido a las pérdidas de producción y 0,7 millones de euros al año debido a las pérdidas de exportaciones, ya que *Xf* afecta a un 70% de la producción de olivos en la UE. Por eso, es importante detectar al patógeno a tiempo y poder tomar las medidas adecuadas para erradicarlo y/o contenerlo. *Xf* ocurre en zonas climáticas variadas, pero es más prevalente en los trópicos y los climas subtropicales. También se encuentra en lugares donde hay un clima mediterráneo o similar, como en California. Se encuentra en regiones europeas como el sur de Italia, la comunidad Valenciana, las islas Baleares, Francia etc. Puede sobrevivir en localizaciones de climas fríos como Nueva Jersey, Washington, Canadá etc. (Velasco Amo, 2022)

Por otro lado, *Verticillium dahliae* (*Vd*) es la principal causa por la que es capaz de acabar con más de 300 especies de plantas, así como una gran variedad de árboles frutales y ornamentales. La Verticilosis del olivo es una enfermedad ampliamente distribuida en todos los países de la Cuenca Mediterránea. Su importancia ha aumentado en los últimos años y a ello ha contribuido la intensificación del cultivo y el establecimiento de nuevas plantaciones en suelos infestados. Generalmente esta enfermedad se manifiesta por dos síndromes denominados apoplejía y decaimiento lento. (Portillo, 2017).

En la naturaleza, las plantas saludables viven en asociación e interactúan con una gran variedad de microorganismos, denominados colectivamente el microbioma vegetal, que ahora se sabe que desempeña una función importante en la salud de las plantas (Anguita-Maeso, 2021). Por lo tanto, un conocimiento de las comunidades microbianas que residen en los vasos xilemáticos del olivo puede ser crucial para comprender su posible influencia en el crecimiento sano de esta planta, así como en la resistencia mostrada por genotipos específicos de olivo contra *Vd* u otros patógenos vasculares (Hong and Park, 2016). Además, algunos componentes del microbioma asociado a las plantas pueden aprovecharse como agentes de biocontrol que proporcionan protección contra los fitopatógenos, y especialmente los de difícil manejo, como los patógenos del suelo y vasculares (Weller, D.M, 2002; Anguita-Maeso, 2021).

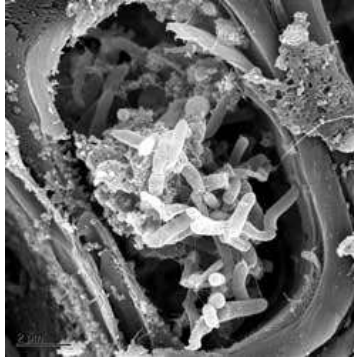


Figura 1: : *Xylella fastidiosa* en los haces del xilema de una planta (Procedencia: U.C. Berkeley)

Las normas actuales de la UE sobre fitosanidad tienen por objeto proteger la agricultura y la silvicultura europeas evitando la entrada y propagación de plagas exóticas. El reglamento establece una lista de las principales plagas y las divide en:

1. Plagas cuarentenarias (plagas peligrosas): Las plagas de zonas protegidas son plagas cuarentenarias contra las cuales solo se protegerán contra las cuales solo se protegerán algunas partes del territorio, ya que están presentes en otras zonas.
2. Plagas de calidad (no requieren erradicación).

Las nuevas normas incluyen también medidas para hacer frente a plagas procedentes de países no pertenecientes a la UE. También proponen ampliar, simplificar y armonizar el régimen de pasaporte fitosanitario existente. Estos serán necesarios para todos los traslados entre operadores profesionales, pero no para las ventas a usuarios finales no profesionales. (*Consejo Europeo de la Unión Europea.*)

Las comunidades microbianas sintéticas (SynComs) son una herramienta útil para una comprensión más realista de los resultados de múltiples interacciones bióticas donde los microbios, las plantas y el medio ambiente son actores en el tiempo y el espacio de un sistema multidimensional y complejo que implica aplicar conceptos tanto de la ecología microbiana como de la genética para diseñar inoculantes. (Martín O. *et al*, 2021)

3.1.- CONJUGACIÓN BACTERIANA

La conjugación bacteriana es el proceso de transferencia de información genética (plásmidos) desde una célula donadora a otra receptora. Este proceso se lleva a cabo si la célula presenta el plásmido F, que contiene la información genética para formar pili, puentes que sirven de unión citoplásmica entre dos bacterias. La célula que presenta el plásmido se denomina F+; la célula que no lo contiene se llama F-. La bacteria F+ (donadora de información) se une a una bacteria F- (receptora) mediante uno de sus pili. A través de él introduce una hebra del plásmido F, de forma que la bacteria F- se convierte en bacteria F+. En ocasiones el plásmido se introduce en el anillo del ADN bacteriano. Entonces, la bacteria donadora se denomina Hfr (High frequency of recombination). (*Figura 1*)

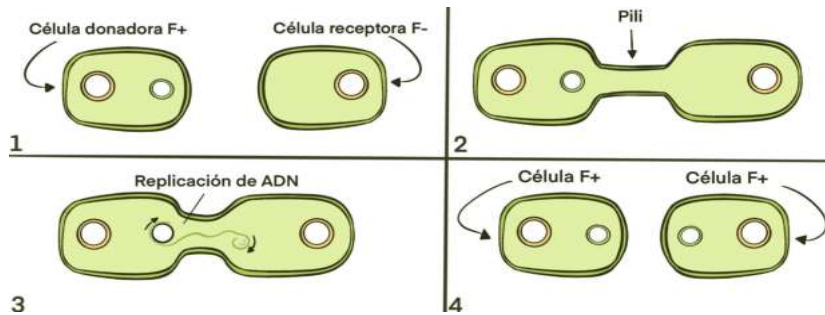


Figura 2. Proceso general de la conjugación bacteriana. La bacteria donadora (F+) mediante elongación de un pili trasporta el ADN plasmídico a una célula receptora (F-).

3.2.-CULTIVOS DE MICROORGANISMOS

Existen diferentes técnicas de inoculación de medios de cultivo, pero en esta investigación se utilizó la técnica por agotamiento. Consiste en cargar el asa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa, se gira la placa a 90°. Con el asa cargada se hacen 3 o 4 estrías perpendiculares a las anteriores, y se repite el procedimiento hasta agotar la superficie de la placa.

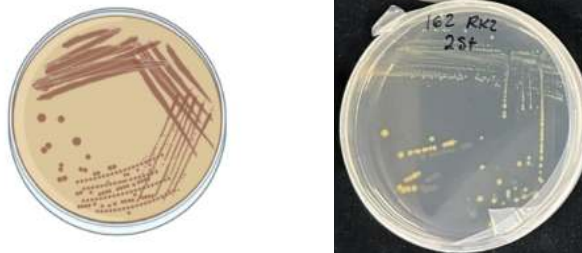


Figura 3. Cultivo de bacterias E. Coli en placa de petri por agotamiento

3.3.-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica una secuencia específica de ADN durante varios ciclos en los que la secuencia es copiada fielmente. La reacción aprovecha la actividad del ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar ADN en las células.

Son una forma rápida y muy precisa de diagnosticar ciertas enfermedades infecciosas y cambios genéticos. Las pruebas detectan el ADN o el ARN de un patógeno o células anormales en una muestra. Las PCR pueden detectar una enfermedad en las fases más tempranas de la infección, cuando apenas aparecen síntomas. Las pruebas de PCR pueden detectar una enfermedad cuando hay sólo una cantidad muy pequeña de patógenos en el huésped.

