

Microbiología de Plantas

VII REUNIÓN
DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN
MICROBIOLOGÍA DE PLANTAS
DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

LIBRO DE RESÚMENES

PATROCINADO POR:

EXHIBICIÓN DE LOGOS



Duerolab, S.L.
Equipamiento de Laboratorio



ORGANIZADO POR:

ORGANIZADO POR:



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Sal
800 AÑOS
1218 - 2018



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



IRNASA
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca



COMITÉ ORGANIZADOR

Comité Organizador:

Presidente

Pedro F. Mateos

Universidad de Salamanca

Vicepresidentes

Dra. Paula García Fraile

Universidad de Salamanca

Dr. José Mariano Igual Arroyo

IRNASA-CSIC, Salamanca

Dra. Pilar Martínez Hidalgo

Universidad de Salamanca

Dra. Esther Menéndez Gutiérrez

Universidad de Salamanca

Dr. Álvaro Péix Geldart

IRNASA-CSIC, Salamanca

Dra. Martha Helena Ramírez Bahena

Universidad de Salamanca

Dr. Raúl Rivas González

Universidad de Salamanca

Dra. Encarna Velázquez Pérez

Universidad de Salamanca

Comité Colaborador Local

Lorena Celador Lera

Universidad de Salamanca

Xavier Alexis Cruz González

Universidad de Salamanca

Alexandra Díez Méndez

Universidad de Salamanca

José David Flores Félix

Universidad de Salamanca

María Fradejas Bayón

Universidad de Salamanca

Alejandro Jiménez Gómez

Universidad de Salamanca

Marta Marcos García

Universidad de Salamanca

Comité Científico

Dra. Emilia López Solanilla

Universidad Politécnica de Madrid

Dra. Marta Martín Basanta

Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Eustoquio Martínez Molina

Universidad de Salamanca

Dr. Antonio de Vicente Moreno

Universidad de Málaga



íNDICE

Sesión I: Bacterias implicadas en biocontrol

S1.01. La protección inducida por L81 implica las glucanasas (PR2) y quitinasas (PR3) en <i>A. thaliana</i> y <i>Rubus</i> sp. cv Loch Ness. E. Gutierrez Albánchez <i>et al.</i>	1
S1.02. Análisis genómico del regulón directo de FleQ en la cepa de biocontrol <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113. E. Blanco Romero <i>et al.</i>	2
S1.03. El sistema de secreción de tipo VI (T6SS) de <i>Pseudomonas putida</i> protege a las plantas del ataque de fitopatógenos. P. Bernal <i>et al.</i>	3
S1.04. Análisis de la comunidad microbiana de un suelo supresivo en el cultivo del aguacate. C. Vida <i>et al.</i>	5
S1.05. Selección de cepas PGPR para estimular la protección frente a <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 en plantas de brócoli. H. Martín Rivilla <i>et al.</i>	6
S1.06. Bacterias rizosféricas y fitopatógenas como fuente de metabolitos secundarios activos frente a bacterias, hongos, oomicetos y nemátodos. M. A. Matilla <i>et al.</i>	7

Sesión II: Interacciones hongos patógenos-planta

S2.01. The callose priming pathway. D. Mateu <i>et al.</i>	9
S2.02. FTF2, el gen del genoma central de la familia FTF de <i>Fusarium oxysporum</i> , está implicado en el reconocimiento del hongo por la planta. V. Casado del Castillo <i>et al.</i>	11
S2.03. El análisis transcriptómico y farmacológico de un mutante de <i>Botrytis cinerea</i> deficiente en la enzima flavohemoglobina demuestra que el óxido nítrico afecta a la germinación, la replicación del ADN y el ciclo celular. F. Anta <i>et al.</i>	13
S2.04. Análisis genético de las diferencias de agresividad entre aislados de campo de <i>Botrytis cinerea</i> recogidos sobre vid. W. Acosta <i>et al.</i>	15
S2.05. El análisis RNA-seq dual como herramienta para el estudio de la interacción melón- <i>Podosphaera xanthii</i> . A. Polonio <i>et al.</i>	16
S2.06. El modelado proteico como herramienta para el análisis funcional de efectores haustoriales de <i>Podosphaera xanthii</i> . J. García Sánchez <i>et al.</i>	17
S2.07. Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a la enfermedad de raíz rosada en la producción de cebolla (<i>Allium cepa</i>) en Costa Rica. W. Rivera Méndez <i>et al.</i>	18

Sesión III: Interacciones bacterias patógenas-planta

S3.01. El análisis pangenómico como herramienta para la detección de genes asociados a virulencia en <i>Xanthomonas arboricola</i> y el desarrollo de métodos para la detección e identificación de cepas causantes de la mancha bacteriana en frutales del género <i>Prunus</i> . J. Garita Cambrónero <i>et al.</i>	20
S3.02. Análisis bioinformático y funcional del sistema de secreción tipo III en cepas de <i>Pseudomonas savastanoi</i> aisladas de diversos huéspedes. A. Moreno Pérez <i>et al.</i>	22
S3.03. Expresión heterogénea de genes relevantes para la virulencia de <i>Pseudomonas syringae</i> . N. López Pagán <i>et al.</i>	23

S3.04. Papel de las proteínas reguladoras CsrA en <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000. M. T. Gallegos <i>et al.</i>	24
S3.05. Papel del silenciamiento génico en la regulación de genes de resistencia durante la interacción con <i>Pseudomonas syringae</i> . D. López Márquez <i>et al.</i>	26
S3.06. El efector bacteriano HopZ1a acetila al regulador positivo de defensa ZIP1. J. Rueda Blanco <i>et al.</i>	28
S3.07. Estrategias complementarias para la caracterización de quimiorreceptores de bacterias fitopatógenas. J. P. Cerna Vargas <i>et al.</i>	30
S3.08. Primera detección en España de necrosis bacteriana de la dipladenia y caracterización fenotípica de su agente causal (<i>Pseudomonas savastanoi</i>). E. Caballo-Ponce <i>et al.</i> F. Aprile <i>et al.</i>	32
S3.09. Aislamiento de cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> asociadas a mango para su uso en análisis evolutivos y epidemiológicos. F. Aprile <i>et al.</i>	33
S3.10. Estudio de la interacción de <i>Bacillus cereus</i> responsable de intoxicaciones eméticas en humanos con la superficie de hojas y frutos. M. Antequera Gómez <i>et al.</i>	34
Sesión IV: Microbiología molecular de las interacciones bacterias beneficiosas-planta	
S4.01. Análisis transcriptómico de la bacteria endófito <i>Azoarcus</i> sp. CIB: identificación de genes implicados en la interacción con planta. H. Fernández Llamosas <i>et al.</i>	35
S4.02. Señalización de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL1606 en la rizosfera durante las interacciones multitróficas. S. Tienda <i>et al.</i>	37
S4.03. Análisis de la regulación del diGMPc por AmrZ en <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113. C. Muriel <i>et al.</i>	38
S4.04. Regulación de la producción del β -glucano de enlaces mixtos MLG en <i>Sinorhizobium meliloti</i> . D. Pérez Mendoza <i>et al.</i>	39
S4.05. Study of new genes of <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 which are symbiotically regulated: flgJ is involved in the genistein-induced surface motility exhibited by this strain. P. Navarro-Gómez <i>et al.</i>	41
S4.06. Riborregulación de la fijación simbiótica de nitrógeno en <i>Sinorhizobium meliloti</i> . M. Robledo <i>et al.</i>	42
S4.07. Caracterización del sistema de secreción de tipo VI en <i>Rhizobium etli</i> Mim1. A. Salinero <i>et al.</i>	43
S4.08. NodD2 de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 es responsable de la síntesis de factores de nodulación en presencia de estrés osmótico e independiente de flavonoides. P. del Cerro <i>et al.</i>	45
S4.09. Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> a diferentes hospedadores. M. Ballesteros <i>et al.</i>	47
S4.10. Implicación de poliaminas bacteroidales en la respuesta al estrés salino en la simbiosis <i>Rhizobium tropici</i> - <i>Phaseolus vulgaris</i> . C. Lluch <i>et al.</i>	49

Sesión V: Bacterias probióticas de plantas

S5.01. Mejora del rendimiento de cultivos de canónigos mediante el empleo de una nueva especie de bacteria endófito de maíz. L. Celador-Lera <i>et al</i>	51
S5.02. Estudio y análisis de la inoculación de <i>Rhizobium laguerreae</i> en cultivos de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i> L.). A. Jiménez-Gómez <i>et al</i>	53
S5.03. Mejora de la producción de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>) mediante la inoculación de <i>Phyllobacterium endophyticum</i> . J. D. Flores-Felix <i>et al</i>	54
S5.04. Efectos agronómicos de la inoculación de <i>Bacillus siamensis</i> en el cultivo de pimiento (<i>Capsicum annuum</i>). R. Pastor Bueis <i>et al</i>	56
S5.05. <i>Mesorhizobium helmanticense</i> , una nueva especie endosimbionte que favorece el crecimiento de <i>Lotus corniculatus</i> . M. Marcos García <i>et al</i>	58
S5.06. Análisis y efecto del uso de biofertilizantes en <i>Trifolium rubens</i> L., planta de atención preferencial en Castilla y León, España; con el propósito de incrementar su estado de conservación. X. Cruz González <i>et al</i>	60
S5.07. Interacción de <i>Rhizobium cellulosityticum</i> ALA10B2 con leguminosas. A. Díez Méndez <i>et al</i>	62

Sesión VI: Hongos probióticos de plantas

S6.01. Optimización del sistema de edición génica CRISPR-Cas9 en especies de <i>Trichoderma</i> . M. Sánchez Cao <i>et al</i>	64
S6.02. <i>Trichoderma harzianum</i> : De hongo beneficioso a patógeno sistémico. El papel del ácido salicílico. J. Poveda <i>et al</i>	66
S6.03. Sugar homeostasis mediates arbuscular mycorrhizal fungi-induced resistance against <i>Botrytis cinerea</i> . N. Sanmartin <i>et al</i>	68
S6.04. Abiotic stress or aboveground activation of plant defenses differentially impacts root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi. J. Lidoy <i>et al</i>	70
S6.05. Hongos endófitos en poblaciones naturales de <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>pruinosa</i> en acantilados de la costa Atlántica. E. Pereira <i>et al</i>	71
S6.06. Regulación del óxido nítrico y las hemoglobinas de plantas en el reconocimiento del huésped de hongos beneficiosos y patógenos. L. Pescador-Azofra <i>et al</i>	73
S6.07. Promoción de crecimiento vegetal y absorción de P en suelos tropicales por un hongo solubilizador de P inmovilizado en alginato de calcio. L. Osorno <i>et al</i>	75

Sesión VII: Diversidad y ecología de bacterias asociadas a plantas

S7.01. Diseño de un sistema basado en PCR para la clasificación rutinaria de cepas aisladas y muestras ambientales en grupos filogenómicos del complejo de especies <i>Pseudomonas fluorescens</i> . D. Garrido-Sanz <i>et al</i>	77
S7.02. Análisis de la diversidad y caracterización de bacterias endófitas de plantas leguminosas nativas de suelos mediterráneos. E. Menéndez <i>et al</i>	78
S7.03. Identificación de bacterias rizosféricas aisladas de jarales del noroeste ibérico. R. Mulas <i>et al</i>	80

S7.04. La invasión del campo rupestre brasileño por la gramínea <i>Melinis minutiflora</i> es impulsada por la alta disponibilidad de N en el suelo y cambios en el ciclo del nitrógeno mediados por las comunidades microbianas. M. H. Ramírez-Bahena <i>et al.</i>	82
S7.05. Nuevas especies de bacterias endófitas y endosimbiontes de <i>Phaseolus vulgaris</i> en España. A. Castellano-Hinojosa <i>et al.</i>	84
S7.06. Evaluación del papel de los endófitos en la tolerancia a la sal de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> . S. Navarro Torre <i>et al.</i>	86
S7.07. Aislamiento y caracterización de rizobacterias tolerantes a salinidad con actividad promotora del crecimiento vegetal. M. J. Lami <i>et al.</i>	88
S7.08. La interacción planta-bacteria al servicio de los ecosistemas: potencial de <i>Spartina maritima</i> e inoculantes bacterianos como bioherramienta para la recuperación de estuarios andaluces contaminados con metales pesados. J. Mesa <i>et al.</i>	90
S7.09. Inoculantes bacterianos para mejorar la germinación de las semillas de <i>Spartina densiflora</i> : implicaciones para la restauración de áreas contaminadas con metales. K. I. Paredes Páliz <i>et al.</i>	92
S7.10. Estudio del microbioma nodular en alfalfa californiana. P. Martínez Hidalgo <i>et al.</i> ..	94
Sesión VIII: Otros temas	
S8.01. Análisis del transcriptoma de la interacción Geminivirus - tomate. Piedra-Aguilera <i>et al.</i>	96
S8.02. La proteína Rep de geminivirus reduce la sumoilación de PCNA. B. Sabarit <i>et al.</i> ...	97
S8.03. Efectos sobre planta y suelo de un compost enriquecido con biochar. N. Ortiz Liébana <i>et al.</i>	99
S8.04. Estudio de la comunidad microbiana de <i>MealFrass</i> , el abono mejorado de MealFood Europe: análisis de su potencial para promover el crecimiento vegetal. J. Poveda <i>et al.</i>	101
S8.05. Evaluación de las interacciones planta microorganismo de bacterias empleadas para la bioconsolidación de suelos. M. Fradejas-Bayón <i>et al.</i>	103



SESIÓN I:

**BACTERIAS IMPLICADAS EN
BIOCONTROL**

BIOCOMBIO

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

La protección inducida por L81 implica las glucanasas (PR2) y quitinasas (PR3) en *A. thaliana* y *Rubus* sp. cv Loch Ness

E. Gutierrez, A. García-Villaraco, J. A. Lucas, J. Gutierrez-Mañero, B. Ramos-Solano.

Departamento de salud y cienciasfarmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Boadilla del Monte, Madrid, España.

E-mail: enrique.gutierrezalbanchez@ceu.es

Las plagas en la comunidad agrícola suponen una gran pérdida a nivel económico. Por otra parte, la legislación vigente limita cada vez más el uso de compuestos químicos para controlar estas plagas, por lo que se hace necesario encontrar formas de control alternativas para una agricultura sostenible. Una de las herramientas más prometedoras en la actualidad son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Algunas cepas son capaces de estimular el metabolismo defensivo de la planta de forma que la planta se encuentra más preparada para hacer frente al ataque repentino de un patógeno, estado metabólico denominado *priming*¹. Por lo tanto, es de gran importancia el conocimiento de los mecanismos de transducción de la señal inducidos por los microorganismos beneficiosos. De esta manera se ha evaluado la capacidad de protección de la cepa *Bacillus* sp. (L81) sobre la planta modelo de *A. thaliana* frente a *Xanthomonas campestris* y sobre plantas de mora *Rubus* Cv. *Loch Nessen* producción frente a una plaga de Mildiu. En *A. thaliana* se desarrolló el típico experimento de inducción de resistencia sistémica (ISR)² evaluando la protección y los cambios a nivel de fotosíntesis y del estrés oxidativo, punto en común en ambos procesos. En *Rubus* la bacteria se aplicó en el riego cada quince días durante todo el ciclo de la planta en contraestación, valorando fotosíntesis, producción y protección. En ambos casos, se determinó el índice de enfermedad, la actividad de las enzimas encargadas de retirar los radicales libres del sistema (SOD, y APX), y actividad y expresión génica de las proteínas relacionadas con la defensa PR2 (glucanasas) y PR3 (quitinasas). La cepa ensayada mostró un efecto protector de la enfermedad, reduciendo la incidencia de la misma en un 60% en *Arabidopsis*, y un 10% en mora, asociado con un aumento de la actividad y expresión génica de las PRs y confirmando el estado de *priming* inducido por la bacteria y un apuntando a mecanismo de defensa común en ambas especies, aunque el patógeno sea distinto. Esto refuerza el potencial de la cepa L81 para desarrollar productos de aplicación en agricultura, de especial interés para cultivos minoritarios que carecen de productos específicos.

Referencias.

1. Goellner K *et al.* 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* **121**: 233-242.
2. Domenech J *et al.* 2007. Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*: a study of the putative induction path way. *Plant Soil* **290**: 43-50.

Agradecimientos.

Agrícola El Bosque S.L. “La Canastita” por aportar los campos de cultivo de mora, Ministerio de Economía y Competitividad AGL-2013-45189-Ry BES-2014-069990.

Análisis genómico del regulón directo de FleQ en la cepa de biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113

E. Blanco-Romero, D. Garrido-Sanz, F. Martínez-Granero, C. Muriel, D. Durán, R. Rivilla, M. Redondo-Nieto, M. Martín

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin 2, Madrid, 28049, España.

E-mail: esther.blanco@uam.es

La movilidad bacteriana juega un papel crucial en la competitividad y colonización en el ambiente rizosférico. Además, esta característica es muy importante en la aplicación biotecnológica y mejora de inoculantes microbianos empleados en agricultura para incrementar el rendimiento y evitar el uso de productos químicos perjudiciales. En este trabajo se ha llevado a cabo un análisis de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-seq) con el propósito de identificar genes y operones regulados por el regulador transcripcional FleQ. Esta proteína ha sido identificada previamente como un regulador central de la biosíntesis del flagelo y exopolisacáridos en *Pseudomonas*. Por tanto, en *Pseudomonas fluorescens* F113, una interesante cepa de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal, FleQ participa en la regulación de la movilidad y la formación de biopelículas.

El análisis mediante ChIP-seq muestra que FleQ es un regulador global en *P. fluorescens* F113 con la identificación de 106 hipotéticos sitios de unión de FleQ. Los genes presuntamente regulados por FleQ incluyen, como es esperado, genes relacionados con el flagelo y movilidad y otros implicados en la adhesión y producción de exopolisacáridos. Sorprendentemente, el análisis ChIP-seq también identificó genes relacionados con la adquisición de hierro, incluyendo los genes requeridos para la síntesis del principal sideróforo, la pioverdina. La regulación fue subsecuentemente verificada mediante ensayos de expresión génica mediante RT-qPCR en un fondo silvestre y un mutante *fleQ*.

Los resultados también muestran que FleQ comparte una fracción importante de su regulón directo con AmrZ, un regulador global implicado en la adaptación ambiental. Aunque AmrZ también regula movilidad y la toma de hierro, el solapamiento únicamente ocurre con los genes relacionados con hierro, dado que ambos reguladores controlan un conjunto diferente de genes relacionados con movilidad.

Agradecimientos.

EBR es beneficiaria de una Beca/Contrato Predoctoral Medioambiente 2016 de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, España.

DGS es beneficiario del programa de becas FPU (FPU14/03965) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España.

CM es beneficiaria del programa de becas FPI (BES-2013-063189) del Ministerio de Economía y Competitividad, España.

Este trabajo fue financiado por MINECO/FEDER EU (Ref.: BIO 2015-64480-R).

El sistema de secreción de tipo VI (T6SS) de *Pseudomonas putida* protege a las plantas del ataque de fitopatógenos

P. Bernal^{1,2}, L. Allsopp¹, A. Filloux¹, M. A. Llamas²

¹MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, Imperial College London, London, UK, ²Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain.

E-mail: p.bernal@imperial.ac.uk

Los sistemas bacterianos de secreción de tipo VI (T6SS) son herramientas moleculares que se encuentran en más del 25% de bacterias Gram-negativas y diseñadas para inyectar efectores/toxinas en el interior de células dianas. Inicialmente, se pensó que el papel principal del T6SS era la manipulación de las células eucariotas¹, sin embargo, estudios posteriores han demostrado que estos sistemas juegan un papel extremadamente importante en la competición entre bacterias². Las cepas bacterianas que expresan de forma activa este sistema de secreción presentan grandes ventajas al aniquilar a sus competidores ya sea de forma indiscriminada o en respuesta a señales de peligro³. Las toxinas secretadas por el T6SS generalmente se producen conjuntamente con proteínas inmunitarias que evitan la auto-intoxicación.

En términos moleculares, el T6SS muestra similitudes estructurales con la cola y el dispositivo de punción del bacteriófago T4⁴. Está compuesto por 13 componentes básicos, la mayoría de ellos con función conocida. TssB y TssC forman una vaina contráctil que encierra un tubo formado por la proteína Hcp y terminado en punta. La parte citosólica se acopla a un complejo de membrana a través de una estructura parecida a la placa basal del fago T4. La contracción de la vaina desencadena la propulsión de los efectores con las proteínas Hcp y VgrG al exterior celular y la inyección en las células dianas⁵.

El T6SS fue identificado por primera vez en dos bacterias patógenas, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*^{6,7} y analizadas posteriormente en muchos otros patógenos. Sin embargo, la descripción analítica del T6SS en bacterias no patógenas está pobremente representada en la literatura, a pesar de una distribución uniforme en ambas clases de organismos. *Pseudomonas putida* es una bacteria saprofítica del suelo que tiene la capacidad de colonizar la raíz de una gran variedad de plantas de cultivo⁸ y es además un agente de biocontrol bien establecido que proporciona ventajas de crecimiento a la planta⁹.

En este trabajo¹⁰ hemos analizado el genoma del agente de biocontrol *P. putida* KT2440 donde hemos identificado tres T6SSs (K1-, K2- y K3-T6SS). Además, este estudio ha revelado la presencia de diez pares de efectores/proteínas de inmunidad asociados al T6SS, incluyendo putativas nucleasas y colicinas. El análisis de los T6SSs de *P. putida* nos ha permitido demostrar que K1-T6SS es un potente dispositivo antibacteriano que secreta al menos una toxina denominada Tke2. Cabe destacar que *P. putida* es capaz de erradicar una amplia gama de bacterias usando el K1-T6SS y entre las que se incluyen importantes fitopatógenos, demostrando que el T6SS es fundamental en la lucha contra competidores en *P. putida*. Igualmente, esta propiedad se advierte en experimentos *in planta* donde observamos que la necrosis producida en las hojas de *Nicotiana*

benthamiana por el patógeno *Xanthomas campestris* se reduce drásticamente durante la coinfección con *P. putida* y dicha protección depende de la actividad del T6SS. Aquí desvelamos un nuevo mecanismo para el control biológico de plantas que debe considerarse para la selección de futuros agentes de biocontrol con la capacidad de manipular la composición microbiana de la rizosfera y la filosfera.

Referencias.

1. Ma, A. T. & Mekalanos, J. J. 2010. In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 4365–4370.
2. Ho, B., Basler, M. & Mekalanos, J. 2013. Type 6 Secretion System–Mediated Immunity to Type 4 Secretion System–Mediated Gene Transfer. *Science* **342**: 250–253.
3. Hood, R. D. *et al.* 2010. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* **7**: 25–37.
4. Filloux, A. 2011. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front Microbiol* **2**: 155.
5. Basler, M. & Mekalanos, J. J. 2012. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science* **337**: 815.
6. Mougous, J. D. *et al.* 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**: 1526–1530.
7. Pukatzki, S. *et al.* 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 1528–1533.
8. Espinosa-Urgel, M., Salido, A. & Ramos, J. L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol.* **182**: 2363–2369.
9. Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* **97**: 250–256.
10. Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A. & Llamas, M. A. A. 2017. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J* doi:10.1038/ismej.2016.169

Agradecimientos.

Agradecemos a Milagros López (IVIA, España) el habernos proporcionado las cepas *X. campestris* y *P. carotovorum*, así como a Martin Buck (Imperial College Londres, Reino Unido) por proporcionarnos *P. syringae* y Ehr Min Lai (Academia Sinica, Taiwán) *A. tumefaciens* y el plásmido pRL662-gfp. Patricia Bernal ha sido financiada por el Ministerio de Economía a través de un contrato Juan de la Cierva (JCI-2010-06615), la Agencia Andaluza del Conocimiento a través de un contrato Talent Hub (TAHUB-010) y una subvención EMBO de corta duración.

Análisis de la comunidad microbiana de un suelo supresivo en el cultivo del aguacate

C. Vida, A. de Vicente, F.M. Cazorla

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM - UMA- CSIC).
Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Málaga, España.*

E-mail: cvida@uma.es

La podredumbre blanca de la raíz causada por el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix*, es uno de los problemas más graves del cultivo del aguacate en el área mediterránea. Desde hace años, el manejo integrado de la enfermedad ha incluido la aplicación de enmiendas orgánicas como estrategia para mejorar el estado fitosanitario de los suelos agrícolas. En trabajos anteriores, se demostró el efecto positivo que tenía la aplicación de cáscara de almendra compostada en el control biológico del patógeno, relacionado con los cambios inducidos en las propiedades fisicoquímicas y microbianas del suelo. En este trabajo, nos centramos en analizar el papel de la comunidad microbiana de estos suelos denominados suelos supresivos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos "in vitro" frente a *R. necatrix* que mostraron que la adición de cáscara de almendra compostada al suelo, causa un aumento de la supresividad frente a *R. necatrix* asociada a la microbiota. El uso de técnicas de genómica molecular nos ha permitido conocer la composición y el potencial funcional (GeoChip®) de la microbiota de estos suelos. Concretamente, esta actividad supresiva era llevada a cabo por algunos grupos específicos de microorganismos que realizaban una actividad integrada.

El aislamiento y caracterización de bacterias cultivables de la clase *Gammaproteobacteria*, mostró la capacidad de estos aislados para controlar el índice de enfermedad causado por el patógeno, utilizando diferentes estrategias de control biológico como la posible producción de compuestos antifúngicos, exoenzimas líticas o la promoción de crecimiento vegetal.

Además, se ha diseñado un consorcio bacteriano artificial formado por representantes de esta clase de bacterias de suelo, descritos en trabajos anteriores como agentes de control biológico frente a *R. necatrix*, con el fin de profundizar en el conocimiento de los posibles mecanismos implicados en la supresividad, así como, en el patrón de colonización de raíz de este consorcio bacteriano artificial.

Agradecimientos

Este trabajo está siendo financiado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía (MINECO) (AGL2011-30354-C02-01; AGL2014-52518-C2-1-R) y cofinanciado por los fondos FEDER (EU). C. Vida ha sido financiada con una ayuda del programa FPI del MINECO.