Durante una prueba de PCR, una pequeña cantidad de material genético de una muestra se copia varias veces. El proceso de copia se conoce como amplificación. Si en la muestra hay patógenos, la amplificación se realiza, en caso contrario la prueba resultará negativa para el

patógeno analizado ya que se carece de señal de amplificación en la visualización en gel de agarosa.

3.3.- Electroforesis

Es una técnica que se usa en los laboratorios para separar y visualizar el ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Lo que se hace para realizar esta técnica es utilizar una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel u otra matriz (los poros de estas sirven como tamiz, lo que permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes).

3.4.- CÁMARAS DE MICROFLUIDOS

Las cámaras de microfluidos permiten simular espacialmente nichos ecológicos a escalas micrométricas creando un microambiente controlable mediante la inyección de fluidos de composición diferente a una velocidad y presión constante a través de un canal, que son los chips de microfluidos, fabricados en elastómero de silicona sobre soporte de cristal. Estos chips permiten caracterizar procesos asociados con la colonización vascular de *Xf*; así como otros procesos biológicos.

Los dispositivos de microfluidos permiten desarrollar métodos de diagnóstico de bajo costo, así como el análisis de nuevos tratamientos, reduciendo la cantidad de reactivos a utilizar y permitiendo controlar, integrar y automatizar múltiples ensayos.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Las colecciones de bacterias BXOL, Bacterias del Xilema del olivo, (*Tabla 1*) utilizadas para la conjugación fueron aisladas del xilema de diferentes cultivares de olivo en ediciones anteriores de Fidiciencia. Las BXOL se cultivaron en medio R2A a 28 °C durante dos días, y para el experimento de conjugación se utilizó inóculo líquido. Las bacterias *E.coli* ST18 transformadas con los plásmidos fluorescentes se incubaron a 37°C durante toda la noche (*Tabla 2*). Las placas con la gota de la conjugación se realizaron en R2A ALA⁵⁰ y se incubaron a 28°C durante dos días.

BXOL	GENOTIPO	NICHO	GÉNERO	PHYLUM
5	Picual	Savia	<i>Variovorax</i>	Proteobacteria
125	Acebuché	Savia	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
162	Picual	Tallo	<i>Variovorax</i>	Proteobacteria
182	Arbequina	Tallo	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
200	Acebuché	Tallo	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
215	Acebuché	Tallo	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
225	Acebuché	Tallo	<i>Microbacterium</i>	Actinobacteria
XOL25		Savia	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
XOL31		Savia	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
XOL35		Savia	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
XOL43		Savia	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria

Tabla 1. Colección de bacterias BXOL (Bacterias del Xilema del Olivo) utilizadas para el experimento de conjugación.

Los plásmidos y sus características utilizados para la transformación de las bacterias *E. Coli* se muestran en la Tabla 2

Plásmido	Características
pBBR	No se inserta en el genoma, produce un alto número de copias y puede ser tóxico
RK2	No se inserta en el genoma, produce un bajo número de copias y es más estable
Tn7	<i>Región att</i> está bien conservada en casi todas las bacterias, es más estable y necesita una transposasa

Tabla 2. Características de los plásmidos utilizados para el experimento de conjugación.

4.2.- EXTRACCIÓN DEL ADN

El kit utilizado para la extracción de ADN fue ZYPHY PLASMID miniprep kit.

1. Para empezar, se añaden 600 µl de cultivo bacteriano en medio LB en un tubo de 1,5 ml. El procedimiento fue modificado de la siguiente manera: primero se centrifugó 1,5 ml de cultivo bacteriano durante 30 segundos a velocidad máxima. Después se desechó el sobrenadante. Los dos primeros pasos se repitieron dos veces. Se añadieron 600 µl de TEO agua al pellet de células bacterianas y se resuspendió por completo.
2. Se añadieron 100 µl de 7X lysis buffer (azul) y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces. Después 2 minutos se continuó con el tercer paso. A continuación de la adición de tampón de lisis 7X, la solución cambió de opaca a azul.
3. Se volvió a añadir 350 µl de Neutralization Buffer frío y se mezcla bien. La muestra se volvió amarilla cuando se completó la neutralización y se formó un precipitado amarillento. Se invirtió la muestra 2-3 veces más para asegurar que la neutralización se había completado.
4. Se centrifugó a 11.000 -16.000 x g durante 2-4 minutos. Después el sobrenadante (~ 900 µl) se transfirió a la Zymo-Spin™ IIN column para evitar alterar el sedimento de desechos celulares. La columna se colocó sobre un collection tube y se centrifugó durante 15 segundos. Al terminar, se desechó el líquido y se colocó de nuevo la columna en el mismo collection tube. Después se añadió 200 µl de Endo-Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante 30 segundos. Se volvió a añadir 400 µl de Zippy™ Wash Buffer a la columna y se centrifugó de nuevo durante 1 minuto.
5. Por último, se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml, y se le agregó 30 µl de Zippy™ Elution Buffer directamente a la matriz de la columna y se dejó reposar TM durante un minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó 30 segundos para poder diluir el ADN plasmídico.

La calidad del ADN extraído se comprobó mediante gel de electroforesis al 1% de agarosa, con un voltaje de 125V durante 25 min y se cuantificó con nanodrop.

4.3.- MÉTODO DE CONJUGACIÓN BACTERIANA

1. En primer lugar, se pasó el cultivo líquido de E.coli a un falcon de 50ml y se centrifugó a 4500 g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 2ml, después se resuspendió y se pasó a un eppendorf de 2ml de R2A.
2. En segundo lugar, se centrifugó a 6000 g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, se añadieron 2 ml R2A y se resuspendió de nuevo. El punto 2 se repitió dos veces más.
3. En tercer lugar, se procedió a mezclar las bacterias con los plásmidos con los que conjugará, siguiendo la siguiente pauta:

	pBBR mScarlet	RK2 GFP	Tn7 sYFP	pTNS3	BXOL
pBBR mScarlet	300 μ l				400 μ l
RK2 GFP		300 μ l			400 μ l
Tn7 sYFP			300 μ l	300 μ l	400 μ l

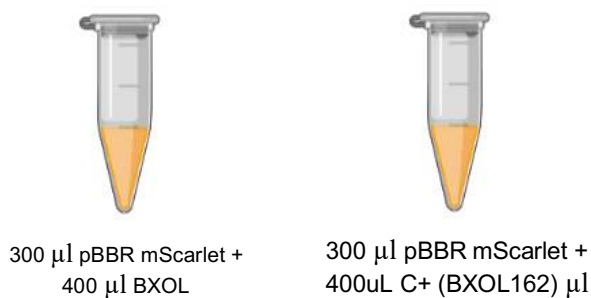
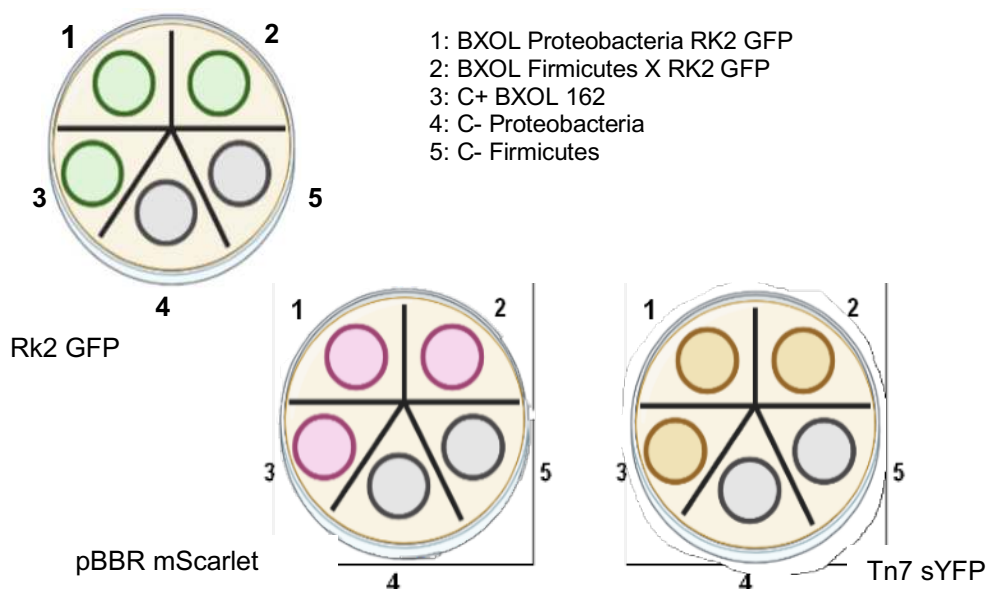


Figura 4. Eppendorf de 2 ml con las bacterias mezcladas.

Dichas bacterias se centrifugaron a 6000 g durante 5 min, se tiró el sobrenadante y se resuspendieron con 25 μ l de R2A. Este paso es muy sensible por lo que hay que resuspender con suavidad.

6. En cuarto lugar, se plaqueó en R2A ALA50, de esta manera:



- Finalmente, se incubaron las placas 28°C durante 2 días. Cuando pasaron dos días se recogió la gota completamente, se resuspendió en 1 ml, y se sembró en una placa de R2A tet¹⁰ 50 µl con ayuda del asa digralsky. Posteriormente, se incubó a 28 °C y cuando se identificaron las colonias aisladas se picaron y se purificaron haciendo pases por agotamiento, comprobando siempre su fluorescencia.

4.4.- COMPROBACIÓN DE TRANSCONJUGANTES

Los transconjugantes seleccionados se comprobaron mediante PCR en la se amplifica (multiplica) un fragmento de ADN para que se pueda detectar. También se usa para identificar fragmentos de ADN de determinadas bacterias, virus o microorganismos para diagnosticar una infección. En nuestro caso usamos esta técnica para comprobar que nuestro genotipo silvestre y el transconjugante es el mismo (y no una contaminación durante el proceso) y detectar la presencia del plásmido en el transconjugante, de esta forma nos aseguramos de que se realizó correctamente la conjugación. Para ello se realizó una extracción rápida de ADN, con la siguiente solución de lisis.

Hidróxido sódico NaOH 2M	25 µl
SDS	25 µl
H2O de PCR	950 µl

Tabla 3. Productos utilizados para realizar la solución de lisis.

El hidróxido sódico ayuda a romper las membranas celulares (lisis celular), el SDS es un detergente que elimina restos de proteínas para liberar y purificar el ADN.

Primero se tomó un volumen de 200 µl de cultivo celular, y se centrifugó 5 min a máxima velocidad. Después se descartó el sobrenadante y se añadió 20 µl de la solución de lisis y se homogenizó por pipeteo. A continuación, se incubó 15 min a 90°C. Se añadió 100 µl de H₂O PCR y se homogenizó con vortex. Se centrifugó 5 min a máxima velocidad y se tomó una alícuota de 80 µl sin coger nada de pellet. Una vez que tuvimos el ADN extraído pudimos pasar a hacer las PCR.

BOX PCR: con esta PCR visualizamos el perfil genético de cada bacteria, de forma que el perfil del tipo silvestre (*wild type*: bacteria sin conjugar) era igual que el transconjugante. El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

BOX PCR					
			n° reaction		15
[inicial]	-	[final]	-	µL per reacion	Vol. a preparar
	ddH2O			5,50	82,50
5	x Buffer			2,00	30,00
10	pmol/ul box	0,3	µM	0,30	4,50
5	u/ul MY TAQ	1	0,6 ud/ 25 µl	0,20	3,00
	Target (µL)			2	30,00
	V. Master Mix			8,00	120,00
	Vt por reacción:			10,00	150,00
			total:		150,00

Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizados para realizar la BOX PCR.

CONDICIONES PCR			
Step	T	Time	
Initial Denaturalization	95	4 min	
Denaturalization	95	30 s	x
Annealing	55	30 s	40
Extension	72	45 s	ciclos
Final Extension	72	5 min	
Keep	12	∞	

Tabla 5. Condiciones para la BOX PCR

PCR de comprobación del mutante: Se realizaron dos tipos de PCR, una para comprobar la presencia de los plásmidos pBBR y RK2; y otra para comprobar la correcta inserción del plásmido Tn7. El resultado de la PCR se visualizó en gel de agarosa al 1%.

RK2 / pBBR PCR				
MASTER MIX			n° reaction	8
[inicial]		[final]	1X (30 µL)	x
			µL per reacion	V a preparar
	dd H2O	-	3,55	28,40
5	x PCR buffer		2,00	16,00
10	µM Primers fv oxp0283	1	1,00	8,00
10	µM Primers rv oxp0284	1	1,00	8,00
20	mg/ml BSA	0,5	0,25	2,00
5	u/µl DNA Pol	1	0,20	1,60
	Target (µL)		2	16,00
	V. Master Mix		8,00	10,00
	Vt por reacción:		10,00	
		Total:		80,00

Tabla 6. Productos utilizados para realizar la PCR.

4.5.- MONTAJE DE MICROCHIPS DE MICROFLUIDOS

Los chips de microfluidos se construyen con los siguientes pasos:

- Se vierte el PDMS (elastómero de silicona).
- Se desgasifica y se hornean a 80°C.
- Se pega el cristal con plasma y se conectan los tubos al chip
- El sistema completo se esteriliza.
- Por último, se monta el experimento y se visualiza en la cámara de microfluidos.

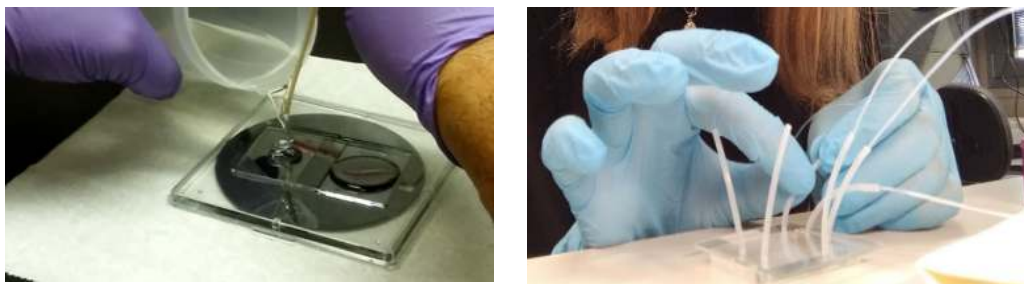
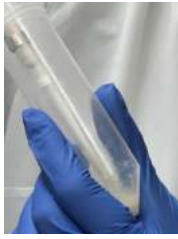