No nos gustaría agradecer especialmente a D^a. Irene Linares Rueda por su apoyo como técnico de laboratorio del grupo de Microbiología y Patología Vegetal de la Universidad de Málaga.

Selección de cepas PGPR para estimular la protección frente a *Pseudomonas syringae* DC3000 en plantas de brócoli

H. Martín-Rivilla, L. Lamia, E. Gutiérrez, J. A. Lucas, J. Gutierrez-Mañero, B. Ramos-Solano.

Grupo Interacción Planta-Microbioma. Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU Universities, Boadilla del Monte, Madrid, España.

E-mail: hel.martin.ce@ceindo.ceu.es

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) están cobrando cada vez más importancia para el control de plagas, como alternativa a los productos químicos dentro del marco de una agricultura sostenible. Algunas cepas son capaces de estimular el metabolismo defensivo de la planta de forma que la planta se encuentra más preparada para hacer frente al ataque repentino de un patógeno, estado metabólico denominado *priming*¹. La capacidad de estimular a la planta está mediada por distintas moléculas bacterianas (MAMPs) y está mediada por receptores por lo que es necesario evaluar el efecto de cada cepa en cada cultivo para confirmar que existe comunicación entre esos dos elementos concretos. Así, el presente trabajo plantea la caracterización de la potencialidad PGPR in vitro de 18 aislados de distintos orígenes y su identificación mediante 16srDNA; a continuación, se seleccionaron 6 aislados con distinto genoma y el mejor potencial PGPR para evaluar su efecto sobre el crecimiento y protección de plantas de brócoli frente a DC3000. Se realizó el típico experimento de ISR² con dos aplicaciones de PGPR y una de patógeno a lo largo de 6 semanas. Una semana después de la aplicación del patógeno, se midió la fotosíntesis (fluorescencia y fijación de CO₂) y se cosecharon las plantas y se determinó la incidencia de la enfermedad, peso fresco, peso seco. Todas eran capaces de producir sideróforos in vitro salvo E89, que era la única capaz de producir quitinasas; el 50% solubilizaba fosfato y todas producían auxinas. De las 6 cepas, 4 protegieron a las plantas de brócoli, destacando dos cepas de *Bacillus* E89 y BaA1.31. E89, disminuía significativamente el *quenching* fotoquímico y aumentaba el NPQ, manteniendo la fijación neta de CO₂ en niveles similares al control; sorprendentemente, está asociado a una estimulación del crecimiento (peso seco). La otra cepa que mayor protección confiere a la planta BaC1.51, sólo disminuye el NPQ y disminuye también la fijación de CO₂ y, sin embargo, aumenta el peso fresco. Estos resultados ponen de manifiesto los numerosos determinantes bacterianos implicados en la comunicación planta-microorganismo, así como la especificidad genoma-genoma en la interacción. Ambas cepas tienen un enorme potencial para la formulación de productos bioestimulantes destinados a agricultura.

Referencias.

1. Goellner, K. *et al.* 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* **121**: 233-242. doi: 10.1007/s10658-007-9251-4.
2. Domenech, J. *et al.* 2007. Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*: a study of the putative induction pathway. *Plant Soil* **290**: 43-50. doi: 10.1007/s11104-006-9089-0.

Agradecimientos.

Ministerio de Economía y Competitividad AGL-2013-45189-R, BES-2014-069990, LL Erasmus program placement grants. A.B. por el apoyo técnico.

Bacterias rizosféricas y fitopatógenas como fuente de metabolitos secundarios activos frente a bacterias, hongos, oomicetos y nematodos

M. A. Matilla^{1,2}, J. E. E. U. Hellberg², G. P. C. Salmond², T. Krell¹

¹*Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental Del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada;*

²*Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom*

E-mail: miguel.matilla@eez.csic.es

Se estima que solamente el 1% de los metabolitos secundarios (MS) bacterianos están identificados. Dentro de la maquinaria bacteriana de síntesis de MS, las sintetasas de péptidos no ribosómicos (SPNR) y las policétido sintetasas (PCS) constituyen complejos multienzimáticos implicados en la biosíntesis de una gran mayoría de MS con acción antibiótica. Entre los principales microorganismos productores, las bacterias del género *Streptomyces* representan actualmente la principal fuente de MS bioactivos. Sin embargo, el empleo de aproximaciones multidisciplinares ha evidenciado el enorme potencial de las bacterias asociadas a plantas como fuente de nuevos antibióticos.

Durante la caracterización fenotípica múltiples aislados bacterianos asociados a plantas se demostró que muchos de ellos presentaban diferentes actividades antagonistas. Entre ellos, diversas enterobacterias pertenecientes a los géneros *Serratia* y *Dickeya* exhibían un amplio espectro de actividades antibióticas; incluyendo propiedades nematocidas y antimicrobianas frente a diferentes fitopatógenos como hongos, oomicetos y bacterias¹⁻⁴. Mediante secuenciación genómica *de novo*, bioinformática, mutagénesis y análisis químicos se identificaron tres MS responsables de las propiedades antagonistas observadas, y de sus respectivos conjuntos génicos. Así, se aisló y caracterizó por vez primera el conjunto génico responsable de la síntesis de “oocydin A”, un policétido que presenta propiedades antifúngicas y anti-oomicetos en diferentes especies de *Serratia* y *Dickeya*^{2,3}. La caracterización de las restantes propiedades antibióticas permitió la identificación de “andrimid”, un inhibidor de la acetil-CoA carboxilasa bacteriana, como el principal compuesto antibacteriano producido por diferentes rizobacterias del género *Serratia*⁴. Finalmente, se demostró que el antibiótico híbrido péptido no ribosomal/policétido “zeamine” es altamente activo frente a nematodos; siendo las larvas en estadios tempranos del desarrollo más sensibles al antibiótico que los nematodos adultos⁵. El estudio de la regulación de la síntesis de “oocydin A”, “andrimid” y “zeamine” permitió determinar que la expresión de los respectivos conjuntos génicos está altamente regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional³⁻⁵.

El desarrollo de estrategias efectivas para el control biológico de las habituales plagas en vegetales es uno de los principales retos de los microbiólogos; máxime cuando existe una creciente limitación del uso de ciertos pesticidas químicos. Nuestros resultados muestran que las bacterias asociadas a plantas representan una excelente alternativa para el aislamiento e identificación de nuevos MS con propiedades antibióticas. Estos estudios presentan notables aplicaciones destinadas a mejorar la productividad y sostenibilidad de cosechas mediante la utilización de pesticidas biológicos; incluyendo biopesticidas basados en bacterias con propiedades antibióticas.

Referencias.

1. Matilla MA *et al.* 2016. Genome sequence of *Serratia plymuthica* A153, a model rhizobacterium for the investigation of the synthesis and regulation of haterumalides, zeamine, and andrimid. *Genome Announc* **4**: e00373-16.
2. Matilla MA *et al.* 2017. Genome sequence of *Serratia marcescens* MSU97, a plant-associated bacterium that makes multiple antibiotics. *Genome Announc. In press.*
3. Matilla MA *et al.* 2012. Bacterial biosynthetic gene clusters encoding the anti-cancer haterumalide class of molecules: biogenesis of the broad spectrum antifungal and antioomycete compound, oocydin A. *J Biol Chem* **287**: 39125–39138.
4. Matilla MA, Leeper FJ & Salmond GP. 2015. Biosynthesis of the antifungal haterumalide, oocydin A, in *Serratia*, and its regulation by quorum sensing, RpoS and Hfq. *Environ Microbiol* **17**: 2993-3008.
5. Matilla MA *et al.* 2016. Biosynthesis of the acetyl-CoA carboxylase-inhibiting antibiotic, andrimid in *Serratia* is regulated by Hfq and the LysR-type transcriptional regulator, AdmX. *Environ Microbiol* **18**: 3635-3650.
6. Hellberg JEEU, Matilla MA & Salmond GP. 2015. The broad-spectrum antibiotic, zeamine, kills the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. *Front Microbiol* **6**: 137.



SESIÓN II:

INTERACCIONES HONGOS PATÓGENOS-PLANTA

ΒΑΙΟΓΕΝΟΣ-ΡΓΑΝΙΤΑ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΕΡΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

The callose priming pathway

D. Mateu, J. Gamir, V. Pastor, P. Sánchez-Bel, B. Agut, J. García-Andrade, V. Flors.

Metabolic Integration and Cell Signalling Group. Plant Physiology Section. Department of CAMN. Universitat Jaume I. 12071 Castellón de la Plana. Spain.

E-mail: dmateu@uji.es

Plant specific responses to challenges depend on the nature of the attack. Salicylic acid (SA) and Jasmonic acid (JA)/Ethylene (ET) are well known as hormonal plant responses to resist pathogenic attacks of biotrophic and necrotrophic life styles respectively¹. Recently, new investigations have demonstrated that plant defence implicates other hormones such as Abscisic acid (ABA), indoles, cytokinins and gibberellic acid^{2,3,4}.

In addition to the well-known hormonal pathways regulating defenses, plant resistance also embraces other metabolic pathways such as Tryptophane and indole derivatives, mainly in defence against necrotrophic pathogens and insects. This was firstly suggested by Pieterse⁵ that observed increased levels of indole-3-acetic acid (IAA) in plants pre-treated with the non-pathogenic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and inoculated with *Fusarium culmorum*.

The IAA levels in plants inoculated with *A. brassicicola* and *Fusarium culmorum* increased dramatically while the application of exogenous IAA in barley reduced disease severity. Other indolic derivatives such as aldehyde ICHO and the acid ICOOH (also known as I3CA⁶) were shown to increase upon infection^{6,7}.

Recently, I3CA was shown to mediate β -amino butyric acid-induced resistance in *Arabidopsis* against *P. cucumerina*⁸. I3CA was also found in a common fingerprint of primed metabolites following treatments with different priming stimuli⁶. Interestingly, I3CA has no antimicrobial effect against *P. cucumerina* and no fitness costs for the plant, thus it functions by priming plant defenses.

The I3CA-induced resistance promotes callose deposition and induces ABA levels against *P. cucumerina*. Callose is a β -1,3-glucose polysaccharide that strengthens the cell wall to isolate fungal hyphae and stop colonization and development in the tissue. Several reports have demonstrated the relevance of callose in priming and the involvement of ABA in callose deposition as a positive regulator^{9,10}.

Taken together, we hypothesize that I3CA priming of ABA and sugar mobilization may facilitate a faster callose deposition during defence priming. Using I3CA as a priming stimulus, we demonstrate that an intact ABA synthesis is needed to activate a starch amylase (*BAM1*) to trigger an augmented callose deposition against *P. cucumerina*. Therefore starch catabolism mediates I3CA-IR regulating sugar availability and callose priming.

To verify the relevance of the *BAM1* amylase in I3CA-IR we tested knockdown mutants and overexpressors of *BAM1* gene. Confocal laser-scanning microscopy analysis of YFP fluorescence in 35S:*BAM1*:YFP T3 plants confirmed that *BAM1* protein is located in the chloroplasts. Complemented lines restored an intact I3CA-IR and priming of callose while *bam1* mutants are impaired expressing I3CA-IR.

We conclude that a defense mechanism against a necrotrophic fungi is activated by the indole derivative I3CA that triggers a cascade of events producing a faster accumulation of callose thus reinforcing the cell wall to isolate the fungus preventing the penetration.

References.

1. Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227.
2. Flors V *et al.* 2005. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? *J. Phytopathol* **153**: 377–383.
3. Ton J, Flors V, Mauch-Mani B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci* **14**: 310–317.
4. Bari R & Jones JDG. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, **69** (4), pp. 473-488. doi: 10.1007/s11103-008-9435-0.
5. Pieterse C *et al.* 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Path* **57**: 123-134. doi: 10.1006/pmpp.2000.0291
6. Gamir J *et al.* 2014. Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J.* **78**: 227–240. doi: 10.1111/tpj.12465
7. Böttcher *et al.* 2014 plant Phys **165**; 841-853. The Biosynthetic Pathway of Indole-3-Carbaldehyde and Indole-3-Carboxylic Acid Derivatives in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **165**: 841-853. doi: 10.1104/pp.114.235630
8. Gamir J *et al.* 2012. Identification of indole-3-carboxylic acid as mediator of priming against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiol. Biochem* **61**: 169–179. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.10.004
9. Flors V *et al.* 2008. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **54**: 81–92.
10. García-Andrade J *et al.* 2011. Arabidopsis ocp3 mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *Plant J* **67**: 783–794.

***FTF2*, el gen del genoma central de la familia *FTF* de *Fusarium oxysporum*, está implicado en el reconocimiento del hongo por la planta**

Virginia Casado-del Castillo, Jonathan Niño-Sánchez, Francisco J. Hernández-Aparicio, Lizabeth Báez-Ojeda, Ernesto P. Benito y José María Díaz-Mínguez

CIALE (Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias), Dpto. de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. C/ Río Duero 12, Villamayor, 37185 Salamanca.

Email: virginiascasado@usal.es

La familia génica *FTF* de *Fusarium oxysporum* codifica para factores de transcripción tipo dedo de zinc binuclear. Los estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación han demostrado que *FTF2* es un gen de copia única altamente conservado en todos los hongos ascomicetos filamentosos que está localizado en el genoma central de *F. oxysporum*. Por otro lado, los parálogos *FTF1* están presentes de forma exclusiva en el genoma adaptativo del complejo de especies *F. oxysporum*; el número de parálogos *FTF1* es variable dependiendo del grado de virulencia de la estirpe y de la forma especial^{1,2}. Las estirpes muy virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* poseen cuatro parálogos *FTF1*, todos localizados en el cromosoma más pequeño de la estirpe y asociados a copias del transposón *marsu*.

Las semejanzas y diferencias entre *FTF2* y los parálogos *FTF1* sugieren que *FTF2* podría ser el gen ancestral de la familia génica y las copias de *FTF1* podrían haber surgido por duplicación y divergencia de *FTF2*. Siendo esto así, los dos factores de transcripción, *FTF2* y *FTF1*, compartirían algunas funciones mientras que las copias de *FTF1* podrían haber adquirido funciones nuevas como resultado de la divergencia o incluso haber perdido otras funciones. Los mutantes nulos en *FTF2* en la estirpe muy virulenta FOP-SP1 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP-SP1 Δ *FTF2*) presentan virulencia reducida al ser inoculadas en plantas de judía común, aunque en menor grado que la reducción que presentan los mutantes silenciados en la familia génica *FTF* al completo en la misma estirpe muy virulenta². En el presente trabajo demostramos que los mutantes FOP-SP1 Δ *FTF2* muestran una reducción en la colonización vascular de plantas de judía común, un fenotipo similar al descrito para estirpes poco virulentas, las cuales carecen de los parálogos *FTF1*, y para los mutantes silenciados en la familia *FTF*. A pesar de la reducción en la colonización vascular, las estirpes FOP-SP1 Δ *FTF2* no presentan una reducción significativa en la acumulación de biomasa fúngica en plantas inoculadas como sí había sido descrito para las estirpes silenciadas en la familia génica *FTF*. Sin embargo, nuestros estudios demuestran que existe una inducción en la expresión del gen *PR1* en plantas inoculadas con las estirpes FOP-SP1 Δ *FTF2*, gen implicado en la respuesta defensiva del hospedador mediada por ácido salicílico.

Para conocer los genes regulados específicamente por *FTF2*, llevamos a cabo un análisis transcriptómico con estirpes con un fondo genético libre de los parálogos *FTF1* (FOP-SP4/FOP-SP4 Δ *FTF2*). Se confirmó mediante análisis por RT-qPCR la reducción en la expresión de varios genes en la estirpe mutante en comparación con la estirpe silvestre. Dos de esos genes regulados por *FTF2* codifican para hidrofobinas de tipo II, estando uno de ellos (FOXG_02746) específicamente inducido durante la colonización del sistema

radicular del hospedador. Nuestros resultados indican que FTF2 participa en la regulación de los mecanismos que permiten al hongo evadir el reconocimiento completo por el hospedador.

Los análisis de expresión mediante RT-qPCR de los genes *SIX1* y *SIX6* durante la colonización de plantas de judía común por las estirpes FOP-SP1 Δ FTF2 muestran una reducción significativa en la expresión para ambos genes respecto a la expresión en plantas inoculadas por la estirpe silvestre FOP-SP1. Los genes *SIX* codifican para los efectores homónimos necesarios para la colonización del sistema vascular del hospedador, imprescindible para el desarrollo de la fusariosis vascular. Nuestros resultados indican que FTF2, junto con FTF1^{2,3}, regula la expresión de los efectores *SIX* contribuyendo así al desarrollo de la enfermedad en la planta.

Referencias.

1. de Vega-Bartol, J.J. *et al.* (2011). New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* **101**: 470–479.
2. Niño-Sánchez, J. *et al.* (2016). The *FTF* gene family regulates virulence and expression of *SIX* effectors in *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* **17**: 1124–1139.
3. Niño-Sánchez, J. *et al.* (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol* **6**.

Agradecimientos.

Virginia Casado del Castillo (AP2010-2742) y Jonathan Niño Sánchez (AP2009-3559) han sido beneficiarios de becas FPU del MINECO. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación AGL2012-39876-C02-01 and AGL2015-66131-C2-1-R del MINECO.

El análisis transcriptómico y farmacológico de un mutante de *Botrytis cinerea* deficiente en la enzima flavohemoglobina demuestra que el óxido nítrico afecta a la germinación, la replicación del ADN y el ciclo celular

F. Anta¹, D. Santander^{1,4}, W. Acosta¹, R. Santamaría², P. San Segundo³, J. M. Díaz-Mínguez¹, E. P. Benito¹.

¹CIALE (Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias), Dpto. Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. C/ Río Duero 12, Villamayor, 37185 Salamanca, Spain. ²Dpto. de Informática y Automática. Facultad de Ciencias. Universidad de Salamanca. Spain. ³Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC. Universidad de Salamanca. Salamanca. Spain. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

E-mail: u86028@usal.es

Botrytis cinerea es un necrotrofo que crece preferentemente sobre tejidos muertos o senescentes, pero también puede infectar a tejidos vegetales sanos. Se ha observado que el hongo se beneficia de la muerte celular programada activada en la planta en respuesta al ataque de patógenos y que, aunque las ROS y RNS generadas durante este proceso crean un ambiente hostil para los microorganismos, *B. cinerea* sobrevive en estas condiciones. Evidencias experimentales recientes sugieren que el hongo no experimenta un estrés oxidativo ni nitrosativo fuertes *in planta*, ya que la supresión de los componentes involucrados en la respuesta a niveles elevados de ROS y/o NO no afecta a la patogenicidad. Se ha propuesto una función más básica relacionada con la regulación de los procesos de diferenciación y de virulencia para las ROS producidas por el hongo¹. También se ha sugerido que las funciones fisiológicas de la flavohemoglobina FHGB1, responsable de la detoxificación de NO en *B. cinerea*, podrían estar más relacionadas con su participación en la modulación de los niveles de NO endógeno producido por el hongo durante determinadas etapas del desarrollo².

En un intento de identificar los procesos fisiológicos en los que participa el NO en *B. cinerea*, hemos realizado estudios farmacológicos y análisis de expresión global diferencial en respuesta a NO. Estudios previos habían demostrado que el NO afecta a la germinación, con donadores de NO retrasando la germinación y secuestradores de NO acelerándola. Análisis de transcriptómica de esporas germinadas del tipo silvestre expuestas a donadores de NO indicaron que en un sistema en el que el NO puede ser detoxificado eficientemente, un número reducido de genes respondieron al NO exógeno y que los niveles de inducción o represión de estos genes no son elevados. Entre los genes inducidos, se identificaron varios genes codificantes de factores de transcripción.

La cepa mutante $\Delta Bcfhg1$ carece de actividad detoxificadora de NO. El cultivo de esporas de la cepa $\Delta Bcfhg1$ en presencia de donadores de NO bloqueó la germinación. Curiosamente, la adición de los donadores de NO una vez que la germinación ya ha comenzado, congeló los procesos de germinación y de elongación del tubo germinativo. Los análisis de expresión global en estas condiciones detectaron cambios importantes en los patrones de expresión. El análisis de enriquecimiento funcional permitió identificar vínculos entre la exposición a NO, la detención del crecimiento y la regulación a la baja de genes relacionados con la replicación del ADN, actividad del nucléolo y ciclo celular. Actualmente nos encontramos diseñando una estrategia experimental que permita

determinar los mecanismos mediante los cuales el NO ejerce estos efectos, en particular la posible nitrosilación de factores genéticos esenciales en el control del ciclo celular de *B. cinerea*.

Referencias.

1. Heller J & Tudzynski P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 369-390.
2. Turrion-Gomez JL, Eslava AP & Benito EP. 2010. The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet Biol* **47**: 484-496.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por las subvenciones AGL2012-39876-C02-01 y AGL2015-66131-C2-1-R, del MINECO (España).

Análisis genético de las diferencias de agresividad entre aislados de campo de *Botrytis cinerea* recogidos sobre vid

W. Acosta^{1,2}, F. Anta^{1,2}, J. M. Díaz-Mínguez^{1,2}, M. Thon^{1,2}, J. A. L. van Kan³, E. P. Benito^{1,2}
¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca; ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Salamanca; ³Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, The Netherlands.

E-mail: wilsonacostam@hotmail.com

Las poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los viñedos de Castilla y León muestran una gran diversidad genética y fisiológica. La evaluación de la agresividad de una muestra representativa de aislados recogidos sobre diferentes variedades de vid ha permitido identificar aislados que presentan enormes diferencias en su capacidad para infectar a la planta huésped. Para llevar a cabo un análisis genético de estas diferencias, se han llevado a cabo cruzamientos entre una cepa muy agresiva (448) y una cepa no patógena (371). En la descendencia de este cruzamiento se ha observado una segregación 1:1 del fenotipo “capacidad de infectar”. Es interesante destacar que la “capacidad de infectar” cosegrega estrictamente con la “capacidad de esporular”. Entre los individuos de la progenie que muestran capacidad de infectar ha sido posible detectar diferencias muy notables de agresividad. Todo ello permite proponer la existencia de un “gen mayor de patogenicidad” esencial para la expresión de un número de factores de patogenicidad que segregan en la descendencia. Con el objeto de identificar el gen con efecto mayor sobre patogenicidad y esporulación, nos hemos planteado llevar a cabo un “análisis de segregantes agrupados”. Para ello, en primer lugar, se ha secuenciado el genoma de los dos aislados parentales, 448 y 371, y se ha preparado una lista con las variantes de tipo SNP y pequeñas inserciones y deleciones específicas de cada uno de ellos. En segundo lugar, se han secuenciado dos muestras de ADN genómico cada una constituida por una mezcla de cantidades equivalentes de ADN genómico de 6 aislados de la descendencia del cruzamiento 448 x 371, la primera de ellas (P1) derivada de aislados tan agresivos como el parental agresivo 448, y la segunda (P2) derivada de aislados incapaces de infectar al huésped, como el aislado 371. Finalmente, se ha llevado a cabo un análisis de la distribución de los polimorfismos encontrados entre ambas cepas parentales buscando variantes específicas del aislado 371 que aparecen exclusivamente en la mezcla de ADN P2 y variantes específicas del aislado 448 que aparecen exclusivamente en la mezcla de ADN P1. Esta estrategia ha permitido identificar dos regiones cromosómicas en las que el “gen mayor de patogenicidad” identificado en nuestro análisis genético puede estar localizado. Ambas regiones están siendo caracterizadas en la actualidad.

Referencias.

1. Van Kan J. *et al.* 2016. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol* **18**: 75-89.

El análisis RNA-seq dual como herramienta para el estudio de la interacción melón- *Podosphaera xanthii*

A. Polonio¹, R. Bautista², A. de Vicente¹, A. Pérez-García¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM–UMA–CSIC). Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga, Málaga, ²Centro de Biocomputación y Bioinnovación. Plataforma Andaluza de Bioinformática. Parque Tecnológico de Andalucía, Málaga.

E-mail: polonio@uma.es

El cultivo de las cucurbitáceas en España se ve afectado, entre otros, por el hongo biotrofo obligado *Podosphaera xanthii*, principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas. Este patógeno representa uno de los factores limitantes más importantes de estos cultivos, incrementando los costes de producción y limitando el rendimiento. Actualmente, la aplicación de fungicidas continúa siendo la principal herramienta de lucha contra esta enfermedad. Sin embargo, el control químico es más ineficaz de lo esperado debido a la facilidad con la que *P. xanthii* desarrolla resistencias.

Profundizar en la biología básica del oídio de las cucurbitáceas se hace indispensable para el desarrollo de medidas de control más racionales y duraderas. Para ello, en este trabajo se ha realizado un análisis RNA-seq dual de la interacción *P. xanthii* – melón con el fin de comprender, de manera global, las interacciones moleculares que ocurren entre el patógeno y el huésped, a través de la cuantificación de los cambios de expresión génica en los primeros estadios de desarrollo de la enfermedad (0, 24, 48 y 72 hpi).

Con los datos obtenidos se ha realizado un análisis *time course* y un posterior enriquecimiento funcional, que nos ha permitido diferenciar la dinámica de expresión génica de *P. xanthii*, así como aquellos genes que siguen un patrón característico de sobreexpresión y represión en melón como consecuencia de la infección.

Todo ello nos aporta una información muy útil para comprender mejor como se desarrolla la interacción *P. xanthii* – melón y nos acerca un poco más al desarrollo de nuevos métodos de control eficaces.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, del Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto I+D+I AGL 2013-41939-R cofinanciado con fondos FEDER (UE). Álvaro Polonio es beneficiario de un contrato predoctoral para la formación de doctores del Ministerio de Economía y Competitividad.

El modelado proteico como herramienta para el análisis funcional de efectores haustoriales de *Podosphaera xanthii*

J. García-Sánchez, A. Polonio, A. de Vicente, A. Pérez-García

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM–UMA–CSIC).
Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. Málaga.*

E-mail: jags4595@uma.es

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren células vegetales vivas para completar su ciclo de vida asexual. *Podosphaera xanthii*, principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas, es uno de los patógenos más destacados que limitan la productividad de estos cultivos en España. Este hongo desarrolla unas estructuras especializadas de parasitismo denominadas haustorios que prosperan dentro de las células epidérmicas y son responsables de la relación directa entre el patógeno y el huésped, participando en la absorción de nutrientes de la planta y en la liberación de efectores en las células del huésped.

Con el objetivo de identificar genes clave para la patogénesis de *Podosphaera xanthii* y, partiendo del transcriptoma haustorial y del correspondiente secretoma analizados previamente en nuestro laboratorio, se ha realizado el modelado de las proteínas asociadas a diferentes contigs que carecen de anotación funcional y que pudieran corresponder a proteínas efectoras secretadas candidatas, con la intención de dilucidar su posible función en la interacción patógeno-planta mediante similaridad estructural con proteínas cristalografiadas disponibles en bases de datos.

Aunque esta aproximación no es definitiva, nos aporta una valiosa información para realizar el posterior análisis funcional *in vivo* e identificar aquellos genes clave en la patogénesis de *P. xanthii*.

Los resultados obtenidos arrojan una serie de proteínas cuyas funciones, según los modelos predichos y su comparación posterior con proteínas cristalografiadas, parecen estar directamente relacionadas con distintos aspectos de la patogénesis. Por ello, hemos establecido el modelado proteico como el primer paso del proceso de análisis funcional de proteínas secretadas efectoras candidatas sin función conocida de *P. xanthii*.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, del Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto I+D+I AGL 2013-41939-R cofinanciado con fondos FEDER (UE). Juan Antonio García Sánchez es beneficiario de una ayuda del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Málaga.

Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a la enfermedad de raíz rosada en la producción de cebolla (*Allium cepa*) en Costa Rica

W. Rivera-Méndez, R. Fuentes, K. Courraou, J. Brenes-Madriz

Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

E-mail: wirivera@iter.ac.cr

La cebolla es una hortaliza originaria de Asia, cuyo cultivo se ha extendido a prácticamente todo el mundo. En Centroamérica es un producto valioso en las economías rurales de varios países. En Costa Rica es la tercera hortaliza en importancia en cuanto a impacto económico y consumo. Su producción se realiza desde zonas relativamente bajas (550 m) hasta faldas de volcanes y cordilleras (2100 m). Sin embargo, la principal zona productora se encuentra en la provincia de Cartago, donde se concentra el 75% de la producción¹.

En los últimos años ha aparecido de forma muy recurrente una enfermedad conocida como “raíz rosada”, frecuente en climas tropicales y cálidos, que está ocasionada por el hongo *Setophoma terrestris*. Los síntomas asociados al ataque son el acortamiento y debilitamiento de las raíces y las plantas, así como la coloración rosada o púrpura que éstas adquieren. Al ser un patógeno biotrofo, muchas plantas logran llegar hasta producción pero los bulbos obtenidos no tienen valor comercial, lo que provoca pérdidas al agricultor que son difíciles de estimar. Su rango óptimo de temperaturas de crecimiento va de los 24 a los 28° C, pero puede sobrevivir incluso a 16°C.

La sintomatología de la enfermedad también puede ser producida por el ataque de *Fusarium* sp., patógeno frecuente en la cebolla, causando damping off y pudrición basal de la corona. Debido a las condiciones saprofitas de las cepas de *Fusarium*, cuando se realizan aislamientos directamente de los tejidos de cebolla es frecuente que el crecimiento de éste inhiba o enmascare el desarrollo de *S. terrestris*², lo cual lleva a diagnósticos equivocados y técnicas de control ineficientes.

El objetivo de nuestro proyecto de investigación, asociado a sectores productivos costarricenses de cebolla, fue aislar y caracterizar molecularmente los patógenos asociados a síntomas de raíz rosada y comprobar su patogenicidad en invernadero.

El proyecto como tal involucró una serie de procedimientos, desde establecer un protocolo mejorado para aislamiento selectivo de *S. terrestris*, basado en sus características morfológicas y variables físicas de crecimiento, la caracterización molecular de los hongos asociados a tejidos enfermos, el desarrollo de un protocolo de reproducción de micelio y picnidios, y la infección de cebollas en invernadero para comprobar la patogenicidad de los aislamientos y la producción de los síntomas asociados.

Se logró establecer un procedimiento para obtener cultivos puros de *S. terrestres* y separarlos del crecimiento de *Fusarium oxysporum* mediante una combinación de temperaturas de incubación, medios de cultivo, horas de luz/oscuridad y selección de esporas germinadas. El proceso completo toma cerca de 21 días pero permite obtener aislamientos de cada sección de tejido enfermo de al menos 1cm².

Las características morfológicas macro y microscópicas permitieron la identificación de los aislamientos dentro del género *Setophoma*. La caracterización molecular de los aislamientos obtenidos, basada en el uso de PCR para amplificar las regiones ITS4 e ITS5 y posterior secuenciación, permitió identificar al patógeno como *S. terrestris* (99% identidad). Además los aislamientos con las estructuras típicas de *Fusarium* fueron identificados como *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (100% identidad) usando la misma técnica.

Para cada uno de los dos microorganismos se establecieron las condiciones (mezcla de medios de cultivo, temperatura de incubación, pH, fotoperiodo y r.p.m en la agitación) más adecuadas para la obtención de biomasa mediante fermentación líquida.

Los ensayos en invernadero mostraron que ambos aislamientos tienen capacidad de producir enfermedad en distintos grados y muerte. La mortalidad fue mayor en un tratamiento basado en una mezcla de inóculos de ambos patógenos en comparación con tratamientos donde las plantas fueron inoculadas con los patógenos por separado. Las infecciones compartieron muchos de los síntomas expresados en la parte aérea de las plantas. Sin embargo, la coloración rosada de la raíz solo se consiguió al ser inoculadas con *S. terrestris*. Al final se tomaron tejidos de las raíces infectadas. En tejidos de raíces con coloraciones café se observaron estructuras típicas de *F. oxysporum* y el hongo pudo ser reaislado. En tejidos de raíces con coloraciones rosadas se logró reaislar *S. terrestris*.

Con los datos obtenidos se concluyó que las muestras de tejido de cebolla estaban infectadas con los patógenos *S. terrestris* y *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Ambos pueden estar presentes en infecciones radicales, pero en el caso de cebollas de la zona de Cartago, solo *S. terrestris* es capaz de producir la coloración rosada en las raíces como síntoma característico. *F. oxysporum* puede contribuir a los síntomas aumentando la severidad de la enfermedad o mediante pudriciones radicales de tonalidad café.

Referencias.

1. Consejo Nacional de Producción. Ministerio de Agricultura. Costa Rica. 2015. Información de Mercado: Cebolla. Boletín informativo.
2. Granados M. 2013. Problemas fitosanitarios de la cebolla en Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica.

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y el programa FITTACORI del Ministerio de Agricultura de la República de Costa Rica. A ellos el agradecimiento.



SESIÓN III:

INTERACCIONES BACTERIAS
PATÓGENAS~PLANTA

BAI0GENAS~PLANTA

INTERACCIONES BACTERIAS PATÓGENAS~PLANTA

El análisis pangenómico como herramienta para la detección de genes asociados a virulencia en *Xanthomonas arboricola* y el desarrollo de métodos para la detección e identificación de cepas causantes de la mancha bacteriana en frutales del género *Prunus*

J. Garita-Cambronero¹, A. Palacio-Bielsa², M. M. López³, J. Cubero¹

¹Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid; ²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza; ³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia.

E-mail: cubero@inia.es

Xanthomonas arboricola es una especie de bacteria Gram negativa conformada por cepas causantes de enfermedad en diversidad de especies vegetales, así como por cepas no virulentas o saprófitas¹. Las cepas virulentas de esta especie se encuentran divididas infraespecíficamente en nueve patovares, dentro de los cuales destacan por su interés fitopatológicos patovares *corylina*, *juglandis* y *pruni*, agentes causales de enfermedad en avellano, nogal, frutales de hueso y el almendro^{1,2}.

La posible dispersión y el desarrollo de epidemias por parte de estos organismos en la Unión Europea (principalmente de los patovares *corylina* y *pruni* clasificados como organismos de cuarentena), ha impulsado el estudio de esta especie, principalmente en relación a su diversidad genética y a su virulencia. Todos estos estudios tienen como finalidad última el desarrollo de alternativas eficaces a los actuales métodos de detección del patógeno y el control de la enfermedad^{3,4}.

En España, a partir de la aparición en el año 2002 de *X. arboricola* pv. *pruni*, agente causal de la mancha bacteriana en diversos frutales del género *Prunus*⁵, se iniciaron estudios sobre diversos aspectos asociados con este patosistema. Una parte de estas investigaciones han ido dirigidas a caracterizar tanto molecular como fenotípicamente una serie de cepas representativas de los diversos brotes de la mancha bacteriana registrados en el país. Estos estudios determinaron la presencia no solamente de cepas asociadas al agente causal de la mancha bacteriana, sino también a otros grupos infraespecíficos de *X. arboricola* incapaces de generar infección en *Prunus*⁶.

El análisis pangenómico de las cepas de *Xanthomonas* aisladas de *Prunus* identificó un grupo de cepas no virulentas de *X. arboricola*, que constituía un grupo basal a las cepas virulentas dentro de la especie. Se demostró además, que ambos grupos no eran capaces de ser diferenciados mediante los métodos descritos para la detección e identificación de *X. arboricola* pv. *pruni*. El análisis comparativo de los genomas de cepas representativas de cepas virulentas y avirulentas identificó factores moleculares únicos del patovar *prunia* partir de los cuales, se ha desarrollado un método de PCR tiempo real que evita este tipo de problemas en la identificación del agente causal.

Además, mediante este análisis permitió determinar aquellos factores moleculares que podían estar relacionados con el desarrollo de la patogénesis en los frutales de hueso y el almendro. Estos factores se han relacionado tanto con mecanismos asociados al inicio de la infección (percepción de condiciones ambientales, quimiotaxis, motilidad y

adherencia), así como con factores asociados con etapas más tardías del proceso infeccioso, como son la translocación de enzimas y efectores asociados a los diversos sistemas de secreción descritos en *Xanthomonas*.

En general en este trabajo se describirán una serie de factores moleculares, relacionados con patogénesis, hacia los cuales se pueden dirigir posteriores estudios funcionales que permitan determinar posibles dianas para el bloqueo de la enfermedad y el desarrollo de futuras estrategias de control.

Referencias.

1. Fischer-Le Saux M *et al.* 2015. Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Appl Environ Microbiol* **81**: 4651-4668. DOI: 10.1128/AEM.00050-15
2. Essakhi S *et al.* 2015. Phylogenetic and VNTR analysis identified non-pathogenic lineages within *Xanthomonas arboricola* Lacking the canonical type three secretion system. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5395-5410. DOI:10.1128/AEM.00835-15
3. Lamichhane JR. 2014. *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management. *Plant Dis* **98**: 1600-1610. DOI:10.1094/PLDIS-08-14-0831-FE
4. Lamichhane JR & Varvaro L. 2014. *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: current status and future perspectives for its management. *Plant Pathol* **63**: 243-254. DOI:10.1111/ppa.12152
5. Roselló M *et al.* 2012. Current status of bacterial spot of stone fruit and almond caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Spain. **94**: S1.15-S1.21. DOI: 10.4454/jpp.v94i1sup.004
6. Garita-Cambronero J *et al.* 2016. Draft genome sequence for virulent and avirulent strains of *Xanthomonas arboricola* isolated from *Prunus* spp. in Spain. *Stand. GenomicSci.* **11**:12. DOI:10.1186/s40793-016-0132-3

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación RTA2011-00140-C03-02, RTA2014-00018-C02-01 y XAPDIAG EUPHRESKO Project II.

Análisis bioinformático y funcional del sistema de secreción tipo III en cepas de *Pseudomonas savastanoi* aisladas de diversos huéspedes

Moreno-Pérez, A.¹, Pérez-Baena, A.¹, Murillo, J.², Bardaji, L.², Ramos, C.¹.

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora», Universidad de Málaga-CSIC, Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29010; ²Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

E-mail: albamp@uma.es

La especie *Pseudomonas savastanoi* se engloba dentro del complejo *Pseudomonas syringae*, constituido por un conjunto de bacterias fitopatógenas Gram (-) de gran interés agrícola y económico. Dentro de esta especie, hay descritos actualmente 4 patovares capaces de infectar plantas leñosas: pv. *savastanoi* (aislados de olivo), pv. *nerii* (aislados de adelfa), pv. *fraxini* (aislados de fresno) y pv. *retacarpa* (aislados de retama). Además, se han aislado cepas de *P. savastanoi* de otros huéspedes, entre los que se encuentra la dipladenia (*Mandevilla spp.*), aunque los aislados de esta planta no se han asignado aún a un patovar concreto. Dentro del complejo *P. syringae*, uno de los factores más importantes para el establecimiento de la enfermedad es el sistema de secreción tipo III (T3SS), así como su repertorio de efectores (T3E), los cuales han sido identificados como uno de los factores más relevantes en la determinación del rango de huésped. Actualmente, los genomas de varios aislados de los patovares *savastanoi*, *nerii*, *fraxini* y *retacarpa* están disponibles en NCBI. Además, hemos obtenido el borrador de la secuencia de aislados adicionales de *P. savastanoi*, incluyendo el de una cepa patógena en dipladenia. En la actualidad, estamos llevando a cabo ensayos de patogenicidad cruzada de todas estas cepas en diferentes huéspedes de *P. savastanoi*, con el objetivo de poder relacionar su especificidad de huésped con sus diferencias genómicas. Análisis bioinformáticos comparativos del T3SS de todas estas cepas y de su repertorio de T3E, nos ha permitido identificar el conjunto de T3E compartido entre todas las cepas, así como los específicos de cada una de ellas. Además, hemos construido mutantes en cepas modelo de cada patovar, así como en el aislado de la dipladenia, del gen *hrpA*, que codifica la principal proteína estructural del pilus del T3SS, y del gen *hrpL*, que codifica un activador transcripcional de los genes del T3SS y de la mayoría de sus T3E. En la actualidad, estamos analizando el papel de ambos genes en la patogenicidad de las cepas de *P. savastanoi* seleccionadas y la expresión de varios T3E que podrían estar implicados en el rango de huésped.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2014-53242-C2-1-R y AGL2014-53242-C2-2-R del MINECO (cofinanciados por FEDER).

Expresión heterogénea de genes relevantes para la virulencia de *Pseudomonas syringae*

N. López-Pagán, J. S. Rufián, D. López-Márquez, J. Ruiz-Albert, C. R. Beuzón

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC).
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.
29071, Málaga.*

E-mail: nieves.lpg@uma.es

Poblaciones bacterianas genéticamente idénticas pueden mostrar variedad fenotípica en ocasiones. Esta variación puede darse en respuesta a estímulos ambientales, o ser estocástica y producirse en condiciones homogéneas. La heterogeneidad fenotípica puede llegar a dar lugar a la formación de subpoblaciones fenotípicamente diferentes cuando los genes implicados están bajo el control de un cierto tipo de circuitos regulatorios. Este proceso es conocido como biestabilidad. En los últimos años se ha descrito un número creciente de genes importantes para la virulencia, la persistencia crónica, o la resistencia que presentan expresión heterogénea y/o biestable en patógenos humanos. Recientemente, describimos el primer ejemplo de biestabilidad en genes de virulencia en un patógeno de plantas, *Pseudomonas syringae*, la bacteria fitopatógena de mayor relevancia académica e importante impacto económico. Mediante fusiones transcripcionales cromosómicas a genes codificantes de proteínas fluorescentes, microscopía confocal y la citometría de flujo mostramos que la expresión de genes que codifican diferentes elementos del sistema de secreción tipo III (por sus siglas en inglés T3SS) es heterogénea en el apoplasto de la planta y biestable en condiciones homogéneas de inducción en el laboratorio, identificamos el regulador transcripcional HrpL y el circuito de regulación establecido por HrpG/ HrpV como esenciales para el establecimiento de biestabilidad, y demostramos que la misma determina cambios en virulencia.

Resultados previamente publicados por nuestro laboratorio mostraban un efecto represor de HrpL en la motilidad de *P. syringae* lo que nos ha llevado a analizar la expresión del gen *fliC* que codifica la flagelina, principal componente del flagelo, así como su respuesta a diferentes proteínas reguladoras. Presentamos aquí los resultados y conclusiones de dicho análisis.

Papel de las proteínas reguladoras CsrA en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

M. T. Gallegos¹, M. D. Ferreiro¹, G. A. Farias^{1,2}

¹Departamento de Microbiología del suelo y sistemas simbióticos; ²Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada.

E-mail: maritrini.gallegos@eez.csic.es

Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (Pto DC3000) es una bacteria fitopatogena que infecta plantas de tomate y *Arabidopsis thaliana*. La motilidad bacteriana juega un papel fundamental en el establecimiento de la infección y requiere la presencia de flagelos y la producción del biosurfactante siringafactina¹. La ruta Gac-rsm es una ruta de regulación global que controla virulencia, motilidad, producción de metabolitos secundarios, metabolismo del carbono y otros procesos en Pto DC3000². Sin embargo y a pesar de su importancia, esta ruta aún no ha sido caracterizada a nivel molecular en esta bacteria. En otras *Pseudomonas*, la ruta se inicia con la activación del sistema de dos componentes GacS/GacA, que activa la transcripción de los ARNs no codificantes rsm, cuyo papel es secuestrar los reguladores postranscripcionales CsrA impidiendo que ejerzan su función³. Las proteínas RsmA/CsrA son reguladores postranscripcionales ampliamente distribuidos en γ -proteobacterias. Se unen a la región 5' no traducida (5'-UTR) y/o al principio de la región codificante de ARN mensajeros alterando su traducción, estabilidad y/o elongación de la transcripción⁴. Esta cepa posee cinco parálogos de *rsmA/csrA* en su genoma, tres de los cuales están bien conservados dentro del género *Pseudomonas*: *csrA1*, *csrA2* y *csrA3*.

Hemos generado mutantes carentes de los genes *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* y hemos estudiado fenotipos cruciales para la infección como la motilidad y la producción de biosurfactantes, pero también la producción de exopolisacáridos y su comportamiento *in planta* mediante ensayos de infección en tomate. Los resultados obtenidos muestran que CsrA3 y, en menor medida CsrA2, pero no CsrA1, regulan negativamente en Pto DC3000 la motilidad, la producción de biosurfactante y alginato y la virulencia en plantas de tomate. Estos ensayos fenotípicos, junto con predicciones bioinformáticas, nos han permitido proponer una serie de genes diana para las proteínas CsrA en esta bacteria. Esto sienta una base para futuros ensayos de interacción proteína-ARN que permitirán conocer mejor el modo de acción de las proteínas CsrA y las funciones de los distintos parálogos.

Referencias.

1. Nogales J *et al.* 2015. FleQ coordinates flagellum-dependent and -independent motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Appl Environ Microbiol* **81**:7533-7545.
2. Chatterjee A *et al.* 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1106-1117.
3. Lapouge K *et al.* 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**: 241-253.
4. Vakulskas CA *et al.* 2015. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 193-224.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BIO2014-55075-P, del MINECO y cofinanciado con FEDER; por un contrato predoctoral FPU (ECD/1619/2013) otorgado a M.D.F. por el MECD y por una beca predoctoral Ciência sem Fronteiras (BEX10043/13-6) otorgada a G.A.F. por la CAPES-Brazil.

Papel del silenciamiento génico en la regulación de genes de resistencia durante la interacción con *Pseudomonas syringae*

D. López-Márquez¹, E. A. Rodríguez-Negrete¹, N. López-Pagan¹, A. Zumaquero¹, I. Rubio-Somoza², J. Ruíz-Albert¹, E. R. Bejarano¹, C. R. Beuzon¹.

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Málaga, 29071, España; ²Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, Barcelona, 08193, España.

E-mail: dlm@uma.es

Las plantas cuentan con diferentes mecanismos para hacer frente a la diversidad de estreses tanto bióticos como abióticos presentes en la naturaleza. Estos organismos han desarrollado un complejo sistema inmune que les protege de una gran variedad de patógenos. Ciertas moléculas de dichos patógenos conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) son reconocidas por receptores presentes en la planta (PRRs) desencadenando una primera defensa basal conocida como PTI (Pattern triggered immunity). Por otro lado los patógenos cuentan con una batería de proteínas efectoras capaces de suprimir dicha respuesta al ser translocados al interior de la célula vegetal a través del Sistema de secreción tipo III (T3ss). Como consecuencia las plantas han evolucionado un segundo nivel de defensa, conocida como ETI (Effector triggered immunity) que depende del reconocimiento específico de estos efectores (o de sus funciones) en el interior celular por proteínas de resistencia de la planta (proteínas R). Generalmente este reconocimiento desencadena una muerte celular programada del tejido vegetal conocida como HR (Hypersensitive Response), capaz de frenar el avance del patógeno.

El silenciamiento génico es un mecanismo de regulación de la expresión génica mediado por pequeños RNAs. En plantas, estos pequeños RNAs, son producidos por la acción de RNAsas del tipo III conocidas como “Dicer-Like proteins” (DCLs). Existen básicamente dos tipos principales de pequeños RNAs involucrados en silenciamiento génico: Los pequeños RNAs interferentes (siRNAs) y los microRNAs (miRNAs), difiriendo estos en su biogénesis y modo de acción pero compartiendo tamaños similares (20-24 nt). Los microRNAs son pequeños RNAs no codificantes, de cadena sencilla capaces de regular negativamente la expresión de transcritos diana mediante la unión al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) y por un mecanismo dependiente de secuencia. Esta regulación mediada por miRNAs es englobada dentro del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS).

Durante un proceso de infección, las plantas reconocen la presencia del patógeno y modulan la expresión de una variedad de genes implicados en la respuesta de defensa. Es en este proceso donde recientemente se ha demostrado que los miRNAs desempeñan un papel fundamental en la reprogramación hacia una respuesta de defensa exitosa y es por ello que ciertas proteínas efectoras presentan como diana algunos componentes de la maquinaria involucrada en la producción y el correcto funcionamiento de los miRNAs. Diferentes análisis de los perfiles de expresión de plantas mutantes afectadas en la biogénesis de pequeños RNAs (*dcl1* y *dcl234*) y plantas infectadas con *Pseudomonas*

syringae pathovar tomato DC3000, nos ha permitido identificar una serie de genes “R” no caracterizados (TIR-NBS-LRR) expresados diferencialmente en ambas condiciones. Con el uso de diferentes herramientas bioinformáticas, identificamos un miRNA* de 22 nt como potencial regulador de la expresión de dichos genes “R” a través de la generación de pequeños RNAs en fase (Phased-siRNAs) a partir de su gen diana. Hemos demostrado que la expresión del precursor de dicho miRNA* (pri-miRNA) es reprimida durante la infección tras la detección de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos. Además hemos observado que plantas con niveles alterados de dicho miRNA* muestran fenotipos alterados de PTI, lo cual sugiere un papel del miRNA* en este mecanismo de defensa frente a la bacteria. Finalmente hemos llevado a cabo una caracterización de los patrones de expresión de ambos genes en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Referencias.

1. Lionel Navarro *et al.* 2008. Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins. *Science* **321**: 964. DOI: 10.1126/science.1159505.
2. Lionel Navarro *et al.* 2006. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**: 436. DOI: 10.1126/science.1126088.
3. Pablo A. Manavella *et al.* 2012. Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *PNAS* **109**: 2461-2466. DOI:10.1073/pnas.1200169109
4. Ho-Ming Chen *et al.* 2010. 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *PNAS* **107**: 15269-15274. DOI:10.1073/pnas.1001738107

El efector bacteriano HopZ1a acetila al regulador positivo de defensa ZIP1

J. Rueda-Blanco, J. S. Rufián, D. Lopez-Marquez, C. R. Beuzón, J. Ruiz-Albert

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC).
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.
Málaga, 29071.*

E-mail: jrblanco@uma.es

Durante la interacción planta-patógeno se producen una serie de eventos moleculares que determinan el resultado final de dicha interacción: multiplicación del patógeno y desarrollo de síntomas de enfermedad en plantas sensibles, o bloqueo del proceso de infección como resultado de una eficaz respuesta de defensa en plantas resistentes. Cuando una bacteria patógena entra en contacto con la célula vegetal, se produce el reconocimiento, por parte de receptores específicos de membrana, de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como por ejemplo flagelina o EF-Tu. Este reconocimiento inicia una respuesta de defensa denominada PTI (PAMP-Triggered Immunity), que de no ser suprimida es suficiente para evitar el progreso de la infección. Sin embargo, algunas bacterias patógenas pueden suprimir la respuesta PTI mediante la translocación al interior de la célula vegetal de proteínas de virulencia, llamadas efectores, mediante un Sistema de Secreción Tipo III (T3SS). En plantas resistentes, la célula vegetal es capaz de detectar dichos efectores mediante receptores intracelulares conocidos como proteínas R. Este reconocimiento da lugar a una segunda línea de defensa, más específica e intensa que la PTI, llamada ETI (Effector-Triggered Immunity), que desencadena una muerte celular programada conocida como HR (Hypersensitive Response).

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena Gram-negativa que, como especie, posee un amplio rango de hospedador, que sin embargo es reducido para cada estirpe individual. La virulencia de esta bacteria es dependiente del T3SS y su repertorio de efectores, que varía entre diferentes estirpes. Uno de estos efectores, HopZ1a, utiliza su actividad acetiltransferasa para suprimir las respuestas de defensa de la planta, tanto PTI como ETI, e incluso la respuesta sistémica (SAR), lo que constituye un rango de supresión de inusual amplitud^{1,2}. Aunque se han propuesto diversas dianas en la planta para HopZ1a, ninguna de ellas es consistente con el amplio rango de supresión del que es capaz este efector. La diana de HopZ1a debe ser compatible con un regulador positivo de defensa necesario para la señalización de PTI, ETI y SAR. Los homólogos de HopZ1a en bacterias patógenas de animales actúan inactivando por acetilación a quinasas del hospedador implicadas en señalización positiva de defensa. En plantas resistentes, HopZ1a acetila la pseudoquinasa ZED1, un decoy del sistema de defensa, que a su vez activa una proteína R específica (ZAR1) para disparar ETI³. En conjunto, estos datos sugieren a una quinasa reguladora positiva de defensa como probable diana para HopZ1a.

En este trabajo proponemos a ZIP1, una quinasa que actúa como regulador positivo de las respuestas de defensa PTI, ETI, y SAR, como diana en la planta de HopZ1a.