Figura 3: A) Vertido de PDMS, b) Chip completo y conectado a tubos

4.6.- MATERIAL EXPERIMENTAL



Tubos falcon: Tubos de fondo redondo fabricados con poliestireno ópticamente transparente para facilitar la visualización de las muestras



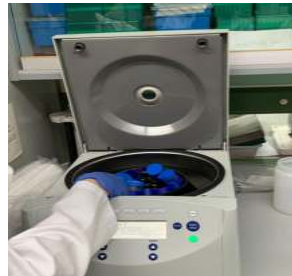
Asa digralsky: instrumento de trabajo utilizado para la siembra de cultivos microbianos (bacterias u hongos)



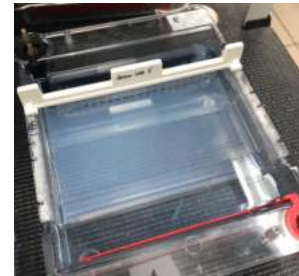
Tubos eppendorf: tubos fáciles de abrir, aunque proporcionan un cierre hermético para evitar la evaporación en PCR



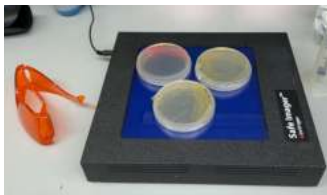
Placas de petri: permite la observación de fenómenos biológicos y siembra de bacterias en medios de cultivo



CENTRIFUGADORA: sirve para la separación de muestras que se quieran analizar por medio de la fuerza centrífuga



Cubeta de electroforesis con gel de agarosa: técnica de separación por tamaños de muestras sometidas a un campo eléctrico. La agarosa es una sustancia que se utiliza para la electroforesis en gel



TRANSILUMINADOR Y GAFAS ESPECIALES: instrumento que produce una luz UV intensa para visualizar las bacterias fluorescentes en los diferentes medios de cultivo. Se debe ver a través de las gafas especiales



PUNTAS DE PIPETAS: para transferir volúmenes precisos de líquido de un recipiente a otro



PAPEL ALUMINIO: para recubrir los matraces aforados



PARAFILM: impide la evaporación y la contaminación de las muestras; protege los materiales anhidros



PIPETAS: instrumento usado para medir el volumen de los líquidos; es de gran precisión que mide la alícuota de un líquido



BATAS: protección del trabajador que la viste, tanto si se trabaja con sustancias delicadas como si está cara al público



GUANTES: protege la mano o parte de ésta



VASO DE PRECIPITADO: construido principalmente de vidrio borosilicato, un material refractario de gran resistencia al calentamiento y con un bajo coeficiente de expansión térmica.



ERLENMEYER: se utiliza para preparar soluciones o contener, recolectar muestras o soluciones. También se utilizan para realizar reacciones químicas u otros procesos, como mezclar, calentar, enfriar y disolver.



ROTULADOR: diseñados para escribir sobre superficies húmedas o secas de material plástico desechable, material de vidrio, porcelana.



VITRINA DE GASES: son equipos de protección colectiva muy útiles para el control de la exposición ambiental a contaminantes químicos en el laboratorio.



AGITADOR: se utiliza para mezclar de manera homogénea disoluciones y suspensiones para los ensayos y pruebas.



BALANZA DE LABORATORIO Y ESPÁTULA: pesa diversas sustancias. La espátula se usa para romper, raspar, recoger y transferir productos químicos sólidos, en polvo o gránulos de los frascos de almacenamiento.



GRADILLAS: Pueden estar hechas de metal, madera o plástico. Contiene diversos espacios huecos que están destinados a sostener y almacenar tubos de ensayo.



BOTE DE VIDRIO BLANCO: sirve para mezclar, separar, condensar o contener y manipular los productos químicos y su entorno para crear las condiciones de reacción deseadas



Maquina de PCR: Termocicladores nos permiten realizar ciclos de temperatura correctos y óptimos para conseguir una reacción de secuencias.



Nanodrop: espectrofotómetro que mide la variación de la absorbancia con una micro-gota

4.7.-PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

- Sesión 1. 23/11/22. (4 horas): Presentación y conceptos teóricos sobre patógenos vasculares: *Verticillium dahliae* y *Xylella fastidiosa*. Visita al laboratorio de contención biológica de nivel 2 para *Xylella fastidiosa*. Inoculación del medio de cultivo de E.coli transformada con plásmidos de interés en medio líquido. Extracción del ADN plasmídico con kit comercial, cuantificación del ADN y comprobación de la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y nanodrop.
- Sesión 2. 11/01/23. (4 horas): Proceso de conjugación bacteriana con bacterias aisladas de la savia del olivo (BXOL: Bacterias del Xilema del Olivo) y cepas *E. coli* portadoras de los plásmidos de interés.
- Sesión 3. 8/02/23. (4 horas): Visualización de los resultados de la conjugación y realización de pases para la purificación de las bacterias transconjugantes (transformadas). Realización de PCR para verificar la obtención de transconjugantes y la comprobación de la presencia de los plásmidos.
- Sesión 4. 8/03/23. (4 horas): Teoría sobre cámaras de microfluidos. Montaje de chips de microfluidos y visualización de las bacterias transformadas con diferentes colores al microscopio de fluorescencia.
- Sesiones online mediante documentos compartidos en Google-Drive. Se trabajaron los documentos en forma de plantilla en carpetas compartidas por google drive. De esta manera, todo el grupo trabajó en el desarrollo de todos los apartados conjuntamente y pudieron seguir las indicaciones de los tutores-investigadores. Se realizó la memoria junto con la planificación del póster y presentación para la defensa oral.

5.- RESULTADOS

5.1.- INOCULACIÓN EN MEDIO DE CULTIVO DE *E. COLI* TRANSFORMADA CON PLÁSMIDOS DE INTERÉS

E.coli se sembró en un medio de cultivo, utilizando la técnica de agotamiento y se incubaron en cámara de cultivo a una temperatura óptima para su crecimiento a fin de que se desarrolle.

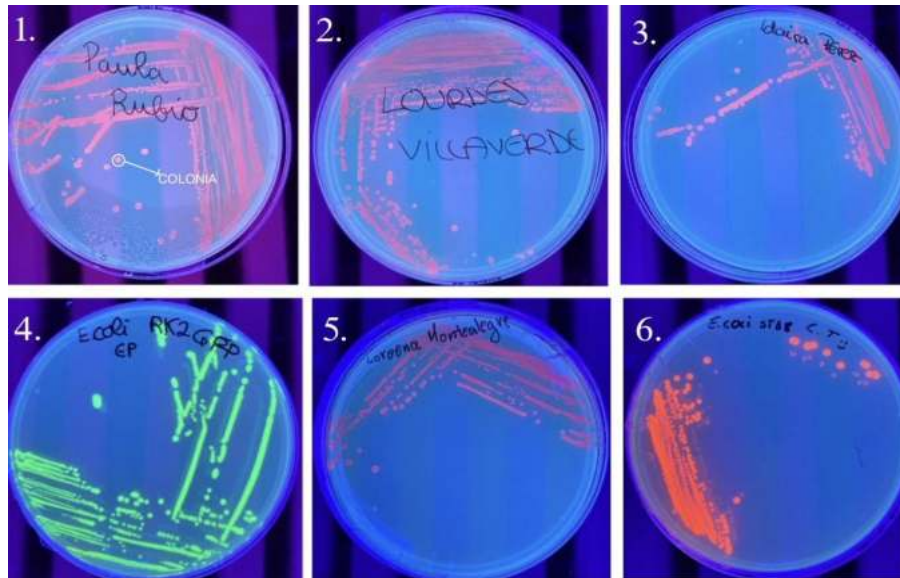


Figura 4. Placas de petri con *E.coli* modificadas genéticamente con proteínas fluorescentes y sembradas por agotamiento.