Siguiendo diversas aproximaciones experimentales demostramos que (i) HopZ1a interfiere con todas las respuestas de defensa señalizadas específicamente a través de ZIP1, contribuyendo en el proceso a la caracterización molecular de dichas respuestas (ii) HopZ1a interacciona con ZIP1 *in vitro* e *in planta* (iii) HopZ1a acetila a ZIP1 en una lisina esencial para su actividad quinasa *in vitro* e *in planta*. Este trabajo contribuye a caracterizar el mecanismo molecular por el cual HopZ1a suprime las defensas de la planta, identificando y caracterizando una diana consistente con el amplio rango de supresión del que es capaz este efector.

Referencias.

1. Macho AP *et al.* 2010. The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytol* **187**: 1018-1033.
2. Rufián JS *et al.* 2015. Auto-acetylation on K289 is not essential for HopZ1a-mediated plant defense suppression. *Front Microbiol* **6**: 684.
3. Lewis JD *et al.* 2013. The *Arabidopsis* ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 18722-18727.

Estrategias complementarias para la caracterización de quimiorreceptores de bacterias fitopatógenas

J.P. Cerna-Vargas¹, J.J. Rodríguez-Herva¹, P. Rodríguez-Palenzuela¹, A. Daddaoua², T. Krell², E. López-Solanilla¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Parque Científico y Tecnológico de la UPM. Campus de Montegancedo. 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain; ²Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Prof. Albareda 1, Granada, 18008, España.

E-mail: jeanpaul.cerna.vargas@alumnos.upm.es

Durante su ciclo de vida, las bacterias fitopatógenas se asocian a la filosfera, infectando a la planta únicamente cuando son capaces de entrar a través de una apertura natural o una herida. Esta capacidad de entrar en la planta depende de la movilidad bacteriana y a su vez de la capacidad de percibir los compuestos químicos del ambiente^{1,2}.

La quimiotaxis permite a la bacteria moverse hacia entornos óptimos como respuesta a señales producidas por la planta. Los quimiorreceptores MCPs (Methyl Accepting Chemotaxis Protein), constituyen el núcleo del sistema de quimiotaxis. Los MCPs son proteínas transmembranas que presentan un dominio periplásmico de unión a un ligando LBD (Ligand Binding Domain) y un dominio citoplásmico de señalización. Los ligandos son químicos que pueden actuar como repelentes o atrayentes, produciendo una respuesta a concentraciones que varían de milimolar a nanomolar.

Los organismos modelo con los que trabajamos son *Dickeya dadantii* 3937 (Dd3937) y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPto), dos bacterias fitopatógenas con un alto impacto económico en cultivos de interés agronómico, como patata, maíz y tomate³.

En nuestro grupo estamos llevando a cabo distintas estrategias para caracterizar los MCPs de bacterias fitopatógenas. Tras un análisis bioinformático que permite extraer los LBDs y clasificarlos en tipos, se ha procedido a llevar a cabo distintas aproximaciones *in vivo* e *in vitro* con un doble objetivo: i) Establecer relaciones MCP-ligando. ii) Determinar el papel de estos MCP durante las primeras fases de la infección.

En el caso de Dd3937, se ha comparado la quimiotaxis hacia una serie de compuestos, entre la cepa silvestre y mutantes afectados en distintas MCPs, a través de ensayos *in vivo* de capilaridad y ensayos de entrada en planta. Los resultados obtenidos han servido como base para establecer ciertas relaciones MCP-ligando. A su vez, se observa que la alteración en la quimiotaxis hacia distintos compuestos disminuye la habilidad de la bacteria de entrar en la planta.

En el caso de PsPto, además de llevar a cabo las estrategias antes mencionadas hemos planteado una estrategia directa con el fin de encontrar el MCP responsable de la unión a un ligando específico, el ácido γ -aminobutirato (GABA). El interés en este ligando se debe a i) Recientemente se ha observado que GABA es el aminoácido más abundante del apoplasto de tomate, una planta que es infectada por PsPto⁴. ii) PsPto es capaz de usar GABA como fuente de nitrógeno⁴. iii) Se ha descrito MCPs de GABA en dos bacterias del género de *Pseudomonas*, *P. putida* KT2240T⁵ y *P. aeruginosa* PAO1⁶.

Se realizó un BLAST de nucleótidos y aminoácidos de PsPto frente a los 2 MCPs de GABA descritos, encontrando 3 MCPs con una alta similitud (65-86% de nucleótidos y 60-75% de aminoácidos). El modelado estructural de estos MCPs también muestra una similitud en el tipo de estructura que podría estar implicada en el binding. Hemos llevado a cabo la clonación, expresión y purificación de los LBDs de los tres MCPs seleccionados. Los análisis con los LBDs recombinantes a nivel bioquímico empleando aproximaciones tipo Thermal shift (TS) y Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC) nos están permitiendo determinar al espectro de ligandos de estos quimiorreceptores entre distintos tipos de aminoácidos y derivados. Así mismo, estamos procediendo a la obtención de los mutantes correspondientes con el fin de determinar su función durante la infección de plantas de tomate.

Referencias

1. Antúñez-Lamas M *et al.* 2009. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiol Read Engl* **155**: 434-442.
2. Río-Álvarez I *et al.* 2015. Role of *Dickeya dadantii* 3937 chemoreceptors in the entry to *Arabidopsis* leaves through wounds. *Mol Plant Pathol* **16**: 685-698.
3. Mansfield J *et al.* 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**: 614-629.
4. Rico A & Preston GM. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI*. **21**: 269-282
5. Reyes-Darias JA *et al.* 2015. Specific gamma-aminobutyrate chemotaxis in pseudomonads with different lifestyle. *Mol Microbiol* **97**: 488-501
6. Rico-Jiménez M *et al.* 2013. Paralogous chemoreceptors mediate chemotaxis towards protein amino acids and the non-protein amino acid gamma-aminobutyrate (GABA). *Mol Microbiol* **88**: 1230-1243

Primera detección en España de necrosis bacteriana de la dipladenia y caracterización fenotípica de su agente causal (*Pseudomonas savastanoi*)

E. Caballo-Ponce y C. Ramos

Área de Genética, Facultad de Ciencias, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC), Málaga.

E-mail: eloy_cprm@uma.es

La dipladenia (género *Mandevilla*) es una planta nativa de Suramérica con un creciente interés en el sector ornamental, cuyo mercado anual está estimado en 300-400 millones de euros. Las infecciones causadas por *Pseudomonas savastanoi*, una de las diez especies integrantes del complejo *Pseudomonas syringae*, suponen una importante amenaza para este mercado. La necrosis bacteriana de la dipladenia, provocada por *P. savastanoi*, se caracteriza por la aparición de manchas necróticas rodeadas de un halo clorótico en las hojas y el desarrollo de tumores en los tallos. Esta sintomatología se describió por primera vez en Estados Unidos en 2010 y desde entonces se han producido nuevos brotes de la enfermedad en varios países europeos: Alemania (2012), Francia (2012) y Eslovenia (2014). Durante la primavera de 2013 y el otoño de 2014 se detectaron en España plantas de dipladenia con síntomas típicos de la enfermedad, de las que se aislaron varias cepas y posteriormente se identificaron como *P. savastanoi* mediante análisis multilocus de la secuencia de genes esenciales. Inoculaciones de estos aislados en plantas sanas, seguidas del reaislamiento e identificación, completaron los postulados de Koch, demostrándose que *P. savastanoi* es el causante de esta enfermedad también en España. Estas cepas de *P. savastanoi* patógenas en dipladenia (Psd), se han caracterizado junto con una colección de aislados procedentes de todos los países donde se ha descrito la enfermedad. Curiosamente, el perfil LOPAT (Levano, Oxidasa, Pectinólisis, Arginina dihidrolasa, respuesta hipersensible en Tabaco) de todas ellas difiere al de la mayoría de las cepas del complejo *P. syringae*, dado que Psd no induce la respuesta de hipersensibilidad (HR) en *Nicotiana tabacum*, aunque codifican un sistema de secreción tipo III funcional. Análisis filogenéticos de los aislados de Psd han revelado la existencia de una relación próxima a cepas de *P. savastanoi* aisladas de adelfa. Sin embargo, ensayos de patogenicidad cruzada en varios huéspedes de *P. savastanoi* (olivo, adelfa, fresno y retama), sugieren que Psd podrían constituir un nuevo patovar de esta especie. Finalmente, y utilizando una cepa de Psd marcada con la proteína verde fluorescente, hemos comprobado la migración de patógeno a otras zonas de la planta causando una infección sistémica y, en último término, la marchitez completa de la misma.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2014-53242-C2-1-R del MINECO (cofinanciado por FEDER).

Aislamiento de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* asociadas a mango para su uso en análisis evolutivos y epidemiológicos

F. Aprile, J. A. Gutiérrez-Barranquero, E. Arrebola, F. M. Cazorla, A. De Vicente

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail: aprile@uma.es

La necrosis apical del mango (NAM) es una enfermedad que se ha observado en el litoral andaluz desde la implantación de este cultivo, y cuyo agente causal es la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss). Esta enfermedad aparece principalmente asociada a climas con inviernos frescos y húmedos, tal y como ocurre en la cuenca mediterránea, donde, además de en España, se ha descrito en otros países (Israel, Portugal, Italia, Egipto), así como en otras áreas de cultivo con clima similar, como el Noroeste de Australia. Las cepas de Pss aisladas de mango muestran características importantes para su biología, tanto a nivel de virulencia como de *fitness* epifítico. En trabajos previos se han descrito diferentes genes implicados en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, así como en aumentar la capacidad de la bacteria de sobrevivir y persistir sobre el tejido vegetal; el operón *mbo* implicado en la producción de mangotoxina, los genes *copABCD* o *cusCBA*, implicados en la capacidad de resistencia al cobre, o el operón *wss*, responsable de la producción de celulosa. Por otro lado, gracias a análisis filogenéticos, se ha podido agrupar a todas las cepas de Pss aisladas de mango y productoras de mangotoxinas en el filotipo I.

El objetivo de este trabajo es el análisis fenético comparado de cepas de Pss aisladas de mango de las diferentes zonas de estudio (España, Portugal, Italia, Australia), antes del año 2000 (colección I) y disponibles en nuestro laboratorio, con aislamientos actuales (2016-2018, Colección II). Este estudio se ha iniciado con la caracterización y selección previa de cepas representativas de cada una de las colecciones, para iniciar un abordaje en detalle y comparación de los diferentes atributos.

Agradecimientos

Agradecemos a E. Guirado y D. Sarmiento su ayuda en las salidas al campo y obtención de muestras de tejido de mango, y a I. Linares por su apoyo técnico en el laboratorio.

Este trabajo está siendo financiado por Incentivos a Proyectos de Excelencia de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P12-AGR-1473), cofinanciado con fondos FEDER (UE). F. Aprile está siendo financiada con una ayuda del programa FPI de Excelencia de la Junta de Andalucía.

Estudio de la interacción de *Bacillus cereus* responsable de intoxicaciones eméticas en humanos con la superficie de hojas y frutos

M. L. Antequera-Gómez¹, A. de Vicente², D. Romero^{1,2}

¹Departamento de Microbiología. Centro de Supercomputación y Bioinnovación. Universidad de Málaga. Calle Severo Ochoa 34 (PTA), 29590. Málaga. España; ²IHSM-UMA-CSIC. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Bulevar Louis Pasteur s/n. Campus de Teatinos. 29071. Málaga. España.

E-mail: marialan@uma.es

Bacillus cereus es una bacteria patógena de humanos que comúnmente se transmite por la ingesta de alimentos contaminados causando importantes brotes de intoxicación alimentaria. La persistencia y colonización de esta bacteria en frutos y vegetales supone un grave problema en la industria médica y alimentaria. En este trabajo, se ha estudiado el comportamiento de diferentes aislados procedentes de intoxicaciones alimentarias sobre la superficie de frutos y hojas de plantas como posibles vehículos de estos microorganismos a través de los cuales se producirían las toxiinfecciones alimentarias.

Todos los aislados fueron inicialmente estudiados *in vitro* para una batería de fenotipos relacionados con el comportamiento multicelular bacteriano: Formación de biofilm, movilidad swarming/sliding o adhesión a superficie. De entre todos los aislados se seleccionaron aquellos con características distintivas (morfología de colonia, fuerte adhesión a las paredes de pocillos, o formación de película en la interfase aire-líquido) para estudios de interacción con plantas. En general no observamos una correlación entre el comportamiento *in vitro* y los resultados en planta, por lo que decidimos seleccionar una cepa emética por varios motivos: i) produce la toxina emética cereulide, y una enterotoxina no hemolítica, siendo por tanto de gran interés en seguridad alimentaria, ii) en las distintas plantas ensayadas se mantuvo a concentraciones de 10⁵ UFC por gramo de hoja inoculada de los que un 40% apareció en la forma de esporas y iii) es una cepa manipulable genéticamente.

Uno de los resultados más interesantes fue la aparición de un mutante espontáneo en la fracción más externa de una colonia de la cepa emética crecida en medio de movilidad swarming. Este mutante daba lugar a una colonia con morfología totalmente diferente y mayor capacidad de movilidad. En los ensayos en planta, el mutante se comportó como el silvestre en cuanto a persistencia, formación de biofilm, o esporulación. La comparativa de los genomas sin embargo mostró la pérdida masiva de elementos transponibles, así como otros locus no caracterizados previamente.

Con todos estos datos en nuestras manos nos encontramos posicionados para comprender qué herramientas, conocidas o aún por conocer, utiliza esta cepa para interactuar con la planta, y de qué forma coordina su persistencia con una eventual producción de toxinas que tienen como diana al hombre.

Agradecimientos.

Este trabajo está financiado por European Research Council-Starting Grant-2014 (8.06 UE/60.8003)



SESIÓN IV:

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS INTERACCIONES BACTERIAS BENEFICIOSAS-PLANTA BENEFICIOSAS-PLANTA INTERACCIONES BACTERIAS

Análisis transcriptómico de la bacteria endófitra *Azoarcus* sp. CIB: identificación de genes implicados en la interacción con planta

H. Fernández-Llamosas, E. Díaz, M. Carmona

Microbiología Medioambiental. Departamento de Biología Medioambiental. CIB-CSIC, Madrid

E-mail: hflamosas@cib.csic.es

El género *Azoarcus* (β -proteobacterias) incluye bacterias de vida libre capaces de degradar una gran variedad de compuestos aromáticos tanto aeróbica como anaeróticamente, e.g., *Azoarcus* sp. EbN1 (actualmente renombrada *Aromatoleum aromaticum* EbN1)¹ y *Azoarcus evansii*², así como bacterias que colonizan plantas como endófitas y son incapaces de degradar compuestos aromáticos anaeróticamente, e.g., *Azoarcus* sp. BH72³. Sin embargo, algunos miembros del género *Azoarcus* combinan ambos estilos de vida y son endófitos facultativos capaces de degradar, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, compuestos aromáticos, e.g., *Azoarcus* sp. CIB⁴. Si bien el metabolismo de compuestos aromáticos en la cepa CIB ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo⁴, la capacidad de colonizar la raíz del arroz como un endófito mostrando propiedades típicas de bacterias que promueven el crecimiento de plantas, tales como la de solubilizar fosfato insoluble, síntesis de auxinas o fijación de nitrógeno atmosférico, ha sido un descubrimiento más reciente⁵. La cepa CIB se convierte así en un buen sistema modelo para profundizar en el estudio de las bases moleculares que controlan la interacción planta-bacteria y la transición de un estilo de vida libre a un estilo de vida endófito en bacterias.

En este trabajo se presenta un estudio global de la expresión génica en *Azoarcus* sp. CIB cuando la bacteria se cultiva en ausencia o en presencia de extractos de raíz de arroz como inductores de la respuesta de interacción con planta. Para ello, se aisló RNA de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB incubados en ausencia o presencia de los extractos de arroz y se llevó a cabo un análisis transcriptómico global. Los resultados obtenidos mostraron la expresión diferencial (de más de dos veces) de 1382 genes del total de 4739 genes anotados en el genoma. De ellos, 678 se encontraban inducidos mientras que 704 estaban reprimidos respecto a la condición control en ausencia de extracto. Un análisis global de los genes diferencialmente expresados permite concluir que, en presencia de extractos, *Azoarcus* sp. CIB reprime genes implicados en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y en el metabolismo de aminoácidos. Por otra parte, se observa una inducción de genes relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos y la degradación de ácidos grasos. Además, se ha realizado un análisis exhaustivo de la expresión diferencial de aquellos genes que han sido postulados como responsables de la interacción planta-bacteria, tales como los relacionados con la motilidad, sistemas de secreción tipo VI o formación de biofilm. Se observa que los extractos de arroz ocasionan la represión (entre 2 y 3,5 veces) de genes implicados en la síntesis y función del flagelo, de los pili tipo IV y del sistema de secreción tipo VI. Por otro lado, se observa una fuerte inducción (más de 30 veces) de operones presuntamente responsables de la síntesis de exopolisacárido. Todos estos datos sugieren que la formación de biofilm es importante en la interacción

de *Azoarcus* sp. CIB con la raíz del arroz y en el cambio de un estilo de vida libre a uno endófito.

Referencias.

1. Rabus R *et al.* 2005. The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* **183**: 27–36.
2. Anders HJ *et al.* 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 327–333.
3. Hurek T & Reinhold-Hurek B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J Biotechnol* **106**: 169–178.
4. Martín-Moldes Z *et al.* 2015. Whole-genome analysis of *Azoarcus* sp. strain CIB provides genetic insights to its different lifestyles and predicts novel metabolic features. *Syst Appl Microbiol* **38**: 462–471.
5. Fernández-Llamosas H *et al.* 2014. *Azoarcus* sp. CIB, an anaerobic biodegrader of aromatic compounds shows an endophytic lifestyle. *PLoS One* **9**: e110771.

Señalización de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 en la rizosfera durante las interacciones multitróficas

S. Tienda, C. Vida, A. de Vicente, F.M. Cazorla

Instituto de Horticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España.

E-mail: sandratienda@uma.es

Pseudomonas chlororaphis PCL1606 es una rizobacteria, que muestra capacidad antagonista y actividad de biocontrol frente a diferentes hongos fitopatógenos de suelo, entre ellos *Rosellinia necatrix*, que produce la enfermedad denominada podredumbre blanca radicular en el aguacate. Entre otros factores, se ha demostrado que PCL1606 produce un compuesto antifúngico (2-hexil, 5-propil resorcinol o HPR), que resulta clave para el antagonismo y la actividad biocontrol contra *R. necatrix*.

En este trabajo se aborda el estudio en detalle de los procesos de interacción que tienen lugar durante el biocontrol de PCL1606 frente a *R. necatrix* en la raíz de aguacate. Para ello, se realizará una aproximación mediante RNA-seq, y que revelará que RNA mensajeros están presentes en ese determinado momento, permitiendo la identificación de los genes que se expresan durante el proceso de interacción, y la posible función e implicación en el proceso. Para la puesta a punto de un modelo experimental de interacción sobre el que realizar análisis moleculares, se han iniciado los experimentos realizando análisis de RNA-seq sobre placas de medio de cultivo, que revelaron la inducción y represión de distintos genes de PCL1606 en presencia/ausencia de *R. necatrix*. Genes representativos seleccionados se emplean como controles para estimar, mediante experimentos qRT-PCR, las condiciones experimentales del ensayo sobre raíz de aguacate. Una vez validado el modelo experimental, se iniciará el estudio de las interacciones multitróficas que tienen lugar mediante análisis de RNA-seq a las distintas condiciones de ensayo.

El resultado previsto contempla que el análisis de los genes que se induzcan/repriman en este proceso, aportarán información fundamental sobre la biología del agente de biocontrol y los procesos que tienen lugar durante las interacciones multitróficas en el biocontrol.

Agradecimientos.

Nos gustaría agradecer especialmente a Irene Linares Rueda y a Yandira Morales Lobato por su apoyo como técnicos de laboratorio del grupo de Microbiología y Patología Vegetal de la Universidad de Málaga.

*Este trabajo está siendo financiado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía (AGL2014-52518-C2-1-R; MINECO, España) y cofinanciado con fondos FEDER (EU). S. Tienda está siendo financiada con una ayuda del programa FPI del MINECO.

Análisis de la regulación del diGMPc por AmrZ en *Pseudomonas fluorescens* F113

C. Muriel, E. Arrebola, F. Martínez-Granero, E. Blanco-Romero, D. Garrido-Sanz, M. Redondo-Nieto, M. Martín y R. Rivilla

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin 2, Madrid, 28049, España.

E-mail: candelas.muriel@uam.es

Pseudomonas fluorescens F113 es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal utilizada en control biológico de patógenos de plantas. La función de F113 en sistemas integrados planta microorganismo depende de su capacidad para colonizar eficazmente y persistir durante un tiempo en la rizosfera. Durante los últimos años hemos estudiado los caracteres implicados en la colonización competitiva de la rizosfera y hemos descubierto una red compleja de señalización implicada en las respuestas de F113 al ambiente rizosférico. Dentro de esta red de señalización compleja, se ha observado la existencia de un regulador global denominado AmrZ (*alginate and motility regulator Z*) que contiene un dominio de unión a DNA tipo *Ribbon-Helix-Helix*. La expresión de AmrZ depende del factor sigma *algU*, formando ambos un nodo central en el sistema de señalización de respuesta de la bacteria a las condiciones ambientales. Para poder conocer en profundidad los genes regulados por AmrZ en F113 se han llevado a cabo análisis de ChIP seq¹ y de RNA-seq. Hemos observado que, entre otras funciones, AmrZ activa la transcripción de proteínas implicadas en la síntesis y degradación del diGMPc, metabolito señal que define estilos de vida bacterianos. En *P. fluorescens* F113 existen más de 30 proteínas que intervienen en la síntesis y degradación de este segundo mensajero. Con anterioridad hemos analizado la función de algunas de estas proteínas: SadC, WspR o BifA, que están implicadas en la regulación de la función flagelar. En este trabajo nos hemos centrado en las posibles diguanilato-ciclasas y fosfodiesterasas reguladas por AmrZ. Se han obtenido mutantes y analizado su fenotipo: capacidad de movimiento, de formación de biopelículas y niveles de diGMPc. Los resultados obtenidos serán discutidos en la presentación.

Referencias.

1. F. Martínez-Granero, M. Redondo-Nieto, P. Vesga, M. Martín y R. Rivilla (2014) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC Genomics* **15**: 237.

Agradecimientos.

CM es beneficiaria del programa de becas FPI (BES-2013-063189) del Ministerio de Economía y Competitividad, España.

EBR es beneficiaria de una Beca/Contrato Predoctoral Medioambiente 2016 de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, España.

DGS es beneficiario del programa de becas FPU (FPU14/03965) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España.

Este trabajo ha sido financiado por MINECO/FEDER EU (Ref.: BIO 2015-64480-R).

Regulación de la producción del β -glucano de enlaces mixtos MLG en *Sinorhizobium meliloti*

D. Perez-Mendoza^{1,2}, D. Bertinetti², O. Bertinetti², D. Rodriguez-Carbonell¹, M.T. Gallegos¹, F.W. Herberg², J. Sanjuan¹

¹Departamentode Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, (EEZ-CSIC), Granada; ²Department of Biochemistry, Universidad de Kassel, Alemania.

E-mail: dpmendoza@eez.csic.es

Tanto las bacterias patógenas como mutualistas de plantas han desarrollado sistemas que les permiten invadir y establecer infecciones crónicas en sus respectivos huéspedes. En los estadios iniciales de la interacción, las bacterias secretan diferentes exopolisacáridos (EPS) que además de proteger a la bacteria, intervienen en la adhesión, formación de biopelículas y colonización de la planta hospedadora.

El endosimbionte de alfalfa (*Medicago sativa*) *Sinorhizobium meliloti* 8530 (Sme) produce un glucano de enlaces mixtos, MLG, similar a la celulosa que presenta una novedosa estructura de enlaces alternantes β (1 \rightarrow 3) / β (1 \rightarrow 4) entre las unidades glucosídicas. Este MLG interviene en la agregación y formación de biopelículas por Sme, siendo clave para su adhesión eficiente a las raíces de la planta hospedadora¹.

Un operón bicistrónico denominado *bgsBA* está implicado en la biosíntesis de MLG y se encuentra conservado en diferentes bacterias del orden Rhizobiales. BgsA es la Glicosiltransferasa (GT) encargada de la polimerización y BgsB una proteína periplásmica que probablemente participa en la extrusión del MLG al exterior de la célula. La producción de MLG en Sme está sujeta tanto a una regulación transcripcional como postraduccional. La transcripción del operón *bgsBA* es dependiente del sistema de *Quorum sensing* ExpR/SinI¹. Recientemente hemos puesto de manifiesto que BgsA, además, presenta una activación alostérica de la actividad GT mediada por c-di-GMP. Este segundo mensajero interacciona de forma específica y con alta afinidad con un nuevo dominio de unión a c-di-GMP que se localiza en el extremo C-terminal de BgsA. Mediante el empleo de diferentes técnicas de interacción biomolecular y ultrasecuenciación hemos determinado varios residuos clave para la unión a c-di-GMP y para la actividad GT de BgsA. Los resultados sugieren que este nuevo dominio representa un mecanismo de activación por c-di-GMP diferente a los previamente descritos para otros dominios de unión, como el dominio PilZ².

Además de la implicación biológica para la interacción bacteria-planta, la activación artificial de la producción por c-di-GMP de diferentes biopolímeros bacterianos abre un novedoso campo de estudio con interesantes aplicaciones biotecnológicas^{3,4}.

Referencias.

1. Pérez-Mendoza D *et al.* 2015. Novel mixed-linkage beta-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E757-765.
2. Pérez-Mendoza D *et al.* 2017. A novel c-di-GMP binding domain is involved in the activation of mixed-linkage β -glucan production in *Sinorhizobium meliloti* (en revisión)
3. Romero-Jiménez L *et al.* 2015. Mini-Tn7 vectors for stable expression of diguanylate cyclase PleD* in Gram-negative bacteria. *BMC microbiology* **15**: 190.

4. Pérez-Mendoza D & Sanjuán J. 2016. Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr Opin Microbiol* **30**: 36-43.

Agradecimientos.