Como se puede ver (Figura 4), todas las bacterias habían adquirido el plásmido fluorescente y la técnica de siembra por agotamiento se realizó de manera correcta, puesto que podemos apreciar las colonias aisladas, como se señala en la placa número 1. De esta manera se comprobó que las bacterias *E.coli* cogieron el plásmido que les aporta fluorescencia y por tanto se podían utilizar en los siguientes pasos de la investigación.

Posteriormente, con el fin de comprobar la calidad del ADN y la presencia de contaminantes en las muestras, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. La cantidad de ADN extraído se cuantificó con nanodrop.

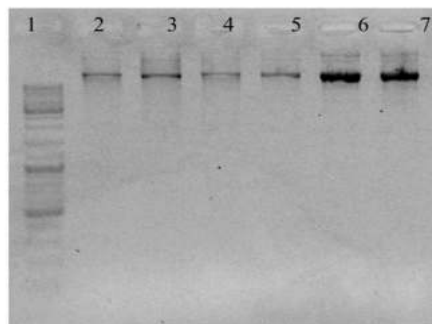


Figura 5. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico extraído con kit comercial de un medio de cultivo de *E.coli* transformada con plásmidos de interés.

En el gel de agarosa (Figura 5) se puede ver que el ADN extraído era de buena calidad al observarse bandas definidas en las diferentes muestras. La primera banda (número 1) corresponde con el marcador de peso molecular y se utilizó como control. El resto de las bandas corresponden a las 6 muestras de ADN que se extrajeron. La intensidad que presentaron las bandas fue directamente proporcionales a la concentración de ADN. Por tanto, las muestras situadas en el pocillo número 6 y el pocillo número 7 con mayor grosor e intensidad en las bandas, presentan mayor concentración de ADN. En cambio, el resto de las muestras de los pocillos número 2, 3, 4 y 5 presentaron una concentración menor.

Para determinar si el ADN extraído se encontraba en una concentración apropiada para usarse para hacer un PCR, se cuantificó con nanodrop.

Sample ID	ng/ μ l	260/280	260/230
Muestra 1	68,89	1,04	0,22
Muestra 2	119,28	1,022	0,33
Muestra 3	66,57	1,03	0,21
Muestra 4	68,24	1,05	0,23
Muestra 5	85,24	1,31	0,35
Muestra 6	86,41	1,34	0,37

Tabla 7. Cuantificación con nanodrop del ADN plasmídico extraído de un medio de cultivo de *E.coli* transformada con plásmidos de interés

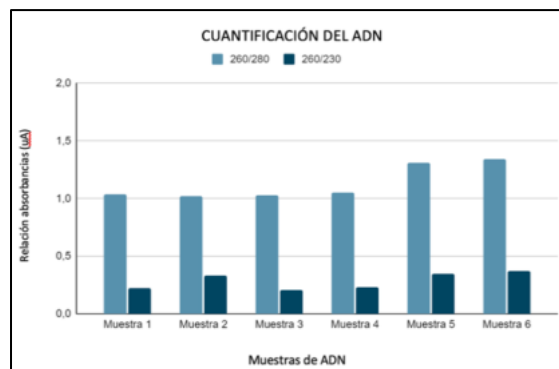


Figura 6. Cuantificación con nanodrop del ADN plasmídico extraído de un medio de cultivo de *E.coli* transformada con plásmidos de interés.

La relación 260/280 muestra la pureza del ADN y del ARN (Tabla 7 y Figura 6). Se basa en que a 260nm es la longitud de onda en la se miden ambos ácidos nucleicos, mientras que a 280nm se miden las proteínas. La relación recomendada debe estar entre 1,8 y 2,1. En caso de ser inferior, puede indicar la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Los resultados de nuestras muestras no están mal a pesar de ser algo inferiores a lo recomendado, ya que la diferencia no es mucha. Es por ello por lo que podemos decir que nuestras muestras no estaban contaminadas

La relación 260/230 es utilizada como medida secundaria de pureza del ácido nucleico. Se basa en que a 260 nm se miden los ácidos nucleicos, mientras que a 230 nm se miden las sustancias químicas que quedan en la muestra desde el paso de aislamiento. Sus valores deben estar entre 2,0 y 2,2. En caso de estos valores ser inferiores podría indicar presencia de contaminantes, que absorben a 230 nm. Como se puede observar en la tabla 1, los análisis de nuestras muestras de ADN han dado como resultado valores 260/230 bastante inferiores a los valores recomendables, pudiendo significar que estuvieron demasiado rato con el buffer de lavado y se contaminaron.

Además, podemos observar que, en comparación de estos valores entre sí, a pesar de ser inferiores a lo recomendado, se encuentran en proporción con los valores de la relación 260/280. Es decir, las muestras con una relación 260/280 inferior a otras muestras, también tienen una relación 260/230 inferior al resto. Lo mismo ocurre con las que tienen valores algo menos inferiores. Se observa entonces una proporción entre los datos de ambas relaciones.

5.2.- CONJUGACIÓN BACTERIANA CON BACTERIAS DE LA SAVIA DEL OLIVO (BXOL: BACTERIAS DEL XILEMA DEL OLIVO) Y CEPAS *E. COLI* PORTADORAS DE PLÁSMIDOS DE INTERÉS

Una vez inoculado y cultivado las bacterias *E. coli* con los plásmidos fluorescentes y las bacterias BXOL para que conjuguen, se sembraron en placas de petri y se obtuvieron los siguientes resultados:

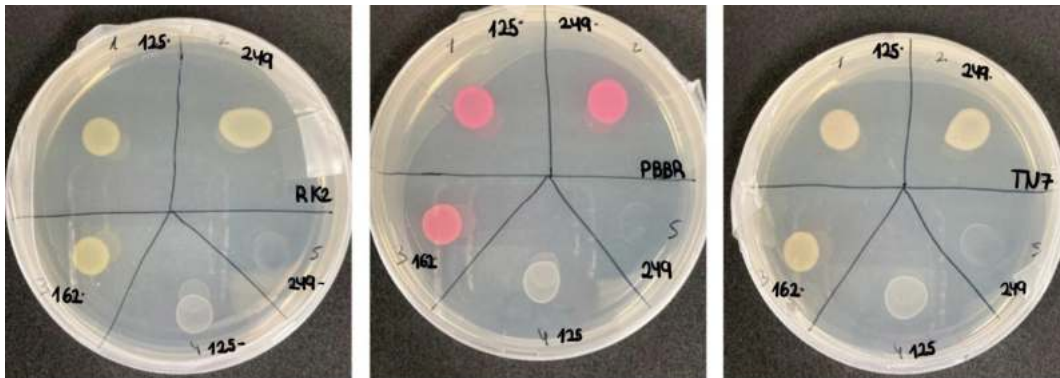


Figura 7. Placas de petri con *Methylobacterium* (125) y *Bacillus* (249) conjugadas con tres plásmidos distintos (RK2-GFP, pBBR-mScarlet y Tn7-sYFP), y también sin conjugar como control negativo. Además, Varioborax (162) como control también conjugada con todos los plásmidos.