DPM ha sido financiado por un proyecto del programa Andalucía TalentHub de la Agencia Andaluza del Conocimiento, cofinanciado por el VII Programa Marco de la UE, Acciones Marie Skłodowska-Curie (COFUND – Acuerdo nº291780) y por la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía. También se agradece la financiación de MINECO a través del proyecto BIO2014-55075-P.

Study of new genes of *Sinorhizobium fredii* HH103 which are symbiotically regulated: *flgJ* is involved in the genistein-induced surface motility exhibited by this strain

P. Navarro-Gómez¹, C. Alías-Villegas¹, I. Jiménez-Guerrero¹, S. Acosta-Jurado¹, F. Pérez-Montaña¹, F. J. Ollero¹, F. J. López-Baena¹, J. E. Ruiz-Sainz¹, M. J. Soto², J. M. Vinardell

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, Spain; ²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain

E-mail: pnavarro2@us.es

Sinorhizobium fredii HH103 is a rhizobial species exhibiting an extremely broad host-range that includes legumes forming determinate (such as soybean) and indeterminate nodules^{1,2}. By combining RNAseq and qPCR analyses, we have determined the set of HH103 genes whose expression is affected upon treatment with flavonoids³. Three groups of genes differentially expressed upon treatment with genistein were identified: i) genes controlled by *nod* boxes, ii) genes regulated by *tts* boxes, and iii) genes not preceded by a *nod* box or a *tts* box, revealing a complex regulatory network. Interestingly, we have found differentially expressed genes not previously studied in rhizobia, and many of them appear not to be related to Nod factors or to the symbiotic type 3 secretion system (T3SS).

In this work we describe the characterization of a chromosomal genetic region comprised of three genes (SfHH103_00346 to SfHH103_00348) whose transcription is induced by flavonoids, NodD1 and TtsI (the positive regulator of the T3SS) and repressed by both NodD2 and NoIR. This pattern of expression strongly suggests a symbiotic role for these genes. The wild-type HH103 strain exhibits surface motility when inducing flavonoids are present. SFHH103_00346 codes for the flagellar protein FlgJ, whereas the products of 00347 and 00348 are hypothetical proteins. Mutants in each of these genes are negatively affected in genistein-induced surface motility, indicating that they are related to this bacterial trait. In addition, the *flgJ* mutant is also affected in the production of two surface polysaccharides: exopolysaccharide (EPS) and lipopolysaccharide (LPS). The symbiotic ability of these mutants with different HH103 host legumes is currently being analysed.

Referencias.

1. Margaret *et al.* 2011. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J Biotechnol* **155**: 11-19.
2. Vinardell *et al.* 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* **28**: 811-824.
3. Pérez-Montaña *et al.* 2016. A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. *Sci Rep* **6**: 31592

Agradecimientos.

This work was supported by projects P11-CVI-7500 and P11-CVI-7050 of the Junta de Andalucía, by projects BIO2011-30229-C01 and BIO2016-78409-R of the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish government, and by the V and VI Plan Propio of the University of Seville (VPPI-US).

Riborregulación de la fijación simbiótica de nitrógeno en *Sinorhizobium meliloti*

M. Robledo, N.I. García-Tomsig, J.I. Jiménez-Zurdo

Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain.

E-mail: marta.robledo@eez.csic.es

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de genotecas de cDNA (RNA-Seq) ha revelado la complejidad del transcriptoma procariota, permitiendo la identificación de un gran número de transcritos de pequeño tamaño que no se traducen a proteína (sRNAs). Los sRNAs regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional en respuesta a estímulos medioambientales diversos. Para ello, la mayoría interaccionan con las regiones 5' no codificantes de los mRNAs, ayudados por distintos tipos de riboproteínas (RBPs). Tanto los sRNAs como las RBPs bacterianos controlan importantes procesos celulares como el metabolismo, el transporte, la virulencia y el quorum sensing. Por tanto, es lógico postular que estos riboreguladores también están implicados en la respuesta adaptativa de la bacteria durante la simbiosis con plantas leguminosas. El rizobio mejor estudiado a nivel transcriptómico es *Sinorhizobium meliloti*^{1,2}, capaz de fijar nitrógeno en simbiosis con alfalfa (*Medicago sativa*). Los severos fenotipos simbióticos de bacterias mutantes en RBPs conservadas como la chaperona Hfq o la RNasa YbeY³, anticipan un fuerte impacto de la riboregulación en este proceso. Recientemente hemos identificado sRNAs antisentido (asRNAs) a los genes *nif* expresados de forma específica en condiciones en las que la enzima nitrogenasa es dispensable, contribuyendo posiblemente a reprimir su traducción⁴. En esta comunicación también se presentarán datos sobre la regulación transcripcional y el mecanismo de acción del *trans*-sRNAs NfeR1 (Nodule Formation Efficiency RNA1), cuya mutación compromete la osmoadaptación y la simbiosis fijadora de nitrógeno. Estos hallazgos amplían la diversidad funcional de los sRNAs procariotas y constituyen un nuevo mecanismo de adaptación de los microorganismos a entornos variables.

Referencias.

1. Schlüter JP *et al.* 2013. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* **14**: 156.
2. Jiménez-Zurdo JI & Robledo M. 2015. Unraveling the universe of small RNA regulators in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Symbiosis* **67**: 43-54.
3. Saramago M, Peregrina A & Robledo M. 2017. *Sinorhizobium meliloti* YbeY is an endoribonuclease with unprecedented catalytic features, acting as silencing enzyme in riboregulation. *Nucleic Acids Res* **45**: 1371-1391.
4. Robledo M, Jiménez-Zurdo JI & Becker A. 2015. Antisense transcription of symbiotic genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Symbiosis* **67**: 55-67.

Caracterización del sistema de secreción de tipo VI en *Rhizobium etli* Mim1

A. Salinero¹, A. Pacheco¹, D. Valle¹, D. Durán¹, T. Ruiz-Argüeso¹, J. Imperial^{1,2}, E. Martínez-Romero³,
E. Ormeño-Orrillo⁴, JM. Palacios¹, L. Rey¹

¹Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal (ETS de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas) y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid; ²CSIC, Madrid; ³Instituto de CC Genómicas Cuernavaca, México; ⁴Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú

Email: alvaro.salinero@upm.es

La simbiosis rizobio-leguminosa es altamente específica. La translocación de proteínas denominadas efectores desde el citoplasma bacteriano a la célula vegetal es un elemento relacionado con dicha especificidad. Los efectores pueden ser translocados a través de diferentes sistemas de secreción. El análisis de genomas de rizobios ha permitido identificar en algunos la presencia de sistemas de secreción de tipo VI (T6SS). El T6SS tiene como componente principal una nanoestructura similar a las que utilizan los bacteriófagos¹ para inyectar su ADN y que las bacterias usan para secretar proteínas. Los genes implicados en la formación de T6SS están agrupados y los que codifican para componentes estructurales del sistema presentan mayor grado de conservación entre rizobios y frente a otras bacterias en comparación a los genes que codifican para efectores y reguladores del sistema. En nuestro grupo se está estudiando el T6SS de *Rhizobium etli* bv mimosae Mim1² aislada de nódulos de *Mimosa affinis* y capaz de nodular además *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala*.

La cepa Mim1 contiene una agrupación de 28 genes en el plásmido f no simbiótico, relacionados con la formación de un T6SS, presentando una organización similar a la descrita en *Agrobacterium tumefaciens* C58³ que consiste en dos operones divergentes. Se ha descrito para varios microorganismos que cuando el T6SS está activo, las proteínas Hcp y VgrG que forman parte del aparato de secreción pueden detectarse en el medio extracelular³. Los genes que codifican proteínas estructurales en las dos bacterias presentan una gran similitud, así Hcp muestra un 94% de identidad entre ambas permitiendo que los anticuerpos que detectan Hcp de *Agrobacterium*³ también reaccionen con Hcp de Mim1. Utilizando anticuerpos contra Hcp de *Agrobacterium* se ha identificado esta proteína en el medio extracelular de cultivos de Mim1 en fase estacionaria y débilmente en fase exponencial. También se ha demostrado su presencia en nódulos de judía y en cultivos crecidos en presencia de exudados de *L. leucocephala*, *P. vulgaris* y *Pisum sativum*. Además, con el fin de conocer en qué condiciones se activa el T6SS de Mim1, se analizó una región de ADN presumiblemente promotora comprendida entre las dos agrupaciones de genes orientados de forma divergente de Mim1. Esta región se fusionó transcripcionalmente a un gen β -gal delator sin promotor del vector pMP220 en las dos posibles orientaciones, una de las orientaciones (P1) controlaría la expresión de genes como *hcp* y posibles efectores y la otra (P2) de otros genes estructurales. Los resultados mostraron que ambas orientaciones se expresaban a altas DO₆₀₀ (0,8-1) aunque los valores de P1 fueron entre dos y tres veces superiores a los de P2. Sin embargo a bajas DO₆₀₀ (0,1-0,2) la actividad de P1 se redujo a la mitad y la de P2 a niveles del control sin promotor.

Con el objetivo de conocer el papel del T6SS en simbiosis se han realizado 3 mutantes que afectan a genes estructurales del T6SS de Mim1, uno en el gen *hcp*, otro en *tssM* y el tercero es una delección de todos los genes presumiblemente dependientes de P2. Se examinó el fenotipo producido en *P. vulgaris* y *L. leucocephala* y se observó que los tres mutantes produjeron nódulos blancos y plantas con un porte similar a plantas no inoculadas, con menor tamaño que las inoculadas con la cepa parental y con un color más amarillento.

En este trabajo se ha mostrado por primera vez que la presencia de un T6SS en rizobios tiene un efecto beneficioso en la simbiosis con varios hospedadores. En estos momentos se está trabajando en la caracterización de posibles efectores.

Referencias.

1. Records AR. 2011 The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 751-757.
2. Rogel MA *et al.* 2014. Genomic basis of symbiovar mimosae in *Rhizobium etli*. *BMC Genomics* **15**: 575
3. Wu, HY *et al.* 2012. Acid-induced type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog* **8**: 1-18

Agradecimientos.

Agradecemos a Ana Bautista y a Chendo García su ayuda en la realización de los experimentos y con el material de invernadero. Este trabajo está financiado por el MINECO (Ref.: BIO2013-43040) (JMP) y por la UPM (AL16-PID-06) (LR).

NodD2 de *Rhizobium tropici* CIAT 899 es responsable de la síntesis de Factores de nodulación en presencia de estrés osmótico e independiente de flavonoides

Pablo del Cerro¹, Isamar Moyano-Bravo¹, Francisco Pérez-Montaña¹, Irene Jiménez-Guerrero¹,
Mariangela Hungria², Francisco Javier López-Baena¹, Francisco Javier Ollero¹.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

²Embrapa Soja. Londrina, Paraná, Brasil.

E-mail: pdelcerro@us.es

En las interacciones simbióticas que se da entre un grupo de bacterias del suelo conocido como rizobios y la familia de plantas leguminosas, el regulador transcripcional NodD promueve la expresión de los genes de nodulación bacterianos en presencia de los flavonoides adecuados secretados por la raíz de la planta. Este conjunto de genes es responsable de la síntesis de los Factores de nodulación, los cuales inician el proceso simbiótico¹. *Rhizobium tropici* CIAT 899 es una de las mejores estirpes simbióticas de la judía (*Phaseolus vulgaris*) y además puede nodular en un gran número de leguminosas. Sin embargo, la mayor peculiaridad de esta estirpe es su capacidad de sintetizar Factores de nodulación bajo estrés osmótico en ausencia de flavonoides^{2,3}.

La secuenciación del genoma de CIAT 899 reveló la existencia de hasta 5 genes *nodD*. La función de estos 5 genes se ha descrito en los últimos años y continúa en la actualidad. NodD1 es esencial para el establecimiento de relaciones simbióticas de CIAT 899 con *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* y *Macroptilium atropurpureum*. No obstante, la simbiosis con *P. vulgaris* y *Lotus burtii* no fue abolida en el mutante en el gen *nodD1*⁴. Mientras que NodD1 es el principal activador de los genes de nodulación en presencia de flavonoides, el regulador transcripcional que activa los genes de nodulación bajo estrés osmótico era desconocido. En este trabajo, hemos demostrado que NodD2 es el responsable de la activación de estos genes y por tanto de la síntesis de Factores de nodulación en presencia de estrés osmótico. Hemos llegado a esta conclusión a través de diferentes aproximaciones experimentales tales como: actividad β -galactosidasa, cromatografía en capa fina usando marcaje radioactivo y estudios transcriptómicos de las estirpes mutadas en los genes *nodD1* y *nodD2*.

Finalmente hemos demostrado que la activación de los genes de nodulación por NodD2 en presencia de estrés osmótico tiene un papel biológico en la simbiosis ya que la síntesis de Factores de nodulación de CIAT 899 es completamente regulada por NodD1 y NodD2, y es la ausencia de ambas proteínas lo que abole el proceso simbiótico de CIAT 899 en *P. vulgaris* y *L. burtii*. Esta es la primera vez que una proteína NodD está directamente implicada en la activación de los genes simbióticos bajo un estrés abiótico independiente de flavonoides.

Referencias.

1. Oldroyd GE. 2013. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252-263 DOI: 10.1038/nrmicro2990.
2. Guasch-Vidal B *et al.* 2013. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT 899 in the absence of flavonoid inducers. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 451-460 DOI: 10.1094/MPMI-09-12-0213-R.

3. Pérez-Montaña F *et al.* 2016. RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics* **17**: 198 DOI: 10.1186/s12864-016-2543-3.

4. del Cerro P *et al.* 2015. Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics* **16**: 864 DOI: 10.1186/s12864-015-2033-z.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (proyecto AGL2016-77163-R) y por la Junta de Andalucía (proyecto P11-CVI-7050). Pablo del Cerro es beneficiario de una beca predoctoral FPU (FPU14/00160) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* a diferentes hospedadores

M. Ballesteros, D. Durán, D. Domínguez, M. Albareda, J. Palacios.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP UPM-INIA), Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, y Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid.

E-mail: marta.ballesterosg@alumnos.upm.es

Los rizobios son alfa-proteobacterias capaces de infectar las raíces de las leguminosas e inducir en las mismas la formación de un nuevo órgano, el nódulo radicular. En dicho nódulo las células bacterianas, diferenciadas en bacteroides especializados en la fijación de nitrógeno, están rodeadas de una membrana peribacteroidal a través de cual la planta controla el intercambio de nutrientes hacia y desde el bacteroide. La adaptación de las bacterias al estilo de vida simbiótico es el resultado de un proceso de co-evolución entre ambos socios en el que se produce el intercambio de fuentes carbonadas y nitrógeno fijado en forma de amonio. En el proceso de establecimiento de la simbiosis se han descrito compuestos de diversa naturaleza química (flavonoides, lipoquitoligosacáridos, EPS) que median un reconocimiento específico entre el rizobio y la leguminosa.¹ Sin embargo, el intercambio de señales no termina con la formación del nódulo. El funcionamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa supone el ajuste metabólico de ambos componentes simbióticos en proceso cuyos detalles aún se desconocen. Uno de los objetivos de nuestro laboratorio se centra en el estudio de la adaptación de *Rhizobium* a la simbiosis analizando cómo la bacteria responde al ambiente nodular proporcionado por la planta. Recientemente se ha descrito que en el caso de las leguminosas que inducen nódulos indeterminados (con actividad meristemática persistente) como *Medicago*, *Pisum*, o *Vicia*, la planta envía al bacteroide una batería de múltiples péptidos denominados NCR (Nodule-specific Cystein-Rich). de los que no se conoce la función concreta, aunque se ha demostrado que algunos de ellos son capaces de inducir modificaciones en células en cultivo similares a las descritas en bacteroides (inhibición de la división celular, endorreduplicación y alteraciones en la permeabilidad de la membrana).² La hipótesis actual es que la acción combinada de los NCR controla parcial o totalmente la fisiología de la bacteria induciendo su diferenciación en bacteroide y convirtiéndole en algo similar a un “esclavo metabólico” cuya función esencial es la fijación de nitrógeno para su aporte a la planta, interfiriendo con múltiples procesos fisiológicos. En el caso de rizobios capaces de establecer simbiosis con distintas leguminosas, como es el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* con *Pisum*, *Lens*, *Vicia* y *Lathyrus*, es de esperar que los bacteroides inducidos en cada planta encuentren un hábitat intracelular distinto si cada planta aporta un complemento de péptidos diferente. En esas condiciones el estudio de la respuesta de la bacteria a cada uno de esos hábitats podría aportar información relevante sobre los caracteres que permiten la adaptación de *Rhizobium* al estilo de vida intracelular en los nódulos de las leguminosas.

En este trabajo se trata de evaluar la importancia de caracteres de adaptación al hospedador en la asociación simbiótica entre *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (*Rlv*)

y plantas leguminosas. Para ello se ha realizado la comparación de los perfiles proteómicos de células endosimbióticas de *Rlv* UPM791 inducidas en nódulos de lenteja (*Lens culinaris*) y guisante (*Pisum sativum*). Dichos perfiles se obtuvieron mediante análisis LC-MS de extractos de bacteroides, complementado con marcaje diferencial empleando la metodología iTRAQ. Este análisis ha revelado la existencia de diferencias en la expresión de un número significativo de proteínas codificadas en distintas partes del genoma bacteriano. Entre estas proteínas se han identificado proteínas de respuesta a estrés, un regulador transcripcional de tipo GntR, y otras proteínas que podrían tener un papel en el metabolismo de C/N en el bacteroide. Estos datos sugieren que las bacterias encuentran ambientes distintos en distintos hospedadores induciendo respuestas de adaptación diferenciales.

Dos de las proteínas identificadas, denominadas DABA y AMYDO, se encuentran codificadas en el plásmido simbiótico de la bacteria y se expresan a un nivel significativamente superior en guisante respecto a lenteja. La primera proteína citada es similar a una diaminobutirato 2-oxoglutarato transaminasa. Esta enzima podría intervenir en rutas metabólicas de síntesis y/o utilización de poliaminas como la 5-hidroxiectoína y la ectoína para dar L-aspartato, utilizando los anillos como fuente alternativa de nitrógeno y carbono, en una ruta posiblemente ligada a la protección contra el estrés osmótico del medio.³ La segunda proteína está anotada como una urea amido-liasa y se ha identificado en la misma un motivo GRASP de unión a ATP, aunque no tenemos más información sobre su posible función. Se está procediendo a la creación de mutantes defectivos en cada uno de estos dos genes en *Rlv* UPM791 con el fin de comparar el efecto de esas proteínas sobre el fenotipo simbiótico con cada una de las leguminosas. Se evaluará también el crecimiento de los mutantes en sustratos cuya degradación podría depender de las proteínas analizadas. Los resultados obtenidos se presentarán y discutirán en la reunión.

Referencias.

1. Downie JA. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 150-170.
2. Kondorosi E, Mergaert P & Kereszt A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* **67**: 611-628.
3. Schulz A *et al.* 2016. Feeding on compatible solutes: A substrate-induced pathway for uptake and catabolism of ectoines and its genetic control by EnuR. *Environ Microbiol* DOI: 10.1111/1462-2920.13414.

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado con fondos del Proyecto SYMBIOSIGNAL (MINECO BIO13-4043-P).

Implicación de poliaminas bacteroidales en la respuesta al estrés salino en la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris*

C. Lluch, J. Hidalgo-Castellanos, A. Burgueño-Cano, A. J. Marín-Peña, J. D. Avilés-Cárdenas, J. A. Herrera-Cervera, M. López-Gómez

Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Granada.

E-mail: lluch@ugr.es

Las poliaminas (PAs) son compuestos policatiónicos presentes en la mayoría de organismos en los que desempeñan diversas funciones entre las que se encuentra la adaptación a condiciones de estrés abiótico. En nódulos de leguminosas, la homospermidina (Homspd) es una de las PAs más abundantes¹, siendo la actividad homospermidina sintasa (HSS) la responsable de su síntesis².

La Homspd está íntimamente relacionada con la tolerancia al estrés en rizobios de crecimiento rápido y en la protección del bacteroide frente a cambios ambientales. Por esta razón, a fin de conocer la implicación de esta PA en los mecanismos de tolerancia a la salinidad de *Rhizobium tropici* (CIAT899) en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, en este trabajo se ha construido una cepa con la síntesis de Homspd inactivada (HSS-).

R. tropici HSS- no acumuló Homspd, mientras que esta PA fue la más abundante en la cepa silvestre (wt). Sin embargo, la ausencia de Homspd indujo la acumulación de otras PAs comunes como putrescina (Put), spermidina (Spd) y espermina (Spm) en la cepa HSS-. En condiciones de estrés salino, los niveles de Put disminuyeron en ambas cepas, por el contrario, Spd, Spm y Homspd se acumularon en la cepa wt, lo que demuestra el papel de estas PAs en respuesta a la salinidad³.

La cinética de crecimiento de *R. tropici* wt y HSS- indica que la HSS no es esencial para el crecimiento de la bacteria, debido a la acumulación de otras PAs como Spd y Spm que suplantarían a la Homspd. Sin embargo, la cepa HSS- mostró una menor tolerancia a las condiciones de salinidad, debido a la ausencia de Homspd. Por otro lado, en la cepa mutante se indujo la biosíntesis de Put con respecto a wt, especialmente por el incremento de la actividad ornitina descarboxilasa (ODC), que constituye la única ruta biosintética de Put en algunas especies como *Rhizobium leguminosarum*⁴.

El estudio de los niveles de PAs en diferentes fracciones del nódulo reveló que la acumulación de Homspd se produce en los bacteroides, sugiriendo que podría desempeñar un papel importante en la fijación de N₂. Además de Homspd, en la fracción bacteroidal se detectó 4-Aminobutilcadaverina (4-Abcad), no encontrada en bacterias libres, lo que indica que su producción depende de la cadaverina (Cad) citosólica suministrada por la planta². En nódulos inducidos por la cepa HSS- no se encontraron ninguna de las dos PAs, lo que confirma que la HSS es responsable de la síntesis de ambas por los bacteroides.

El metabolismo nodular se evaluó mediante la determinación de la tasa de fijación de nitrógeno (NFR) así como la biomasa de los nódulos, que fue significativamente menor en plantas inoculadas con la cepa HSS-. Esta reducción podría estar relacionada con la

implicación del gen *hss* en la organogénesis del nódulo, lo que se ha sugerido previamente para los genes *spds* y *spms* durante las primeras etapas de la formación del nódulo en *Lotus japonicus*⁵.

La NFR fue mayor en nódulos colonizados por la cepa HSS- que acumulaba mayores cantidades de Put, Spd y Spm tanto en bacteroides como en citosol. Esta correlación positiva entre la fijación de nitrógeno y los niveles de PAs se ha descrito previamente en nódulos de *Vigna mungo*⁶ donde los niveles de Put se han relacionado con funcionamiento del nódulo y se propone como marcador de senescencia nodular. Sin embargo, en salinidad la Put no contrarresta la ausencia de Homspd y 4-Abcad, lo que conlleva una inhibición de NFR en nódulos HSS-. Este resultado está relacionado con la reducción de la biomasa vegetal observada en plantas inoculadas con la cepa HSS-, lo que sugiere que Homspd y/o 4-Abcad juegan un papel en la tolerancia a la salinidad en la simbiosis *P. vulgaris* - *R. tropici*.

En conclusión, la actividad de HSS no es esencial para el crecimiento de *R. tropici*, aunque lo mejora en condiciones de estrés salino. Atendiendo a la bajada de peso fresco de los nódulos y la reducción biomasa vegetal a causa de la salinidad en las plantas inoculadas con cepa HSS-, se puede concluir que esta enzima participa en la organogénesis del nódulo y la tolerancia a la salinidad.

Referencias

1. Lopez-Gomez M *et al* 2014. Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant Soil* **374**: 149–159.
2. Fujihara S. 2009. Biogenic amines in rhizobia and legume root nodules. *Microbes Environ* **24**: 1–13.
3. Shamseldin A, Nyalwidhe J & Werner D. 2006. A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* Strains. *Curr Microbiol* **52**: 333–339.
4. Shaw FL *et al*. 2010. Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine sym-homospermidine. *J Biol Chem* **285**: 14711– 14723.
5. Efrose RC *et al*. 2008. Characterization of spermidine and spermine synthases in *Lotus japonicus*: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules. *Planta* **228**: 37–49.
6. Lahiri K, Chattopadhyay S & Ghosh B. 2004. Correlation of endogenous free polyamine levels with root nodule senescence in different genotypes in *Vigna mungo* L. *J Plant Physiol* **161**: 563–571.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con cargo al proyecto MINECO (Ref. AGL2013 42778-P) y el Plan Andaluz de Investigación (AGR-139).



SESIÓN V:

**BACTERIAS PROBIÓTICAS DE
PLANTAS**

PLANTAS

PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS DE

Mejora del rendimiento de cultivos de canónigos mediante el empleo de una nueva especie de bacteria endófito de maíz

L. Celador-Lera^{1,3}, X. Cruz-González^{1,3}, F. Díaz-Fernández¹, P. García-Fraile³, R. Rivas^{1,2,4}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca; ²Unidad Asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC(IRNASA); ³Microbiology Institute. Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic; ⁴Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Salamanca.

E-mail: lorenacelador@usal.es

La preocupación actual sobre la calidad de los alimentos y de la salud humana ha llevado a la búsqueda de alternativas para sustituir los agroquímicos por productos biológicos. Para la formulación de biofertilizantes, es fundamental utilizar cepas perfectamente identificadas y seguras para la salud animal y vegetal. En este sentido, el género *Rhizobium* es conocido por sus múltiples connotaciones positivas en agricultura, ampliamente estudiado en la interacción con leguminosas, pero también utilizado con otros tipos de cultivos. Además, su aplicación no presenta peligro para la salud humana, siendo susceptibles de ser utilizadas como biofertilizantes en vegetales comestibles en crudo ¹

Por otra parte, cada vez es mayor el consumo de vegetales consumidos en fresco debido a su alto interés en dietas saludables ² y por sus efectos cardioprotectores, entre otros ³. Este es el caso de los canónigos, vegetales que registran una demanda de consumo cada vez mayor ⁴.