Figura 8. Placas de petri con *Microbacterium* (225) y *Bacillus* (249) conjugadas con tres plásmidos distintos (RK2-GFP, pBBR-mScarlet y Tn7-sYFP), y también sin conjugar como control negativo. Además, Varioborax (162) como control también conjugada con todos los plásmidos.

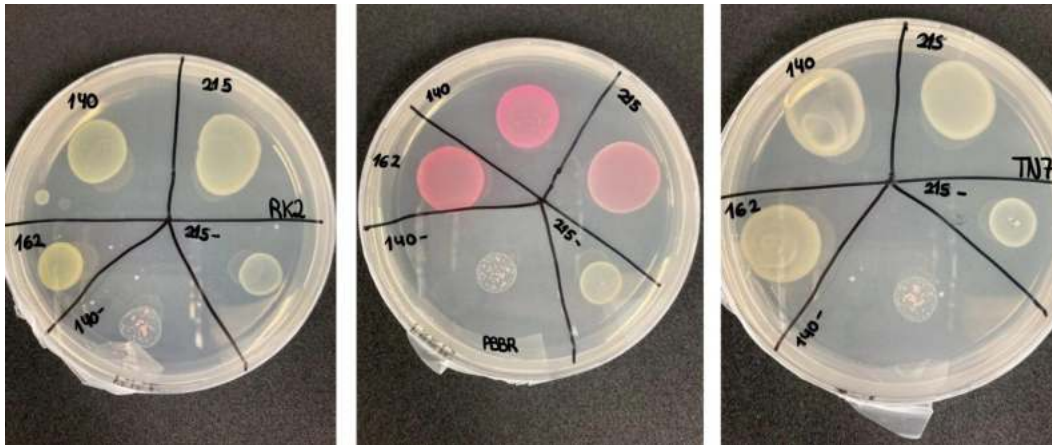


Figura 9. Placas de petri con *Methylobacterium* (BXOL140) y *Bacillus* (215) conjugadas con tres plásmidos distintos (RK2-GFP, pBBR-mScarlet y Tn7-sYFP), y también sin conjugar como control negativo. Además, *Varioborax* (162) como control también conjugada con todos los plásmidos.

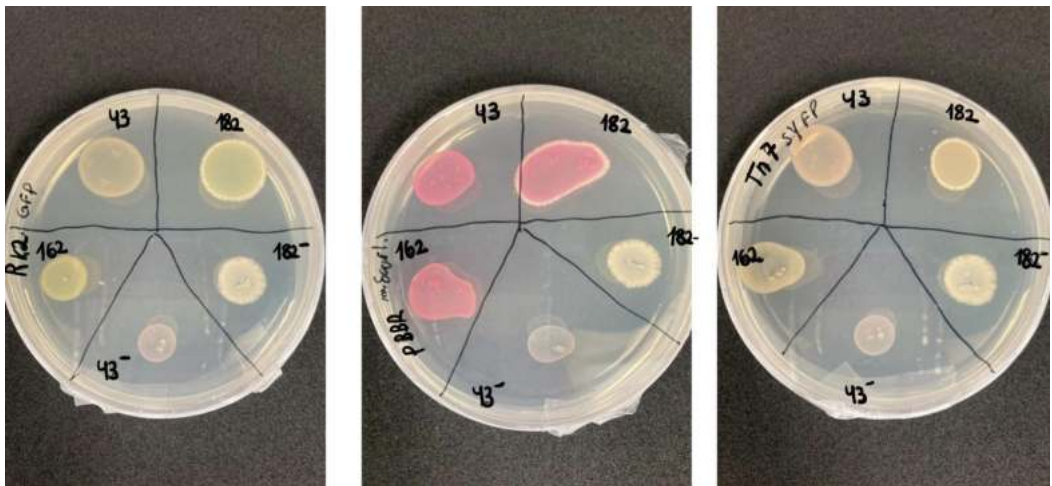


Figura 10. Placas de petri con *Methylobacterium* (43) y *Bacillus* (182) conjugadas con tres plásmidos distintos (RK2-GFP, pBBR-mScarlet y Tn7-sYFP), y también sin conjugar como control negativo. Además, *Varioborax* (162) como control también conjugada con todos los plásmidos.

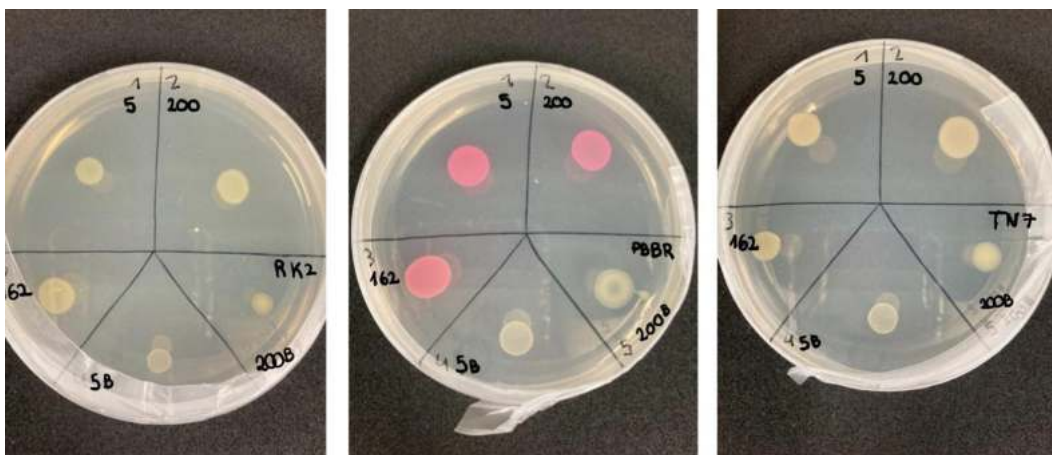


Figura 11. Placas de petri con *Varioborax* (5) y *Curtobacterium* (200) conjugadas con tres plásmidos distintos (RK2-GFP, pBBR-mScarlet y Tn7-sYFP), y también sin conjugar como control negativo. Además, *Varioborax* (162) como control también conjugada con todos los plásmidos.

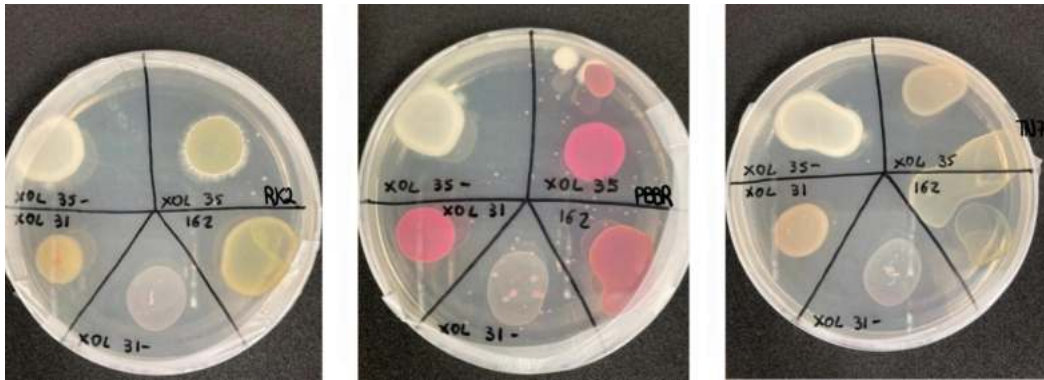


Figura 12. Placas de petri con *Bacillus* (35) y *Methylobacterium* (31) conjugadas con tres plásmidos distintos (RK2-GFP, pBBR-mScarlet y Tn7-sYFP), y también sin conjugar como control negativo. Además, *Varioborax* (162) como control también conjugada con todos los plásmidos.

Se puede observar desde la Figura 7 a la 12, que las bacterias tuvieron un desarrollo y crecimiento correcto a los 2 días, ya que todas las gotas de la conjugación crecieron correctamente. Además la mayoría de los controles negativos, bacteria sin *E.coli*, estaban correctos ya que no hubo contaminación cruzada salvo las placas de las Figuras 12. La purificación de estas placas donde hubo contaminación por aerosoles durante el pipeteo se realizó con especial precaución evitándolas y realizando más pases de purificación.

Para evitar esta dispersión en futuros experimentos, se utilizaron pipetas con punta recortada para que el volumen denso salga a una presión inferior por la punta.

5.3.- COMPROBACIÓN A TRAVÉS DE PCR DE LOS TRANSCONJUGANTES, ASÍ COMO LA CORRECTA INSERCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Las gotas de conjugación (Figuras 7 a la 12) fueron purificadas en medio R2A con tetraciclina 10µg/ml. Se realizaron al menos 3 pases de purificación, para asegurar que no quedaban restos de *E.coli* y para comprobar que los transconjugantes no perdieran el plásmido. En cada pase se comprobó además la fluorescencia de cada transconjugante (Figura 13). Obteniendo crecimiento en las cepas 162, 35, 25, 5 y 215.

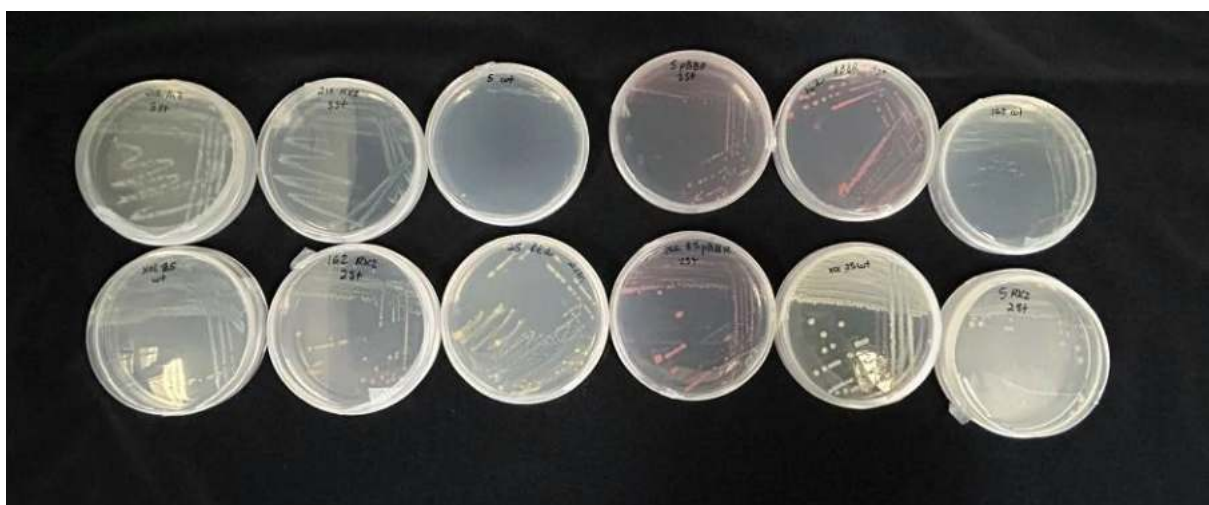


Figura 13. Placas resultantes de los pases por agotamiento con bacterias fluorescentes tras la conjugación para su purificación.

Los transconjugantes que tenían fluorescencia y crecimiento en medio con tetraciclina (bacterias 162,5,25,35 y 215) fueron analizadas por PCR para determinar si el transconjugante que estaba creciendo era el mismo con el que se inició el experimento o por el contrario se requerían más pasos de purificación, por lo que se realizó la BOX PCR. En el gel, Figura 14 se puede visualizar que los perfiles de los transconjugantes 162, 5 y 25 (en amarillo) correspondían con el genotipo silvestre. Sin embargo, los transconjugantes 35 y 215 (en naranja) no tienen los perfiles iguales al silvestre, por lo tanto esto puede deberse a una contaminación durante el proceso o que quedan restos de *E.coli*.

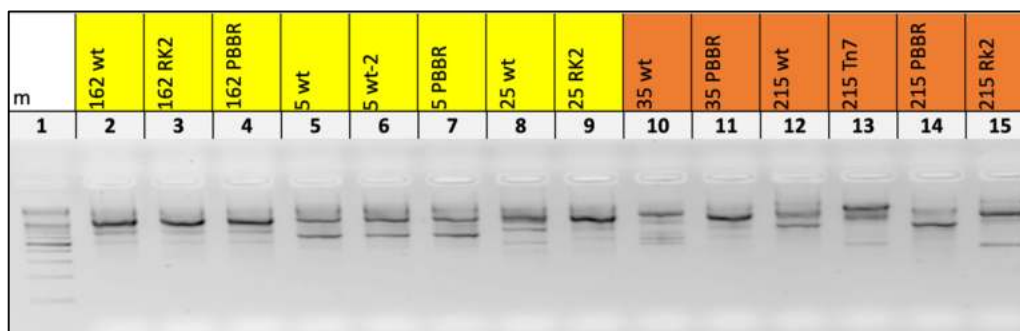


Figura 14. Resultados de las PCR. Color amarillo, transconjugantes confirmadas que son iguales que la cepa silvestre (wt: wild type)

Los transconjugantes en los que se obtuvo el mismo perfil que la cepa silvestre se analizó la presencia del plásmido. Para comprobar la correcta inserción del plásmido se realizó una segunda PCR (Figura 15), para ver la correcta amplificación de las muestras, lo que nos determina si estos transconjugantes están bien construidos.

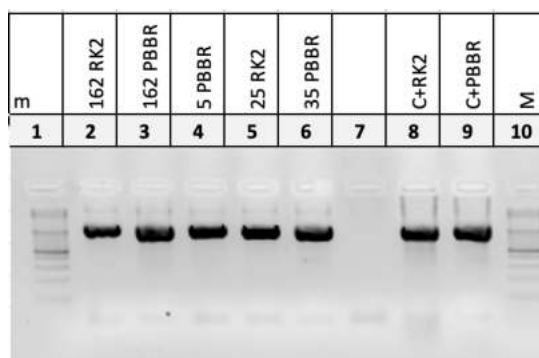


Figura 15. Resultados de las PCR para detectar inserción del plásmido

Por lo tanto, los transconjugantes válidos fueron: la 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. Por el contrario, la BXOL35 con el plásmido PBBR y la BXOL215 con los plásmidos Tn7,RK2 y PBBR no se dan por válidos los transconjugantes debido a que el perfil genético de la BOX PCR no es igual que el genotipo silvestre.