Con el fin de incrementar el desarrollo de este cultivo se seleccionó una cepa endófito de maíz con potencial PGPR, identificada como una especie nueva de *Rhizobium*. En primer lugar, se estudió la interacción de esta cepa con las raíces de canónigos. Para ello, se transformó esta cepa con el plásmido pHc60 que contiene el gen de la *gfp*, cuya expresión nos permitió observar mediante microscopía confocal y fluorescencia que la cepa objeto de estudio colonizaba de manera eficaz la superficie de la raíz.

Posteriormente, se secuenció el genoma de esta cepa para dilucidar su potencial biotecnológico y qué genes podían verse implicados en la promoción del crecimiento vegetal de los canónigos. El análisis previo de la información nos ha mostrado que el tamaño del genoma de la cepa es de 6,2 Mpb, y se han encontrado genes implicados en la producción de sideróforos y captación del hierro, en la biosíntesis y transporte del triptófano y en la solubilización de fosfato, entre otros.

Se evaluó también la capacidad para incrementar el crecimiento radicular en estadios tempranos, mediante cultivos *in vitro*. Se observó que las semillas de canónigos inoculadas con dicha cepa muestran un desarrollo radicular más temprano respecto al control negativo sin inocular.

Posteriormente, se realizaron ensayos en condiciones controladas de invernadero. Los resultados obtenidos mostraron que la parte aérea de plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium* presentaron un incremento un 13% en longitud; un 7% en peso fresco y un 11% de peso seco, cuando se compararon con las plantas sin inocular.

Se analizó también el estado nutricional de la planta, midiendo el contenido de clorofila, nitrógeno y otros oligoelementos de las hojas de canónigos. Observándose un incremento del 20,4% en contenido en clorofila y un 5,7% en contenido de nitrógeno, en aquellas plantas que habían sido inoculadas.

Por tanto, los resultados indican que la nueva cepa de *Rhizobium* empleada en este estudio podría ser susceptible de ser utilizada como biofertilizante seguro y eficaz para los cultivos de canónigos.

Referencias.

1. García-Fraile P, Carro L, Robledo M, *et al.* 2012. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS*, **7**: e38122.
2. Harborne JB & Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504. doi:10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
3. Kris-Etherton P, Hecker K & Bonanome A. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* **113**: 71-88.
4. Grzegorzewski *et al.* 2010. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chem.* **122**: 1145-1152. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.104.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Junta de Castilla y León (SA169U14) y MINECO (AGL2015-70510-R).

Estudio y análisis de la inoculación de *Rhizobium laguerreae* en cultivos de espinaca (*Spinacia oleracea* L.)

A. Jiménez-Gómez^{1,2}, J. D. Flores-Félix^{1,2}, P. García-Fraile³, P. F. Mateos^{1,2,4}, E. Menéndez⁵, E. Velázquez^{1,2,4}, and R. Rivas^{1,2,4}.

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca; ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Salamanca; ³Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic, Prague, Czech Republic ⁴Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC; ⁵ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Portugal.

E-mail: alexjg@usal.es

El incremento de la población y sus requerimientos alimenticios surgidos en los últimos años instan a un cambio necesario en el sistema de producción agrícola, ya que está basado en el uso abusivo de pesticidas y fertilizantes químicos, desembocando en grandes problemas medioambientales y de salud humana. Una alternativa es el empleo de microorganismos rizosféricos que promuevan el crecimiento vegetal, siendo ésta una de líneas prioritarias de actuación en las nuevas políticas medioambientales de todo el mundo.

El objetivo de este estudio, es analizar los efectos de la inoculación y la promoción del crecimiento en cultivos de espinaca, uno de los cultivos con mayor interés agroalimentario, tras la aplicación de un inoculante bacteriano, basado en una cepa de *Rhizobium laguerreae*. En la literatura se ha mostrado ampliamente el efecto beneficioso de cepas pertenecientes al género *Rhizobium* en plantas leguminosas, sin embargo, su estudio en otros vegetales es aún muy escaso.

Los resultados muestran que la cepa PEPV40 presenta varios mecanismos de promoción del crecimiento. Además, es capaz de producir biofilms y colonizar las raíces de la espinaca. Su inoculación incrementa significativamente parámetros vegetativos como el número de hojas, su tamaño y peso, el contenido de clorofila y nitrógeno, independientemente del desarrollo vegetal de la planta.

Los datos obtenidos muestran que *Rhizobium laguerreae* promueve el crecimiento vegetal y mejora la producción y calidad de cultivos de espinaca, confirmando que las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son excelentes inóculos bacterianos, además de excelentes candidatos ideales para diseñar y desarrollar biofertilizantes.

Agradecimientos

A los proyectos SA169U14 de la Junta de Castilla y León y AGL2015-70510-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. A los contratos predoctorales de JDF de la Universidad de Salamanca y al de AJG del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Mejora de la producción de fresa (*Fragaria x ananassa*) mediante la inoculación de *Phyllobacterium endophyticum*

J. D. Flores-Félix^{1,2}; L. R. Silva³, P. F. Mateos^{1,2,4}; E. Velázquez^{1,2,4}; P. Andrade³, E. Martínez-Molina^{1,2,4}; R. Rivas^{1,2,4}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca; ² Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE); ³REQUIMTE/ Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal; ⁴Unidad Asociada de I+D Universidad de Salamanca (USAL)-CSIC (IRNASA)

E-mail: jdflores@usal.es

En la actualidad el consumo de frutos denominados frutos rojos se ha popularizado debido a los beneficios que implica para la salud humana dentro de lo que se denomina alimentación funcional, en la que mediante la ingesta de determinados alimentos se busca no sólo nutrirse sino mejorar el estado de salud. Estos frutos aportan gran cantidad de vitaminas y antioxidantes por lo que son muy apreciados¹. De esta manera, el cultivo de fresa en España tiene una importancia destacable ya que nuestro país es el principal productor y exportador a nivel europeo. Otro de los aspectos demandados por los consumidores es una producción agrícola más sostenible y amigable con el medio ambiente, reduciendo la cantidad de fertilizantes inorgánicos aplicados. Una de las herramientas con las que afrontar este reto es el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs en la agricultura². Estas bacterias presentan mecanismos capaces de estimular el desarrollo de las plantas, como son la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato o la producción de fitohormonas³. En este trabajo se plantea la inoculación de la cepa PEPV15, identificada como *Phyllobacterium endophyticum* y aislada a partir del nódulos de *Phaseolus vulgaris*, sobre cultivos de fresa (*Fragaria x ananassa*). Esta bacteria presenta diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal como son la producción de sideróforos, la solubilización de fosfato y la producción de ácido indol acético.

De acuerdo a estas cualidades se estudió la respuesta de las plántulas de fresa a la inoculación con PEPV15, obteniendo como resultado un incremento en la longitud radicular, un mayor número de raíces secundarias y un mayor desarrollo de la parte aérea. La capacidad de colonización fue estudiada mediante microscopía confocal de fluorescencia donde se observó como colonizaba activamente la superficie radicular mostrando una especial predilección por los espacios intracelulares. Tras demostrar una destacable capacidad para colonizar la raíz, se inocularon plantones de fresa y se recogieron los frutos, produciéndose un incremento en la categoría de los frutos recolectados de los plantones inoculados. Los frutos recolectados mostraron un incremento en la concentración de nitrógeno, fósforo, potasio y hierro. Debemos destacar, que la concentración de vitamina C presente en los frutos de los plantones inoculados duplicaba la concentración que encontrábamos en los frutos de los plantones sin inocular.

De acuerdo con estos resultados, se decidió probar la capacidad de la cepa PEPV15 para promover el crecimiento en plantas de fresa en condiciones de campo sobre cultivos comerciales de producción integrada en las zonas de producción en la provincia de Huelva. Los frutos recolectados procedentes de los plantones inoculados con PEPV15 presentaban un mayor calibre y por tanto un mayor peso medio que aquellos frutos

procedentes de plantones no inoculados. El porcentaje de frutos de categoría extra y primera se veía incrementado en un 6% y un 17% respectivamente, reduciéndose el número de frutos de categorías segunda y tercera, produciendo de esta manera una mejora de la producción a través de un incremento en la masa producida y en la calidad de la misma. En lo que a la composición elemental respecta, se observó un incremento generalizado de la concentración de macro y micronutrientes en los frutos procedentes de plantones inoculados siendo destacable el nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, todos ellos importantes nutrientes con funciones esenciales para el correcto desarrollo de la planta. Como en el ensayo llevado a cabo en condiciones de invernadero, se estudió la concentración de vitamina C en los frutos recolectados observándose un incremento del 30% en aquellos frutos provenientes de los plantones inoculados con respecto a los plantones control. De acuerdo a estos datos, la utilización de la cepa PEPV15 como inoculante en plantas de fresa puede ser utilizada para mejorar tanto la producción de fresa como la calidad de dicha producción, por lo que puede ser considerado un excelente candidato para su utilización como bioinoculante.

Referencias.

1. Nile SH & Park SW. 2014. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* **30**: 134-144.
2. Ruzzi M, Aroca R. 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Sci Hort* **196**: 124–134. doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.042
3. Garcia-Fraile P, Menendez E & Rivas R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng* **2**: 183–205. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183

Agradecimientos

JDFF está contratado con una Ayuda para la Formación de Personal Investigador de la Universidad de Salamanca. Este trabajo fue financiado por la Junta de Castilla y León (ref: SA183A11-2 y ref: SA169U14).

Efectos agronómicos de la inoculación de *Bacillus siamensis* en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum*)

R. Pastor-Bueis, R. Mulas, X.A. Gómez-Barrios, F. González-Andrés

Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad (IRENA). Universidad de León.

Email: rpasb@unileon.es

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR), ha recibido en los últimos años una especial atención en agricultura. Estas PGPR, entre las que se encuentra el género *Bacillus*¹, actúan de múltiples maneras: Estimulan el crecimiento vegetal mediante acción hormonal, solubilizan nutrientes como el fosfato mineral o el hierro e incrementan el contenido en clorofila y la actividad fotosintética de la planta²³. Como consecuencia, mejoran la supervivencia de las plantas, ejercen un efecto positivo sobre el rendimiento de los cultivos y promueven la defensa natural de la planta ante agentes patógenos, resultando posible la reducción del uso de productos químicos de síntesis⁴.

El objetivo del presente trabajo es analizar en condiciones de campo, en un cultivo de pimiento rojo dulce (*Capsicum annuum* L), los efectos agronómicos de la inoculación con una cepa de la especie *Bacillus siamensis*. Dicha cepa fue aislada del interior de los tejidos de las raíces de un cultivo de pimiento en la demarcación de la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente” (León-España), identificada mediante la secuenciación completa del gen 16S rDNA, y seleccionada por sus propiedades PGPR *in vitro*⁵.

El ensayo de campo se llevó a cabo en la localidad de León, España, y tuvo un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones. Cada parcela elemental (de 3 m² de superficie) contaba con un total de 40 plantas. Las plantas, fueron producidas en semillero sobre sustrato profesional (70% de turba rubia, 30% de turba negra, NPK 12-14-24 y pH 6) y trasplantadas posteriormente a campo. Los tratamientos consistieron en la inoculación en dos etapas (50% en el semillero y 50% al inicio de la floración, en el campo) con la cepa elegida de *Bacillus siamensis* hasta alcanzar las siguientes concentraciones totales de ufc por planta: Tratamiento 1, 2x10⁹ ufc/planta; tratamiento 2, 1,5x10⁹ ufc/planta, ambos abonados con el 80% de las extracciones teóricas de Nitrógeno por el cultivo. La dosis de inóculo bacteriano, fue escogida de acuerdo a la concentración de PGPR proporcionada por Zhao *et al.* (2011). Además se incluyeron tres controles sin inocular, uno sin aporte de N, otro con el 80% de las extracciones teóricas de N por parte del cultivo, y un tercero abonado con el 100% del N.

La cosecha se efectuó con el procedimiento habitual de realizar diferentes pases de recolección, a medida que maduraban los frutos. Se cosecharon los frutos de las plantas situadas en el área central de cada parcela, despreciándose las plantas en las bordes de las parcelas. Se determinó el rendimiento del cultivo y algunas características de los frutos como morfología, contenido en N, P, K, Ca y Mg, y pH y sólidos solubles totales del jugo extraído de los mismos.

Para confirmar la permanencia del *Bacillus* inoculado en la endosfera, una vez finalizada la cosecha, se recogieron y esterilizaron superficialmente las raíces de varias plantas al

azar por cada parcela elemental. Se aislaron las bacterias endofíticas y cultivaron en placas Petri con medio de cultivo TSA (Tryptic Soy Agar). Para comprobar que aquellas colonias que tenían una morfología igual a la cepa inoculada pertenecían a dicha cepa, se analizó su perfil RAPD y se comparó con la cepa pura inoculada.

Los resultados desvelaron que la inoculación, independientemente de la dosis de microorganismos utilizada, acompañada de una dosis de fertilizante nitrogenado correspondiente al 80% de las extracciones de N, produjo un rendimiento por planta significativamente más elevado que los controles sin abonar con N y abonado con el 80% del N extraído por el cultivo. Dicho rendimiento por planta fue similar al obtenido en el control sin inocular fertilizado con el 100% del N. Sin embargo cuando la producción se analizó en términos del rendimiento por ha, el tratamiento inoculado con *Bacillus siamensis*, superó significativamente incluso al del control fertilizado con el 100% del N, debido a la mayor susceptibilidad de este control frente al ataque de *Phytophthora capsici*. Además el tratamiento de inoculación causó diferencias significativas en la máxima circunferencia del fruto, el grosor de la carne y el contenido en P, si bien no modificó significativamente el pH o los °Brix del jugo extraído del fruto.

El reaislamiento de la bacteria inoculada, confirma que fue capaz de sobrevivir hasta el final de la cosecha. La población de la bacteria inoculada al final del ciclo del cultivo fue del orden 10^3 ufc/g de raíz. Este dato podría ser considerado bajo si se compara con otros trabajos en los cuales se alcanzaron valores comprendidos entre 10^4 to 10^7 ufc/g, si bien podría estar debido a que dichos estudios fueron realizados en macetas, en lugar de parcelas en campo⁶.

Referencias.

1. Prashar P, Kapoor N & Sachdeva S. 2014. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* **13**: 63–77.
2. Glick BR. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* **169**: 30–39.
3. Vafadar F, Amooaghaie R, & Otrushy M. 2013. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *J Plant Interact* **9**: 128-136.
4. Bhardwaj D *et al.* 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact* **13**: 66.
5. Barquero M. 2014. Caracterización y selección de bacterias y hongos micorrícicos aislados en raíces de alubia y pimiento, en la provincia de León, para el desarrollo de biofertilizantes. Tesis Doctoral no publicada. Universidad de León. 216 pp.
6. Zhao Q *et al.* 2011. Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Biol Fertil Soils* **47**: 507–514.

Mesorhizobium helmanticense*, una nueva especie endosimbionte que favorece el crecimiento de *Lotus corniculatus

M. Marcos-García^{1,2}, E. Velázquez^{1,2,3}, P. F. Mateos^{1,2,3}, R. Rivas^{1,2,3}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca; ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Salamanca; ³Unidad Asociada I+D. USAL-CSIC (IRNASA), Salamanca.

E-mail: martamg@usal.es

Actualmente, el género *Mesorhizobium* contiene más de 30 especies descritas; algunas de ellas aisladas de nódulos de *Lotus corniculatus*, como la especie tipo del género, *M. loti*. En nuestros estudios hemos estudiado la diversidad bacteriana asociada a nódulos de la leguminosa forrajera *L. corniculatus*, aislando y posteriormente identificando tres cepas dentro de una nueva especie del género *Mesorhizobium*. Para su correcta identificación se realizó el análisis filogenético del gen ribosómico 16S, los genes *housekeeping recA* y *glnII* y se realizaron estudios de hibridación ADN-ADN, tras lo cual se confirmó la pertenencia de estas cepas a la nueva especie *M. helmanticense*¹. También se llevó a cabo el análisis filogenético del gen *nodC*, el cual permite la identificación de las cepas a nivel de simbiovar². De esta manera, los resultados de este análisis nos mostró que las tres cepas aisladas de nódulos de *L. corniculatus*, e identificadas como *M. helmanticense*, están relacionadas con las cepas del simbiovar *loti*, característico de los rizobios que nodulan las distintas especies del género *Lotus* spp. Esta característica fue comprobada con posterioridad, al realizar ensayos de nodulación sobre plantas de *L. corniculatus*, tras los cuales pudimos observar como estas cepas conseguían colonizar con éxito dichas plantas e inducir nódulos en sus raíces de forma efectiva. Estos ensayos de nodulación fueron llevados a cabo en condiciones axénicas en cultivo hidropónico. Este ensayo nos permitió averiguar y conocer la cinética de nodulación que siguen las plantas inoculadas con las cepas identificadas como *M. helmanticense*, así como la cantidad de nódulos efectivos (Fix+), y la morfología e histología de los mismos en cada caso. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos con dos controles que se llevaron en paralelo sin inocular, uno de los cuales llevaba un aporte de nitrógeno. Así mismo y debido a que actualmente hay descritas tres especies endosimbiontes de *L. corniculatus*: *M. loti*, *M. jarvisii* y *M. erdmanii*³, se realizó una cinética de nodulación con las cepas tipo de dichas tres especies endosimbiontes para hacer una comparativa con el comportamiento de las plantas inoculadas con *M. helmanticense*.

De este modo pudimos observar cómo la cinética de nodulación fue lineal, no fue rápida, de tal manera que tras 30 días post inoculación (DPI), el número total de nódulos en cada uno de los tratamientos llevados a cabo con *M. helmanticense*, no fue muy elevado. A pesar de ello, las plantas inoculadas mostraron un aspecto totalmente sano, con nódulos determinados y efectivos, de color rosáceo, sinónimo de estar fijando nitrógeno en su interior. Así mismo, la visualización de cortes histológicos de los diferentes nódulos, representantes de los tratamientos realizados con las tres cepas, nos mostró un interior celular organizado, con células definidas y simbiosomas claramente diferenciados. Los nódulos inducidos por *M. helmanticense* presentan un porcentaje alto de células

invadidas, con simbiosomas claramente definidos en su interior, y sin rastro de bacterias dispersas o estructuras amorfas.

De los ensayos de nodulación pudimos también obtener datos relativos a la longitud de las plantas inoculadas, donde pudimos observar un desarrollo normal en cada uno de los tratamientos llevados a cabo. En rasgos generales todas las plantas alcanzaron similar longitud, destacando por encima, tanto de los controles como de los tratamientos llevados a cabo con las cepas endosimbiontes, la cepa *M. helmanticense* CSLC19N, la cual induce una mayor promoción del crecimiento vegetal, con resultados estadísticamente significativos.

Tomados en conjunto todos estos resultados, podemos decir que *M. helmanticense* tiene la capacidad de nodular su planta hospedadora de forma efectiva, promoviendo un crecimiento vegetativo normal y sano, a la vez que induce un número adecuado de nódulos en sus raíces, por lo que podría ser una buena candidata a constituir un biofertilizante eficaz.

Referencias.

1. Marcos-García M *et al.* 2017. *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* (en prensa)
2. Peix A *et al.* 2015. Bacterial Associations with Legumes. *Crit Rev Plant Sci* **34**: 17–42.
3. Martínez-Hidalgo P *et al.* 2015. Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471^T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669^T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1703–1708.

Análisis y efecto del uso de biofertilizantes en *Trifolium rubens* L., planta de atención preferencial en Castilla y León, España; con el propósito de incrementar su estado de conservación

X. Cruz-González^{1,2}, N. Laza-Pérez¹, P. F. Mateos^{1,2,3}, R. Rivas^{1,2,3}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca; ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Salamanca; ³Unidad Asociada I+D. USAL-CSIC (IRNASA), Salamanca.

E-mail: xavier.cruz@usal.es

Las acciones humanas como la deforestación, industrialización, contaminación, entre otras han propiciado una reducción en el crecimiento poblacional de algunas especies e inclusive que muchas de éstas desaparezcan. La desaparición de cualquier especie animal o vegetal puede alterar el delicado equilibrio ecológico de la zona. Con el objetivo de identificar y reconocer el estado de conservación de las plantas, la Comunidad de Castilla y León (España) ha desarrollado un Catálogo de la Flora Protegida (Decreto 63/2007 del 14 de junio)¹, dónde clasifica las especies vegetales en peligro de extinción, vulnerables, interés especial, atención preferente y aprovechamiento regulado. Una especie de este listado es la leguminosa *Trifolium rubens* L., la cual está clasificada como planta de atención preferente, lo que significa que sus poblaciones son reducidas y podrían verse afectados por determinados factores, requiriendo un plan de manejo. En la literatura científica hay muy pocos trabajos relacionados con esta planta e insuficientes los que describen su interacción simbiótica. El conocer e identificar cepas fijadoras de nitrógeno en simbiosis con esta planta, podría fomentar su crecimiento y expansión de las comunidades que forman, pues, una buena interacción aumentaría la cantidad de nitrógeno exclusiva para esta planta lo que repercute en una planta más sana y más competente, finalmente resultando en una mejora en su estado de conservación. Por tanto, el objetivo es analizar el efecto de cepas de *Rhizobium* sp. como potenciales biofertilizantes en *Trifolium rubens* L., especie de atención preferente en Castilla y León.

Se analizó el potencial de tres cepas del género *Rhizobium* para mejorar el crecimiento y desarrollo de *T. rubens* L. Una de las cepas corresponde a *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ATCC14480 y las otras dos cepas fueron aislados de *Trifolium repens* L. (NTRH2 y NTRH6). Se evaluó el potencial PGPR de las cepas, además de la capacidad de nodulación de las mismas. Las tres cepas demostraron ser productores de ácido indolacético (AIA), siendo la cepa ATCC 14480 el mayor productor. Esta hormona es capaz de controlar la estimulación del crecimiento y la elongación de la raíz², por tanto, esto implicaría en una mayor adquisición de nutrientes, lo que repercutiría en plantas más sanas y competentes. De manera *in vitro* se observó la producción de celulasas y biofilms, presentando todas las cepas objeto de análisis una evaluación positiva.

La celulosa producida por parte de la bacteria puede servir de matriz de soporte en el desarrollo de estos biofilms, propiciándole una adhesión y anclaje en la raíz de la planta. De hecho, se ha demostrado que *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii polimeriza microfibrillas de celulosa *in situ* en la raíz de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) para colonizarla³. Todas las cepas aunque en diferente grado, mostraron actividad celulolítica,

al degradar la carboximetilcelulosa (CMC), como consecuencia puede facilitar la entrada de las cepas al interior de la planta a través del pelo radicular. Como última prueba *in vitro* se demostró que todas las cepas eran capaces de nodular las plantas de *T. rubens* L., cabe destacar que las cepas NTRH2 y NTRH6 parecían ser más eficientes. Los cortes histológicos de los nódulos obtenidos nos permitieron comprobar que tenían una estructura correcta con zonas donde se podía atribuir que ocurriera fijación biológica de nitrógeno. La cantidad de nódulos por tratamiento estuvo entre 1.8 y 3.6 sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos.

Por último, se realizaron ensayos en invernadero con suelo (turba-vermiculita, 3:1) no estéril. Desde el día 38 post-inoculación la cepa control mostraba menor cantidad de clorofila. El contenido de clorofila se correlaciona con la cantidad de nitrógeno en la planta⁴. Tras 67 días en invernadero se analizaron las plantas, determinando que las mediciones de: longitudes y pesos; tanto aéreos como radiculares, además de clorofila, todas estas eran significativamente mayores que el control. La cantidad de nódulos fue mayor en las inoculadas aunque no fue significativa entre el control, NTRH2 y NTRH6 con unas medias de 97.4, 99.8 y 114.1 por planta respectivamente. Sin embargo, los nódulos del control eran de tamaño más pequeño y color blanco; a diferencia de los tratamientos que eran más grandes y rosados.

En conclusión, las cepas NTRH2, NTRH6 y ATCC 14480 pueden mejorar el crecimiento y desarrollo de *T. rubens* L., planta de atención preferente en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Por tanto, una buena selección de cepas eficientes que actúen como biofertilizantes pueden mejorar el estado de conservación de muchas plantas, incluyendo las que se encuentran en peligro de extinción.

Referencias.

1. Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León. 2007. Decreto 63/2007 de 14 de junio. B.O.C. y L. - N.º 119. Junta de Castilla y León.
2. Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, & Glick BR. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**: 85-125.
3. Mateos PF *et al.* 1995. Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii attached to the root epidermis of white clover. *Can J Microbiol* **41**: 202-207.
4. Novoa SA, & Villagran A. 2002. Evaluación de un instrumento medidor de clorofila en la determinación de niveles de nitrógeno foliar en maíz. *Agric Tech* **62**: 166-171.

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado por la Junta de Castilla y León (Ref.:SA169U14) y MINECO (Ref.:AGL2015-70510-R). XCG agradece a la Fundación Kinesis (Puerto Rico) por su Beca.

Interacción de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2 con leguminosas

A. Díez-Mendez^{1,2}, P. García-Fraile³, E. Menéndez^{1,2}, P. F. Mateos^{1,2,4}, R. Rivas^{1,2,4}.

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca; ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE); ³Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic; ⁴Associated Unit USAL-CSIC (IRNASA), Salamanca.

Email: alexandradm@usal.es

La cepa ALA10B2 es un rizobio perteneciente a la especie *Rhizobium cellulosilyticum*, que fue aislada originalmente de madera en descomposición de *Populus alba*¹. Este ambiente tan peculiar, difiere del nicho común de aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, como son los nódulos de las plantas leguminosas. Esta cepa bacteriana fue descrita como un super-productor natural de celulosa y celulasas¹. En nuestro grupo de investigación, se ha descrito que estas dos moléculas están involucradas en la adhesión radicular², formación de biofilms³ e infección primaria⁴ respectivamente, etapas clave para un buen desarrollo simbiótico. Estas características, nos pusieron de manifiesto el potencial de esta cepa bacteriana como inoculante para la mejora de la producción de cultivos de interés agrícola.