Sin embargo, la BXOL 215 wt y la BXOL 215 pBBR tiene un perfil en la BOX PCR similar, no se llegó a realizar la comprobación de la introducción del plásmido, ya que tuvo un crecimiento muy diferente en los pases por agotamiento que el resto, ya que pudimos observar un supercrecimiento, cuando se inoculó por agotamiento la cepa silvestre, detectamos que a esas concentraciones de antibiótico era capaz de crecer, y no se pudo realizar una correcta purificación de esta cepa. Además, de esta

resistencia al antibiótico, esta cepa presentó una fluorescencia menor que las demás cepas, debido a la posible mezcla entre transconjugantes y la cepa silvestre. En los futuros proyectos, se realizará un estudio para evaluar la CMI, o concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja (en µg/ml) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana, para determinar una concentración válida para su purificación, o cambiar la construcción del plásmido, introduciendo un nuevo gen con otra resistencia a un antibiótico diferente.

El resto de bacterias que no han conseguido con éxito realizar la conjugación puede deberse a la falta de mecanismos de introducción de material genético en su interior, no contengan las proteínas necesarias para crear el pili por donde se traspasa el plásmido, o bien a un fallo en los genes de movilización del ADN impidiendo el paso del ADN y por último también pudo haber fallo en los genes estabilizadores o en los de exclusión superficial de la bacteria. En futuros trabajos para asegurar que no fuera problema de los mecanismos bacterianos de la conjugación, se intentaría disminuir la concentración de antibiótico utilizada, ya que quizás la resistencia a antibiótico junto con la producción de proteína fluorescente sea demasiado gasto energético, por lo que una disminución puede aumentar las posibilidades del crecimiento de las BXOL.

Los siguientes pasos a seguir serán investigar la capacidad de crecimiento de los transconjugantes en las cámaras de microfluidos y evaluar la posibilidad de que uno de los transconjugantes se utilice como antagonista frente a *Xf* o *Vd*.

8. CONCLUSIONES

- *E.coli* es una bacteria fácil de transformar, la cuál se puede utilizar en la conjugación.
- Las bacterias tuvieron un desarrollo y crecimiento correcto y adquirieron los plásmidos fluorescentes conjugados por las bacterias *E.coli*.
- 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.
- Las bacterias BXOL35 del género *Firmicutes* con el plásmido PBBR y la BXOL215 también del género *Firmicutes* con los plásmidos Tn7, RK2 y PBBR no se dan por válidos los transconjugantes debido a que el perfil genético de la BOX PCR no es igual que el genotipo silvestre.

9. AGRADECIMIENTOS

Finalmente queremos agradecer a los investigadores del centro de investigación IAS-CSIC por habernos permitido entrar a sus laboratorios, ayudarnos y guiarnos en este proyecto, en especial a Pilar Velasco Amo que ha sido nuestra guía a la hora de realizar esta investigación sobre la modificación genética de bacterias para su uso como agente de biocontrol frente a patógenos vasculares.

Al grupo Protección de cultivos por habernos permitido el paso a sus instalaciones y el uso de sus materiales, así como por habernos enseñado uno de los mayores laboratorios de bioseguridad.

A nuestra coordinadora del proyecto Elena León Rodríguez, que nos ha guiado en este proyecto de investigación y a los profesores del IES Fidiana y el CES Lope de Vega que han sido nuestros acompañantes para las sesiones en los centros de investigación.

Al proyecto Fidiciencia 2.0 por habernos proporcionado la oportunidad de participar en estos proyectos, poniéndose en contacto con el IAS CSIC y sus investigadores y haber logrado conseguir unas investigaciones a nuestro alcance y a la Junta de Andalucía por la concesión del Proyecto de Innovación Educativa y Desarrollo Curricular **Fidiciencia 2.0**.

Al IES Fidiana y al CES Lope de Vega por facilitarnos el acercamiento a un proyecto de investigación.

A nuestros padres, por apoyarnos y hacer posible que desarrollemos nuestros conocimientos tanto dentro como fuera del instituto.

10. BIBLIOGRAFÍA

Velasco Amo, P.M, Vicent A., Zarco -Tejada, P.J, Navas Cortés J.A, Landa B.(2022): Recent research accomplished on early detection of *Xylella fastidiosa* outbreaks in the Mediterranean Basin. *Phytopathologia Mediterranea* 61(3): 549-561, 2022 ([Link](#))

Portillo G. (2017). *Verticillium*. *JardineriaOn*. ([Link](#))

Consejo Europeo de la Unión Europea. Fitosanidad. ([Link](#))

Olga Martín, Bernardo González, María Josefina Poupin. From Microbial Dynamics to Functionality in the Rhizosphere: A Systematic Review of the Opportunities With Synthetic Microbial Communities. *Frontiers*. ([Link](#))

Leonardo De La Fuente, Emilie Montanes, Yizhi Meng, Yaxin Li, Thomas J. Burr, H. C. Hoch, Mingming Wu. Assessing Adhesion Forces of Type I and Type IV Pili of *Xylella fastidiosa* Bacteria by Use of a Microfluidic Flow Chamber. *ASM Journal*. ([Link](#))

Hong, C. E., and Park, J. M. (2016). Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. *Plant Biotechnol. Rep.* 10, 353–357. doi: 10.1007/s11816-016-0423-6

Weller, D.M.; Raaijmakers, J.M.; Gardener, B.B.M.; Thomashow, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2002, 40, 309–348. [CrossRef] [PubMed]

Anguita-Maeso, M.; Trapero-Casas, J.L.; Olivares-García, C.; Ruano-Rosa, D.; Palomo-Ríos, E.; Jiménez-Díaz, R.M.; Navas-Cortés, J.A.; Landa, B.B. *Verticillium dahliae* inoculation and in vitro propagation modify the xylem microbiome and disease reaction to *Verticillium* wilt in a wild olive genotype. *Front. Plant Sci.* 2021, 12, 250. [CrossRef]

Hayley E., B. Jorritz, T. Hasket, P. Poole (2021) Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. Environmental microbiology reports. Vol 13.:4, pag 428-444 ([Link](#))

Velasco-Amo M.P. (2022) ¿Científica o paparazzi?, elDiario.es. elDiario.es. Disponible: https://www.eldiario.es/andalucia/la-cuadratura-del-circulo/cientifica-paparazzi_132_8940446.html (Acceso: noviembre 2, 2022).

Landa B. B., Marco-Noales E. y López M. M. (2017) Enfermedades causadas por la bacteria "Xylella fastidiosa". Almería: Cajamar Caja Rural. Disponible: <https://publicacionescajamar.es/series-tematicas/informes-coyuntura-monografias/enfermedades-causadas-por-la-bacteria-xylella-fastidiosa>

Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2007). Introducción a la microbiología – 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Jiménez Díaz R.M., Castillo P., Landa B.B., Montes Borrego M., Olivares García C., Palomares Rius J.E., Trapero Casas J. L., y Navas Cortés J. A. Avances en la investigación sobre el control de la verticilosis del olivo. Vida Rural 1 marzo 2015. Disponible: [https://www.ias.csic.es/rmjimenez/docs/divulgacion/72 Jimenez Diaz et al. 2015. Avances en la investigacion Verticilosis del olivo Vida Rural.pdf](https://www.ias.csic.es/rmjimenez/docs/divulgacion/72_Jimenez_Diaz_et_al_2015_Avances_en_la_investigacion_Verticilosis_del_olivo_Vida_Rural.pdf)