Para esclarecer este apartado, procedimos a la secuenciación del genoma de la cepa ALA10B2 para la búsqueda de genes implicados en la síntesis de celulosa y celulasas, así como de genes asociados a la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) y genes implicados en mecanismos PGPRs. El análisis *in silico* del borrador del genoma puso de manifiesto la existencia de 5 potenciales genes relacionados con actividad glicosil hidrolasa y 2 genes con actividad glicosil transferasa por lo que es posible que estos genes estén involucrados en el desarrollo de las primeras etapas simbióticas. En cuanto a la búsqueda de genes relacionados con la FBN, encontramos 1 gen *fixJ*, pero ningún gen asociado con la nodulación ni con la presencia de nitrogenasa. Por otra parte, encontramos 4 genes relacionados con la biosíntesis de IAA, ningún gen relacionado con la síntesis de ACC-desaminasa, giberelinas, citoquininas y etileno. Otros 6 genes implicados en la producción de sideróforos, 7 genes asociados al metabolismo del fosfato y 9 genes relacionados con el metabolismo del potasio. En concordancia, las pruebas bioquímicas llevadas a cabo *in vitro* revelaron actividad enzimática correspondiente a las proteínas codificadas por los genes respectivos, encontrados en el borrador del genoma.

Para confirmar la presencia y/o ausencia de los genes implicados en FBN, procedimos a realizar ensayos *in planta* con diferentes leguminosas *Phaseolus vulgaris*, *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens* e inoculadas con la cepa ALA10B2 marcada con RFP. Los fenotipos observados en todas las leguminosas ensayadas fueron que, la cepa ALA10B2 era capaz de colonizar la superficie radicular, y de interactuar con los pelos radiculares, ya que las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2 mostraban el fenotipo RaT (Redirections at the Tip) y el fenotipo Had (moderate root hair deformation). Sin embargo, no se observaron los fenotipos Noi (nodule formation), Nod (emerged nodule), Hac (marked curling of roots hairs, the so-called “shepherd’s crook”) ni Inf (Infection-thread formation within roots hair).

Estos datos nos pusieron de manifiesto la nula capacidad de la cepa ALA10B2 para nodular las leguminosas ensayadas. Sin embargo, debido a sus cualidades PGPR y su capacidad para sintetizar celulosa y celulasas, pensamos en su potencial como *helper* de otros endosimbiontes durante las primeras etapas simbióticas. Por ello, se decidió llevar a cabo un ensayo en invernadero con *Phaseolus vulgaris*, utilizando como inoculantes, la cepa ALA10B2 y la cepa TPV08 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* aislada de nódulos de alubia y seleccionada por su potencial como fijador de nitrógeno en alubia. Los resultados mostraron un incremento significativamente mayor de la producción en aquellas plantas co-inoculadas con ambas bacterias⁵ lo que supone un papel importante de la cepa ALA10B2 en la optimización del proceso simbiótico.

Referencias.

1. García-Fraile P *et al.* 2007. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 844-848.
2. Mateos PF *et al.* 1995. Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. *Can J Microbiol* **41**: 202-207.
3. Robledo M, Rivera LP & Jiménez-Zurdo JI. 2012. Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact* **11**: 125. DOI: 10.1186/1475-2859-11-125
4. Robledo M *et al.* 2008. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 7064-7069.
5. Díez-Méndez A *et al.* 2015. *Rhizobium cellulosilyticum* as a co-inoculant enhances *Phaseolus vulgaris* grain yield under greenhouse conditions. *Symbiosis* **67**: 135-141.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto AGL2015-70510-R. Alexandra Díez Méndez es beneficiaria de un contrato pre-doctoral proporcionado por la Junta de Castilla y León.



SESIÓN VI:

HONGOS PROBIÓTICOS DE
PLANTAS

PLANTAS

HONGOS PROBIÓTICOS DE

Optimización del sistema de edición genética CRISPR-Cas9 en especies de *Trichoderma*

M. Sánchez-Cao, M.E. Morán-Diez, R. Hermosa, E. Monte

Departamento de Microbiología y Genética, Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, Salamanca

Email: manuelsanchezcao@gmail.com

Trichoderma es un género de hongos filamentosos que engloba a un amplio número de especies empleadas como agentes de control biológico en agricultura. Algunas cepas muestran efectos beneficiosos directos sobre las plantas, provocando un mayor desarrollo de la raíz, crecimiento de la parte aérea, captación de nutrientes o el uso eficiente de nitrógeno entre otros. La comprensión de muchos de estos procesos biológicos y de la función de los genes que los rigen requiere habilidad para manipular de forma precisa la expresión de los mismos por medio de estrategias de represión o activación. La efectividad de la interrupción de un *locus* de interés depende directamente de la frecuencia de recombinación homóloga propia de cada sistema. En *Trichoderma*, son pocos los casos de interrupciones génicas realizadas con éxito, debido precisamente a que la frecuencia de recombinación homóloga es muy baja. Es por ello que el sistema de inmunidad procariótico CRISPR-Cas9 (de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated*), emergido recientemente como una plataforma multifuncional para la regulación secuencia-específica de la interferencia o activación de la expresión génica, ha demostrado ser una herramienta fundamental a la hora de entender cómo funcionan los genomas.

En los últimos dos años se ha producido un aumento exponencial en la publicación de trabajos en los que se ha conseguido reproducir el sistema CRISPR-Cas9 en hongos filamentosos, principalmente en sistemas modelo como *Neurospora*, *Aspergillus* o *Ustilago*, siendo *Trichoderma reesei* el único ejemplo descrito en el género *Trichoderma*¹. El objetivo de nuestro estudio es el desarrollo eficiente de esta tecnología como herramienta para el análisis funcional de genes de interés en especies de *Trichoderma* que se usan como agentes de control biológico e interaccionan positivamente con plantas.

El primer obstáculo a la hora de implementar este sistema en hongos filamentosos y particularmente en *Trichoderma*, es la escasez de vectores comerciales apropiados para introducir la nucleasa Cas9 en las células de estos sistemas. Hemos diseñado una serie de vectores binarios siguiendo la metodología de clonación USER² que nos permite utilizar el sistema de transformación basado en *Agrobacterium tumefaciens* y, así, evaluar la funcionalidad de la nucleasa Cas9 en células de *Trichoderma*. Como paso previo, hemos analizado la eficacia del sistema de transformación en seis especies de *Trichoderma* que han sido transformadas con un vector binario de expresión que lleva el gen *Cas9* fusionado al gen que codifica la “Green Fluorescence Protein” (GFP). Los transformantes de *Trichoderma* se seleccionaron por crecimiento en medio de cultivo conteniendo higromicina como marcador de resistencia. Nuestros datos muestran una mayor eficacia de transformación en las cepas evolutivamente más próximas a *T. reesei*

aunque la posterior obtención de cultivos monospóricos da lugar a un alto grado de transformantes genéticamente no estables en el grado de expresión del gen *gfp*.

Referencias.

1. Liu R *et al.* 2015. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery* **1**: 15007-15017.
2. Fradsen RJN *et al.* 2008. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Mol Biol* **9**: 70-81.

Agradecimientos.

Este proyecto está financiado por el MINECO (AGL201 5-70671-C2) y la Junta de Castilla y León (SA009U16).

***Trichoderma harzianum*: de hongo beneficioso a patógeno sistémico. El papel del ácido salicílico.**

J. Poveda^{1,2}, A. Alonso-Ramírez^{1,2}, I. Martín¹, R. Hermosa^{2,3}, E. Monte^{2,3}, C. Nicolás^{1,2}

¹Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca; ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca. ³Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

E-mail: jorgepoveda@usal.es

Trichoderma es un género de hongos filamentosos ampliamente estudiados y utilizados como agentes de control biológico en agricultura, debido a mecanismos de acción como el micoparasitismo, la antibiosis, la competencia, la promoción del crecimiento vegetal, el incremento de la tolerancia frente a estreses abióticos y la inducción de las defensas de las plantas frente a patógenos.

Por lo que se refiere a *Trichoderma harzianum*, se ha comprobado como la colonización radicular se sitúa únicamente en la epidermis y el apoplasto celular, sin llegar a penetrar hasta el haz vascular de la planta¹. Para que el hongo y la planta puedan llegar a conformar una relación simbiótica necesitan de numerosas respuestas moleculares, que incluyen desde el reconocimiento entre ambos, hasta la inhibición defensiva de la planta, la cual, en un primer lugar, sería la que conseguiría limitar la penetración del hongo^{2,3}. En este sentido, recientes estudios transcriptómicos han demostrado que durante las primeras horas de interacción entre el hongo y la planta se produce una amplia reprogramación genética, precedida por un descenso transitorio de la respuesta inmune vegetal, lo que probablemente permite la colonización de la raíz^{4,5}.

Con el fin de determinar el papel que el ácido salicílico (SA) tiene en la interacción *Trichoderma*-planta realizamos diferentes estudios de colonización con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, utilizando el ecotipo silvestre Col-0 y el mutante *sid2*, incapaz de sintetizar SA (SA induction deficient 2). Estos estudios se basaron en la utilización de un sistema de cultivo hidropónico, desarrollado en nuestro grupo de investigación⁶, que permite la colonización de la planta por las hifas del hongo. Posteriormente, analizamos esta interacción mediante microscopía confocal de barrido, localización de calosa en cortes histológicos, efectos en el crecimiento y desarrollo vegetal, cuantificación de la colonización y análisis de la expresión génica.

Pudimos observar como, 72 horas tras la inoculación con el hongo, este era capaz de penetrar hasta el haz vascular de las raíces de *Arabidopsis* en el mutante *sid2*, siendo la colonización mucho más elevada que en el ecotipo silvestre, donde únicamente se situaba en la epidermis, probablemente debido a la deposición de calosa en sus capas externas, respuesta defensiva mediada por SA. Además, se comprobó como en el mutante deficiente en salicílico se dispara la expresión de un gen de síntesis del SA, pero al no ser capaz de llegar a sintetizar y acumular la hormona, intenta defenderse del hongo activando la ruta del ácido jasmónico.

A tiempos más largos, determinamos como *Trichoderma harzianum* acelera el crecimiento y desarrollo de Col-0, mientras que en el mutante *sid2* provoca una enorme

disminución en el tamaño de sus hojas, además de una considerable pudrición de sus raíces.

Todos estos datos nos hacen pensar que *Trichoderma* necesita suprimir, al menos parcialmente, el sistema defensivo de la planta para colonizar su raíz, pero es totalmente necesaria una reactivación del mismo, mediado por SA, tras un tiempo, pues por el contrario colonizaría el haz vascular vegetal, comportándose como un patógeno.

Referencias.

1. Chacón M *et al.* 2007. Microscopic and transcriptome analysis of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* **10**: 19-27.
2. Hermosa R *et al.* 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int Microbiol* **16**: 69-80.
3. Alonso-Ramírez A *et al.* 2014. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol* **15**: 823-831.
4. Morán-Díez E *et al.* 2012. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after root colonization by *Trichoderma harzianum*. *J Plant Physiol* **169**: 614-620.
5. Brotman Y *et al.* 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLOS Pathog* **9**: e1003221.
6. Alonso-Ramírez A *et al.* 2015. *Trichoderma harzianum* root Colonization in *Arabidopsis*. *Bio-protocol* **5(13)**: e1512.

Sugar homeostasis mediates arbuscular mycorrhizal fungi-induced resistance against *Botrytis cinerea*.

N. Sanmartín, P. Sánchez-Bel, D. Mateu, V. Pastor, M. J. Pozo, V. Flors

Metabolic Integration and Cell Signaling Laboratory, Plant Physiology Section, Department of Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universitat Jaume I, Castellón.

E-mail: nsanmart@uji.es

Plants are sessile organisms that are harmed by multiple pathogens, arthropods or other hostile environmental conditions, for that reason they have developed a complex immune system that can be enhanced upon an appropriated stimulus.

Beneficial microorganisms, like plant-growth promoting rhizobacteria or other root-associated mutualists, can stimulate the plant immune system. This process is called induced systemic resistance (ISR)¹.

ISR is perceived by the roots where a broad range of microorganisms interact with the plant. Among these microorganism, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), an obligate biotroph, establish a mutualistic association with plants. The symbiosis requires a coordinated response between the plant and the fungi. About 80% of plants, including crops, can establish this association. Plants obtain fitness benefits, such as a better mineral nutrition and an enhanced resistance to biotic and abiotic stresses. AMF can stimulate the plant's immune system, process known as mycorrhiza induced resistance (MIR) that is considered as specialized ISR².

Plants defense mechanisms, among others, are based on the production of toxic compounds like phytoalexins or chitinases and structural barriers, such as callose or lignin. During MIR, the AMF produces changes in the oxylipin signalling pathway of the plant³. This allows mycorrhizal plants to be better prepared to deal with an infection. In addition, changes in amino acid metabolism were also described since they are the precursors of many relevant antimicrobial secondary metabolites required for defense and signaling⁴. For example, Rivero *et al* (2015)⁵, found that Glu and Gln were accumulated in roots of mycorrhizal tomato plants.

One of the first layers of plant defense against fungal attack is the formation of a polymer of callose (a β -1,3-glucan polysaccharide) which is accumulated in the cell wall to form together with other components a structure so called papillae. This is a physical barrier to prevent the penetration of fungal pathogens⁶.

In this research study, we have studied the effect of MIR in tomato plants upon a necrotrophic fungus (*Botrytis cinerea*) infection. We have explored the mechanisms underlying sugar homeostasis using several approaches like the gene expression profiling of sugar transporters, invertases, amylases and the callose synthase (*GLS5*). Callose showed higher levels in mycorrhizal plants (AM) compared with non-mycorrhizal plants following fungal attack. We hypothesize that starch is a likely source of sugars for a faster callose deposition. Mycorrhizal plants showed an enhanced β -amylase gene expression (*BAMI*) which is the main responsible of starch degradation unrelated to circadianrhythm⁷. After starch degradation BAM1 releases manose that is subsequently

transformed into free glucose. This free glucose can be used by the callose synthase (PMR4) in the callose deposition.

Accordingly, mycorrhizal plants showed an enhanced gene expression of the genes codifying for the sucrose transporters *SUTs* and *SWEETs* and the sucrose synthases *SUSs* irrespective to infection. Interestingly, AM plants also showed an upregulated JA-dependent invertase (*LIN6*), which hydrolyses the sucrose transported to the apoplast in the plant-fungus interface. All these results and previous studies suggest that changes triggered by the fungus in the plant sugar metabolism may have an impact in defense by activating a faster and stronger starch hydrolysis that generates higher rates of free monosaccharides for a more efficient callose synthesis. The altered sugar homeostasis may be regulated by the oxylipin pathway in AM plants.

Vesicular trafficking was suggested to play a role in the callose deposition in *Arabidopsis*⁸. The callose synthase and sugar monomers are transported within the cell by actin-dependent vesicle trafficking. The fusion of these vesicles to the plasma membrane is mediated by the SNARE complex. Two Q-SNARE proteins, *SYP121* and *ATL31*, are relevant in callose deposition through the callose synthase *PMR4* in the fungal penetration sites⁹. In our study, we also profiled the gene expression of *SYP121* and *ATL31* during MIR.

Concluding, the goal of this study is to decipher the mechanism mediating the callose deposition during MIR. To elucidate this mechanism, we have examined the changes on the plant sugar metabolism and vesicular transport by the mycorrhiza fungus either in the absence or in the presence of fungal pathogen.

Referencias.

1. Pieterse C. *et al.* 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu Rev Phytopathol* **52**: 347-375.
2. Mauch-Mani *et al.* 2017. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annu Rev Plant Biol* **68** DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-041132.
3. Sanchez-Bel P *et al.* 2016. The Nitrogen Availability Interferes with Mycorrhiza-Induced Resistance against *Botrytis cinerea* in Tomato. *Front Microbiol* **14**(7):1598.
4. Gamir J *et al.* 2014. Molecular and physiological stages of priming: how plants prepare for environmental challenges. *Plant Cell Rep* **33**:1935-1949.
5. Rivero J *et al.* 2015. Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. *Front Microbiol* **23**(6): 598.
6. Luna *et al.* 2010. Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 183-193.
7. Fulton DC. *et al.* 2008. β -Amylase4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active β -Amylases in *Arabidopsis* Chloroplasts. *Plant Cell* **20**: 1040-1058.
8. Ellinger & Voight. 2014. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann Bot* **114**: 1349-1358.
9. Maekawa S *et al.* 2014. The Carbon/Nitrogen Regulator *Arabidopsis* *AtNIN* Controls Papilla Formation in Response to Powdery Mildew Fungi Penetration by Interacting with Syntrophin 121 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **164**: 879-887.

Abiotic stress or aboveground activation of plant defenses differentially impacts root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi

J. Lidoy, C. M. Amate, J. M. García, C. Azcón-Aguilar, M. J. Pozo

Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, Spain

E-mail: jlidoy@gmail.com

The widespread association between plant roots and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has an enormous potential in modern and sustainable agriculture. The mycorrhizal association can improve plant nutrition and enhance plant fitness through boosted plant resistance to pathogens and pests, as well as tolerance to diverse abiotic stresses. Despite of this, the application of mycorrhiza in agriculture is still challenging because of the variability of the results, that derive, among others, from the differential impact of environmental conditions and the partners genotypes in the interaction. Since a functional symbiosis and its benefits for plant health require a very fine-tuned regulation of plant responses, mainly orchestrated by phytohormones, a holistic approach is required for the understanding of the key regulatory signals orchestrating the interaction under different conditions, and how they affect different AMF genotypes. The aim of this work is to explore how the regulation of plant defense signaling impacts the plant interaction with different AMF strains. Using *Solanum esculentum* as a model, we evaluate two different AMF, *Funneliformis mosseae* and *Rhizoglyphus irregularis*, amply distributed in most ecosystems and commonly used as bioinoculants in commercial products. Both fungi were compared in their ability to colonize tomato roots when they were applied independently or in combination in a 6-week assay under greenhouse conditions, and the host plant was subjected to high salinity conditions (NaCl treatment) or to defense activation by the pulverization of aboveground tissues with the main defense related hormones, Methyl Jasmonate (MeJA), Abscisic Acid (ABA) and Salicylic Acid (SA). These stress treatments were applied during the establishment of the symbiosis, two weeks after inoculation, and were maintained along the assay. The hormonal treatments were applied once a week over a 4-week period. To evaluate the mycorrhizal root colonization, we used histochemical staining of fungal structures within the roots and quantification through the gridline intersect method under the stereomicroscope. Furthermore, we used species-specific qPCR primers to quantify the amount of AMF in the tissues and to evaluate the contribution of each fungi in the combined AMF treatment. We found significant differences in the pattern of colonization between the *F. mosseae* and *R. irregularis* depending on the stress or chemical treatments, ABA and NaCl treatments enhancing the colonization by *F. mosseae* and MeJA inhibiting *R. irregularis* colonization. The combined AMF treatment showed also a different pattern of mycorrhizal colonization compared to the individual fungi; MeJA, ABA and SA inhibited the colonization.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza, plant defense, hormonal regulation, MeJA, ABA, SA.

Hongos endófitos en poblaciones naturales de *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* en acantilados de la costa Atlántica

E. Pereira, B. Vázquez-de-Aldana, I. Zabalgogezcoa

Departamento de Estrés Abiótico, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca.

E-mail: eric.carvalho@irnasa.csic.es

Algunas plantas son capaces de colonizar hábitats con condiciones de estrés cuya abundancia de plantas es menor en comparación con ambientes de bajo estrés¹. Los mecanismos responsables de la adaptación a estreses ambientales no están claros. Sin embargo, en los ecosistemas naturales las plantas establecen asociaciones simbióticas con hongos que tienen funciones importantes para la planta. Esta simbiosis puede contribuir a la adaptación de las plantas a condiciones de estrés², como es el caso de los hongos endófitos, un componente importante del microbioma de plantas que viven dentro de los tejidos vegetales, pero no causan síntomas de enfermedad.

Los acantilados del Atlántico en el norte de la Península Ibérica son extremadamente inhóspitos, porque las plantas crecen en pequeñas cavidades en la roca, y están expuestas al viento, al rocío de agua salada y a bajos niveles de nutrientes³. *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* (FRP) es una gramínea perenne adaptada a estas condiciones y su tejido aéreo está sistémicamente colonizado por el hongo endofítico transmitido por semilla *Epichlōe festucae*³. Las raíces de FRP también pueden estar colonizadas por una comunidad de hongos desconocida. El objetivo de este trabajo fue identificar la micobiota endofítica cultivable de la raíz y la incidencia de infección por *Epichlōe festucae* en plantas de FRP procedentes de acantilados en la costa del Atlántico Norte.

Se recogieron un total de 105 plantas de FRP en cinco poblaciones de la costa norte de España, Torre de Hércules, Cedeira y Estaca de Bares (La Coruña) y S. Pedro de la Rivera y Cabo de Peñas (Asturias), y se examinó la presencia de hongos endófitos en las raíces y de *Epichlōe festucae* en tallos y hojas.

La presencia de *Epichlōe festucae* se observó en todas las poblaciones estudiadas, con una media de 65% en el total de plantas analizadas.

Después de sembrar fragmentos de raíces (n=3150) en placas con PDA, se obtuvieron un total de 2324 aislados, lo que representó un porcentaje de colonización global del 73,78%. Para clasificar los aislados, se realizó un cribado basado en la morfología de cultivos identificando aquellos similares de la misma población. Posteriormente, se realizaron análisis moleculares para identificar los cultivos. Se identificaron un total de 137 taxones diferentes de hongos, pertenecientes a 20 órdenes, la mayoría de la división Ascomycota. Los taxones más comunes encontrados en las raíces fueron *Fusarium*, *Mycochaetophora*, *Slopeiomyces*, *Phomopsis*, *Penicillium*, *Periconia*, *Drechslera* y *Alternaria*.

Se analizó la tolerancia a la sal y la actividad de celulasa *in vitro* de 60 hongos, incluyendo *Epichlōe festucae*. Un 58% de los hongos presentaron competencias halofitas porque su crecimiento fue mayor en medio salino; así un 53% de los hongos mostró crecimiento máximo en medio con 300mM de NaCl y un 5% con un nivel 600mM de NaCl. De estos

hongos que mostraron tolerancia a la sal, la mayoría pertenecen a los taxones de hongos endófitos más abundantes en las raíces de FRP, como es el caso de *Fusarium*, *Phomopsis*, *Penicillium*, *Periconia*, *Drechslera* y *Alternaria*, y también *Epichlœ festucae*, aislado de la parte aérea. Un 42% de los hongos no presentaron competencias halofitas, entre los que cabe señalar *Mycochaetophora* y *Slopeiomyces* debido a su abundancia.

La mayoría de los hongos (78%) mostró actividad de celulasa, independientemente de su diversidad. Estos resultados sugieren que los hongos más abundantes de la raíz así como *Epichlœ festucae* podrían estar implicados en la adaptación de *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* a su hábitat.

Referencias.

1. Perelman SB, Chaneton EJ, Batista WB, Burkart SE & León RJC. 2007. Habitat stress, species pool size and biotic resistance influence exotic plant richness in the Flooding Pampa grasslands. *J Ecol* **95**:662-673.
2. Rodriguez RJ, Henson J, Volkenburgh EV, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim YO & Redman RS. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J* **2**: 404-416.
3. Zabalgogezcoa I, Romo M, Keck E, Vázquez-de-Aldana BR, García-Ciudad A & García-Criado B. 2008. The infection of *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* by *Epichlœ festucae*. *Grass Forage Sci* **61**: 71-76.

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Investigación e Innovación Horizon 2020 de la Unión Europea en el marco del acuerdo de subvención Marie Skłodowska-Curie nº 676480.

Regulación del óxido nítrico y las hemoglobinas de plantas en el reconocimiento del huésped de hongos beneficiosos y patógenos

L. Pescador-Azofra^{1,2}, A. Martínez-Medina^{1,2}, M. C. Romero-Puertas², M. J. Pozo¹

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada; ²Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada.

E-mail: leyre.pescador@eez.csic.es

En la naturaleza las plantas interactúan con un gran número de microorganismos tanto patógenos como beneficiosos. Para ello, poseen un eficaz sistema de inmunidad innata basado en la detección efectiva de organismos potencialmente patógenos que lleva a la inducción de una rápida respuesta defensiva. Este primer nivel de defensa es inducido por algunas estructuras moleculares asociados a dichos microorganismos altamente conservadas (*microbe associated molecular patterns*, MAMPs, o moléculas que resultan de la interacción de las plantas con los patógenos). La detección de estas señales causa una activación de las respuestas de defensa de la planta para prevenir la diseminación del patógeno por el vegetal¹. En los últimos años se ha evidenciado que los microorganismos beneficiosos también poseen algunos de esos patrones moleculares. Sin embargo, las plantas deben promover la interacción con estos organismos, evitando respuestas defensivas contundentes, por lo que las interacciones con organismos beneficiosos requieren de un reconocimiento mutuo y una buena coordinación de las respuestas de la planta y el organismo beneficioso. Entre las interacciones beneficiosas con hongos del suelo destaca la establecida entre las raíces y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), por ser la simbiosis mutualista planta-hongo más extendida y ubicua a nivel mundial y por conferir importantes beneficios a la planta hospedadora a nivel nutricional y de tolerancia a múltiples estreses². En estas interacciones, parece ocurrir una temprana activación de la respuesta de defensa de la planta en los primeros estadios de la interacción con el HMA, probablemente asociada al reconocimiento de los MAMPs, y se necesita un complejo sistema de señalización para determinar el carácter beneficioso del hongo y establecer la simbiosis^{2, 3, 4}.

Por su parte, el óxido nítrico (NO) desempeña un papel fundamental como molécula señal involucrada en una variedad de procesos fisiológicos en las plantas, y en particular, en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos víricos o bacterianos⁵. Sin embargo, existe muy poca información acerca de la función del NO en la interacción planta-hongo beneficioso, y sólo muy recientemente se ha apuntado su relevancia en la interacción planta-hongo patógeno, aunque nada se sabe aún en lo que se refiere a *Fusarium oxysporum*, una de las especies más perjudiciales en la agricultura a nivel mundial.

Asimismo, las hemoglobinas no simbióticas tipo 1 (nsHb1), desde bacterias a animales, regulan la concentración de NO a través de su detoxificación, por lo que se ha propuesto que la principal función de estas proteínas es la protección frente al estrés nitrosativo y la modulación de la función señalizadora del NO, jugando un papel en la tolerancia al estrés en planta⁶. En plantas se distinguen tres clases de Hbs, las simbióticas, no-

simbióticas (ns) y las truncadas⁷. Las simbióticas parecen restringirse a los nódulos en las raíces de leguminosas⁸. Las no simbióticas se encuentran en todas las plantas y pueden expresarse en todos los tejidos vegetales. La Hb1 se regula por NO⁹, mientras que la función de las otras hemoglobinas no está clara aún.

En este trabajo se pretende dilucidar el papel de las hemoglobinas en las interacciones tanto beneficiosas como patogénicas con la planta en su función como reguladoras de los niveles de NO. Utilizando como sistema modelo la planta de tomate y sus interacciones patogénica con *Fusarium oxysporum* (causante de la marchitez vascular) y beneficiosa con el HMA *Rhizophagus irregularis* (endosimbionte obligado), hemos comparado los patrones de acumulación de NO durante las primeras etapas de la interacción con hongos mutualistas y patógenos, y estamos analizando el posible papel de las hemoglobinas en la regulación de los niveles de NO y su implicación en estas interacciones. Hemos comprobado que existe una acumulación de NO diferencial en función del tipo de interacción (mutualista o patogénica), concordando con un también diferencial patrón de expresión de la ns-Hb1. Actualmente, hemos desarrollado plantas de tomate con raíces transformadas mediante *A. rhizogenes* para el silenciamiento de la ns-Hb1, con las que pretendemos explorar posibles efectos de dicha proteína en la colonización de las raíces por el HMA y por *F. oxysporum*. A su vez, se está investigando la posible relación de las hemoglobinas en la regulación del NO en plantas de tomate micorrizadas e infectadas posteriormente con el patógeno *F. oxysporum*, para determinar los eventos de protección por el HMA.

Referencias.

1. Shamrai SN. 2014. Plant Immune System: Basal Immunity. *Cytol Genet* **48**: 258–271.
2. Pozo MJ & Azcón-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 393–398.
3. Zamioudis C & Pieterse CMJ. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 139–150.
4. Pozo MJ *et al.* 2015. Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytol* **205**: 1431-1436.
5. Romero-Puertas MC *et al.* 2004. Nitric oxide signalling functions in plant pathogen interaction. *Cell Microbiol* **6**: 795-803.
6. Dordas C. 2009. Nonsymbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. *Plant Sci* **176**: 433-440.
7. Smagghe BJ *et al.* 2009. Review: Correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobins. *Biopolymers* **91**: 1083-1096.
8. Perazzolli M, Romero-Puertas MC & Delledonne M. 2006. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *J Exp Bot* **57**: 479–488.
9. Perazzolli M *et al.* 2004. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell*, **16**: 2785–94.

Promoción de crecimiento vegetal y absorción de P en suelos tropicales por un hongo solubilizador de P inmovilizado en alginato de calcio

L. Osorno, N. W. Osorio

Escuela de Biociencia, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

E-mail: lauraosornobedoya@gmail.com

La deficiencia de fósforo (P) es un factor limitante para el desarrollo, crecimiento y productividad vegetal, afectando 2016 millones de ha a nivel mundial¹. La deficiencia es particularmente severa en suelos tropicales. Para corregir esto se usan altas dosis de fertilizantes fosfóricos solubles, pero su eficiencia es muy baja (5-10%). Además, estos fertilizantes son costosos y generan riesgos de contaminar el ambiente. Hay un creciente interés en mejorar la eficiencia de la roca fosfórica (RP) como fertilizante ya que se estima que se agotaran las reservas en menos de 100 años². Por otro lado, entre las alternativas biotecnológicas para mejorar la disponibilidad de P, está el uso de hongos solubilizadores de P (HSP). Estos disuelven minerales fosfóricos y pueden desorber P fijado³. El uso de estos microorganismos es atractivo en la agricultura sostenible donde se pretende evitar o reducir el consumo de agroquímicos manteniendo rendimientos satisfactorios en los cultivos⁴.

Aunque se ha reportado efectos positivos al inocular estos microorganismos, algunos autores reportan inconsistencias; se consideran que hay factores como la formulación y la viabilidad de los microorganismos⁵. Estas condiciones se podrían mejorar inmovilizando los HSP en alginato para prolongar la viabilidad y efectividad, tal como se ha hecho con otros microorganismos⁴.

Para esto, se evaluó la efectividad del hongo *Mortierella* sp. inmovilizado en alginato para promover el crecimiento vegetal y la absorción de P en suelos tropicales.

El experimento se realizó en el invernadero de La Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por 3 meses. El suelo (0-20 cm) fue un Haplustox (Oxisol) de la Estación Experimental Carimagua. La muestra se secó y se analizó químicamente. El suelo fue esterilizado y fertilizado con RP (300 mg P kg⁻¹) como única fuente de P y servido en macetas (1 kg). Las semillas de *Leucaena leucocephala* se germinaron por 2 días. El HSP fue inmovilizado en alginato de calcio de acuerdo al método descrito por Bashan et al. 2002 y secados a 40 °C, las perlas se adicionaron al momento de la siembra en diferentes cantidades, 0 (control), 150, 300 y 600 mg por kg de suelo.

Se empleó un diseño estadístico completamente al azar y se evaluó mediante ANOVA y separación de medias de Duncan. Los análisis se hicieron con un nivel de significancia (P) ≤0.05, mediante el uso del Statgraphics centurión XVI. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones.

La inoculación con el HSP inmovilizado en alginato aumentó significativamente el crecimiento y la absorción de P de *Leucaena* con respecto al control no inoculado. Este efecto fue mayor cuando la concentración de perlas del HSP fue la más alta (600mg). La altura de la planta aumentó de 7.4 cm (Control) a 9.4 cm con la inoculación de 150 y 300 mg sin presentar diferencia significativa entre estos valores, con 600 mg los valores

fueron de 12 cm. La biomasa área seca fue el doble al inocular con 150 y 300 mg mientras que con la dosis más alta fue 3.7 veces mayor al control no inoculado (0.157 g). El contenido de P foliar aumento con la adición de perlas con respecto al control (99,7 µg) a valores de 197, 230 y 455 µg de P, cuando las plantas se inocularon con 150, 300 y 600 mg de perlas, respectivamente. Al final del experimento la colonización del hongo en la raíz fue del 100% en todas las concentraciones sin presentar diferencia significativa entre las plantas inoculadas.

Se concluye que la inmovilización de HSP en alginato de calcio es una estrategia biotecnológica adecuada para suelos tropicales que adsorben fuertemente el P aplicado, permite mantener la efectividad del hongo para disolver P en el suelo, mejorar la efectividad agronómica de la RP y así promover el crecimiento y la absorción de P por las plantas.

Referencias.

1. Fairhurst T *et al.* 1999. The importance, distribution and causes of phosphorus deficiency as constraint to crop production in the tropics. *Agroforestry Forum* **9**(4): 2-8.
2. Gilbert N. 2009. Environment: The disappearing nutrient. *Nature News* **461**(7265): 716-718. DOI: 10.1038/461716a
3. Osorio NW & Habte M. 2014. Soil Phosphate Desorption Induced by a Phosphate-Solubilizing Fungus. *Commun Soil Sci Plant Anal* **45**: 451-460.
4. Bhatti TM & Yawar W. 2010. Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* **103**: 54-59.
5. Bashan Y *et al.* 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils* **35**: 359-368.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y la beca doctorados nacionales de Colciencias 470-2.



SESIÓN VII:

DIVERSIDAD Y ECOLOGÍA DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS

PLANTAS

PROYECTO V2001VDV2 Y

Diseño de un sistema basado en PCR para la clasificación rutinaria de cepas aisladas y muestras ambientales en grupos filogenómicos del complejo de especies *Pseudomonas fluorescens*.

D. Garrido-Sanz, E. Arrebola, F. Martínez-Granero, S. García-Mendez, E. Blanco-Romero, C. Muriel, D. Durán, M. Martín, R. Rivilla, M. Redondo-Nieto

Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin 2, 28049, Madrid.

E-mail: daniel.garrido@uam.es

El complejo de especies *Pseudomonas fluorescens* incluye bacterias asociadas a plantas que presentan gran potencial para su uso en aplicaciones biotecnológicas y de protección medioambiental. Muchas de las bacterias de este grupo son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante distintos mecanismos entre los que se incluye la modificación del balance hormonal de las plantas y el bicontrol, ya sea de forma directa debido a la producción de antibióticos o indirecta por competición por el nicho que ocupan patógenos o inducción de la respuesta sistémica inducida de la planta. Una gran cantidad de estos y otros caracteres ecofisiológicos siguen una distribución filogenómica entre los 8 grupos principales en los que el complejo *P. fluorescens* se encuentra actualmente dividido. Por tanto, la asignación rutinaria de cepas aisladas a uno de estos grupos puede resultar útil para simplificar el proceso de cribado en la selección de posibles inoculantes. Usando genómica comparativa con 71 genomas del complejo *P. fluorescens*, hemos identificado 9 marcadores que permiten la clasificación de cualquier cepa de este complejo en los 8 grupos filogenómicos mediante la presencia / ausencia de amplificación de estos marcadores mediante PCR. Hemos diseñado nueve parejas de primers que han sido probados en 28 cepas aisladas de la rizosfera y endosfera de diferentes plantas y suelo y muestras ambientales (metagenoma) de suelo y rizosfera. Además, el sistema ha sido probado mediante PCR *in silico* en 421 genomas. Los resultados han sido validados mediante análisis filogenómicos y muestran que el sistema basado en PCR para la clasificación de cepas aisladas tiene un 98.34% de precisión. Este sistema puede ser usado como un método simple y rápido para evaluar el potencial biotecnológico de cualquier cepa perteneciente al complejo *P. fluorescens*, así como ser usado en muestras complejas (metagenómica de suelo y tejidos vegetales) para la búsqueda de inoculantes para aplicaciones agrotecnológicas o ambientales.

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por MINECO/FEDER EU (BIO2015-64480R). DGS ha sido receptor de una beca predoctoral del programa FPU (FPU14/0365) del MECD. EBR ha sido receptora de una beca predoctoral de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno.

Análisis de la diversidad y caracterización de bacterias endófitas de plantas leguminosas nativas de suelos mediterráneos.

E. Menéndez¹, B. R. Glick², M. Carvalho¹, A. Belo¹, M. R. Felix¹, S. Oliveira¹, C. Brígido^{1,3}

¹ICAAM—Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal; ²Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, ON, N2L 3G1 Canada; ³IIFA—Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal.

E-mail: esthermenendez@uevora.pt

La familia Leguminosae (Fabaceae) constituye un componente esencial en los ecosistemas agrícolas mediterráneos, tanto en la propia región del Mediterráneo como en otras regiones del mundo con clima templado mediterráneo¹. Las leguminosas nativas de estas regiones están adaptadas a las condiciones edafo-climáticas propias de estas regiones. Considerando que la asociación entre leguminosas y bacterias endofíticas está relacionada desde un tiempo evolutivamente temprano², podemos hipotetizar que la adaptación de las leguminosas nativas de dichas condiciones climáticas mediterráneas puede estar relacionada, entre otras causas al establecimiento de diferentes relaciones mutualistas con dichas bacterias endofíticas y con los cambios en las comunidades microbianas existentes en los suelos. Desde este punto de vista, las leguminosas nativas pueden constituir un reservorio natural de bacterias endófitas con un elevado potencial para su posible aplicación biotecnológica y/o agronómica.

Por ello, en una etapa inicial de este estudio pretendemos conocer la diversidad de bacterias endofíticas cultivables que se encuentran en tejidos vegetales internos, en concreto de las raíces de diferentes especies de leguminosas nativas que crecen en dos regiones con suelos de clima mediterráneo con diferente grado de salinidad. Además, evaluamos su habilidad para promover el desarrollo vegetal. Para ello, una colección de 126 cepas aisladas del interior de raíces de 12 leguminosas nativas (*Ornithopus compressus*, *Ornithopus pinnatus*, *Ornithopus sativas*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius*, *Trifolium sp.*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium tomentosum*, *Scorpiurus muricatus*, *Scorpiurus sulcatus*, *Medicago polymorpha* y *Vicia sativa*) fueron identificadas en base a una secuenciación parcial del gen 16S ribosómico y posteriormente, fueron determinados diferentes mecanismos de promoción del desarrollo vegetal de cada aislado. Los aislados pertenecen a 3 phyla: Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, siendo este último el que contó con un menor número de representantes. Dentro del phylum Proteobacteria, la familia Enterobacteriaceae contó con un mayor número de representantes entre los aislados identificados; además, se identificaron aislados pertenecientes a las familias Alcaligenaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae y Xanthomonadaceae. Dentro de los Firmicutes, la familia Bacillaceae fue la más abundante, aunque también se identificaron aislados pertenecientes a las familias Staphylococcaceae y Paenibacillaceae. En relación a sus mecanismos de promoción del desarrollo vegetal, la mayoría de los aislados fueron capaces de sintetizar ácido indolacético (IAA) y un 47% de ellos poseen actividad celulolítica. Además, los aislados fueron capaces de solubilizar fosfato (22,4%) y producir sideróforos (28,5%). Sin embargo, solo 9 aislados exhibieron actividad ACC desaminasa y 13 mostraron actividad

antifúngica contra el agente patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. En base a estas características se seleccionaron varios aislados para una posterior caracterización. La mayor parte de los aislados seleccionados mostraron tolerancia por altas concentraciones salinas (NaCl), manganeso (Mn) y aluminio (Al). Adicionalmente, se realizaron ensayos de inoculación de plantas con los aislados seleccionados, los cuales fueron capaces de promover significativamente el desarrollo de plántulas de canola (*Brassica campestris*) en condiciones axénicas.

Los resultados obtenidos muestran que existe una relación entre la presencia de varios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de varios aislados, el tipo de suelo y el tipo de leguminosa hospedadora. Además, en este estudio se han identificado varias cepas endófitas que presentaron un alto potencial como promotores del crecimiento vegetal, siendo susceptibles de ser empleadas como biofertilizantes o agentes de biocontrol, ente otras potenciales aplicaciones en agricultura.

Referencias.

1. Maxted N & Bennett SJ. 2001. Legume diversity in the Mediterranean region. *In* Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Eds. N Maxted & SJ Bennett. pp 357. Klumer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
2. Hardoim PR *et al.* 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 293-320.

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado por fondos del FEDER - *Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional* mediante el COMPETE 2020 - Programa operacional de competitividad e internacionalización (POCI) y por la FCT - *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* en el marco del proyecto POCI-01-0145-FEDER-016810 (PTDC/AGR-PRO/2978/2014) y el proyecto estratégico UID/AGR/00115/2013. E. Menéndez agradece una beca postdoctoral derivada del proyecto estratégico UID/AGR/00115/2013. C. Brígido agradece una beca postdoctoral FCT (SFRH/BPD/94751/2013). B.R. Glick fue apoyado por el *Natural Science and Engineering Research Council* de Canadá.

Identificación de bacterias rizosféricas aisladas de jarales del noroeste ibérico

R. Mulas¹, L. Carro², R. Pastor-Bueis¹, A. Díez-Méndez², M. H. Ramírez-Bahena², S. Salazar³, R. Rivas^{2,4}, P. F. Mateos^{2,4}, E. Martínez-Molina^{2,4}, J. M. Igual^{3,4}, I. Santa Regina^{3,4}, P. J. Santín⁵, J. A. Sánchez-Rodríguez⁵, D. Blanco⁶, A. Terrón⁷, A. Peix^{3,4}, E. Velázquez^{2,4}, F. González-Andrés¹

¹Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León. Spain; ²Departamento de Microbiología y Genética y CIALE. Universidad de Salamanca. Salamanca. Spain; ³IRNASA-CSIC. Salamanca. Spain; ⁴Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC; ⁵Instituto de Restauración y Medio Ambiente (IRMA S.L.). León. Spain; ⁶Bioenergía y Desarrollo Tecnológico, S.L. (BYDT). León, Spain; ⁷Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental. Universidad de León. Spain; ⁸School of Biology, Newcastle University. Newcastle upon Tyne, UK

E-mail: rmulg@unileon.es

La jara pringosa *Cistus ladanifer* es un arbusto que tolera bien ambientes ácidos y muestra una gran plasticidad en suelos degradados, secos, descarbonatados y silíceos en zonas de clima mediterráneo¹. Además de su papel ecológico como planta pionera en los suelos anteriormente mencionados, puede formar asociaciones con ectomicorrizas del género *Boletus*, lo que supone un aprovechamiento económico de primer orden, por el elevado valor que alcanza en el mercado la seta que resulta de la fructificación del hongo². Las bacterias denominadas *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) tienen un importante papel en la mejora del crecimiento de las plantas, y también en su adaptación a condiciones de suelo adversas³. Dentro de los PGPR se incluyen bacterias rizosféricas que se asocian a las raíces de las plantas y que pueden jugar un papel importante en su desarrollo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el aislamiento y la identificación de bacterias rizosféricas de plantas de jara en el noroeste interior de la península ibérica. Para ello, las cepas aisladas se agruparon en función de su perfil de RAPD y las cepas representativas de los diferentes grupos obtenidos se identificaron mediante la secuenciación completa del gen ribosómico 16S. De acuerdo con los resultados del análisis de este gen, las cepas aisladas se clasificaron en diferentes grupos bacterianos y fueron filogenéticamente próximas a diferentes especies de actinomicetos (*Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium plantarum*, *Microbacterium testaceum*, *Mycetocola lacteus*, *Pseudoclavibacter helvolus*, *Streptomyces ardens* y *Streptomyces hundungensis*), cocos Gram positivos (*Vagococcus salmoninarum*) bacilos Gram positivos (*Bacillus cereus*, *Bacillus fortis* y *Bacillus toyonensis*) y bacilos Gram negativos (*Acinetobacter guillouiae*, *Burkholderia sediminicola*, *Delftia rhizosphaerae*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas reinekei*, *Pseudomonas psychrophila*, y *Stenotrophomonas maltophilia*). Las cepas que mostraron mejor perfil como potenciales promotoras del crecimiento vegetal, porque solubilizaron fosfato y produjeron ácido indol-acético y sideróforos, pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Algunas de las cepas aisladas presentaron identidades inferiores al 99% en el gen ribosómico 16S con respecto a las especies más próximas y hasta el momento se han descrito dos nuevas especies, una del género *Bacillus*, denominada *Bacillus terrae* sp. nov.⁴ y otra del género *Delftia*, denominada *Delftia rhizosphaerae* sp. nov.⁵

Referencias.

1. Mingorance, M.D., I. Franco y S. Rossini-Oliva. 2017. Application of different soil conditioners to restore mine tailings with native (*Cistus ladanifer* L.) and non-native species (*Medicago sativa* L.). *J Geochem Explor* **174**: 35-45.
2. Ponce, R.A., B. Águeda, T. Ágreda, M.P. Modrego, J. Aldea, L. M. Fernández-Toirán, F. Martínez-Peña. 2011. Rockroses and *Boletus edulis* ectomycorrhizal association: realized niche and climatic suitability in Spain. *Fungal Ecol* **4**: 224-232.
3. Papenfus, H.B., Kulkarni, M.G., Stirk, W.A., Rengasamy, K. R. R., Salomon, M.V., Piccoli, P., Bottini, R., Van Staden, J. (2015). Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium and smoke-derived compounds and their effect on okra growth. *J Plant Nutr Soil Sc* **178**: 741-747.
4. Díez-Méndez, A., R. Rivas, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, P. Julio Santín, J.A. Sánchez-Rodríguez, E. Velázquez. 2016. *Bacillus terrae* sp. nov. isolated from *Cistus ladanifer* rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* (En prensa).
5. Carro, L., R. Mulas, R. Pastor-Bueis, D. Blanco, A. Terrón, F. González-Andrés, A. Peix, E. Velázquez. 2017. *Delftia rhizosphaerae* sp. nov. isolated rhizosphere of *Cistus ladanifer*. *Int J Syst Evol Microbiol* (En prensa).

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado con el proyecto Desarrollo de planta de jara (*Cistus ladanifer*) ectomicorrizada con hongos comestibles de la especie *Boletus edulis* e inoculada con bacterias promotoras de la micorrización (CIBABOL). Convocatoria Retos-Colaboración 2014.

La invasión del campo rupestre brasileño por la gramínea *Melinis minutiflora* es impulsada por la alta disponibilidad de N en el suelo y cambios en el ciclo del nitrógeno mediados por las comunidades microbianas.

M. H. Ramírez-Bahena^{1,2}, P. C. D. Ribeiro³, E. Menendez¹, D. L. da Silva^{3,4}, D. Bonieck⁴, M. A. Resende-Stoianoff⁴, A. Peix², E. Velázquez¹, P. F. Mateos¹, M. R. Scotti³

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain; ³Departamento de Botânica – Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270901, Brazil; ⁴Departamento de Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270901, Brazil.

E-mail: mh.ramirez@usal.es

La invasión biológica de los ecosistemas amenaza la biodiversidad mundial al disminuir la riqueza, diversidad y uniformidad de las poblaciones. En general, los efectos sobre la biodiversidad se producen debido a las fuertes modificaciones en la composición y la dinámica de las comunidades bióticas a través de alteraciones en los procesos clave del ecosistema, tales como los ciclos biogeoquímicos. Varias especies de plantas invasoras son capaces de modificar el contenido en la materia orgánica del suelo y las reservas de nutrientes.

El mecanismo invasivo de la especie *Melinis minutiflora* se ha relacionado con las alteraciones del nitrógeno del suelo que resultan de reacciones positivas complejas entre la vegetación, los microbios del suelo y el ciclo de los nutrientes, donde las especies invasoras se ven beneficiadas por encima de los competidores. Además, se ha documentado que la invasión de *Melinis minutiflora* está asociada con el avance de incendios, lo que resulta en la disminución de las plantas nativas y la aceleración de las tasas de reciclaje de nitrógeno a medida que se libera más nitrógeno en el suelo. Esto genera un crecimiento acelerado de las gramíneas invasoras e inhibe la recuperación de especies nativas.

El Parque Estatal de la Serra do Rola Moça (PESRM) en el estado de Minas Gerais, Brasil, es un área conservada representativa del bioma campo rupestre, localizada sobre un afloramiento de hierro que tiene un alto nivel de diversidad vegetal. Casi el 60% de este campo ha sido invadido por la gramínea *Melinis minutiflora*, lo que constituye una grave amenaza para la biodiversidad y supervivencia de este bioma, particularmente debido a los impactos de los incendios anuales y las intervenciones inadecuadas de restauración. Muchas especies invasoras presentan una alta demanda de nitrógeno (N). Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo estudiar las alteraciones del ciclo N promovidas por *M. minutiflora* en la zona de campo rupestre, donde predominaba la leguminosa *Mimosa pogocephala*. Los suelos del bioma mostraron una alta fertilidad natural de N y una baja relación C: N. La principal fuente de N en este bioma fue el resultado de la fijación biológica de nitrógeno realizada por *M. pogocephala* asociada con su endosimbionte bacteriano *Burkholderia nodosa*. El desplazamiento de especies nativas por *Melinis minutiflora* se asoció con cambios en las formas de N del suelo.

El nitrato aumentó a medida que el amonio disminuyó. Esta última fue la forma dominante de N en las parcelas de especies nativas, como se observó en el análisis del suelo de los contenidos totales de nitrógeno, amonio y nitrato. La forma de amonio dominante se cambió a la forma nítrica por la estimulación de las poblaciones de bacterias oxidantes del amonio debido a las especies invasoras. Por lo tanto, el mecanismo clave detrás de la invasividad de la hierba exótica y el desplazamiento concomitante de las especies nativas puede estar asociado con cambios en las especies químicas del nitrógeno del suelo. Estos resultados y la alta fertilidad del suelo asociada al nitrógeno encontrado en el campo rupestre, permiten afirmar que los procedimientos de fertilización con N para la restauración de áreas invadidas se deben evitar en este bioma.

Referencias.

Ribeiro PCD *et al.* 2017. Invasion of the Brazilian campo rupestre by the exotic grass *Melinis minutiflora* is driven by the high soil N availability and changes in the N cycle. *Sci Total Environ* **577**: 202-211.

Agradecimientos.

Esta investigación fue apoyada por la Coordinación de Aperfeiçoamiento de Personal Docente (CAPES) (PVE 881062162 / 2014-01). Los autores agradecen a CAPES, al Consejo Nacional de Investigación (CNPq) y Pro-reitoria de Extensión (PROEX) / UFMG por las becas, al Instituto Estadual de Forestas (IEF) por el suministro logístico, en particular a Marcus Vinicius Freitas, director del Parque Estadio de la Serra do Rola Moça (PESRM).

Nuevas especies de bacterias endófitas y endosimbiontes de *Phaseolus vulgaris* en España

A. Castellano-Hinojosa^{1,2}, D. Correa-Galeote², J. González-López¹, E. J. Bedmar², A. Peix³

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, ²Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, ³Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNASA-CSIC, Salamanca

E-mail: ach@ugr.es

El cultivo de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) es una práctica común en la Vega de Motril (Granada), en el sureste de la Península Ibérica, donde se suele cultivar sin aplicación de fertilizantes nitrogenados. *P. vulgaris* es una leguminosa de la tribu Phaseolae que establece asociaciones simbióticas fijadoras de N₂ atmosférico con diferentes especies de rizobios, lo que facilita su cultivo en suelos deficientes en N combinado. Puesto que el rendimiento del cultivo de judía es elevado en estos suelos, cabe pensar en la existencia de una efectiva asociación planta-bacteria. De ahí que el objetivo de este trabajo sea el estudio de la diversidad de bacterias endófitas y endosimbiontes en nódulos de *P. vulgaris*.

Los nódulos se cosecharon de las raíces de 6 plantas de judía cultivadas en condiciones de campo. Una vez en el laboratorio, se desinfectaron superficialmente mediante tratamiento con HgCl₂ al 0.25% durante 1 minuto y se lavaron con abundante agua estéril. Los nódulos se colocaron, de forma independiente, en placas Petri, se les adicionaron unas gotas de agua estéril y se trituraron con ayuda de una varilla de vidrio estéril. El extracto resultante se sembró en placas Petri que contenían medio YEM sólido y se incubaron a 28 °C durante 10 días. Finalmente, tras observación al microscopio, se seleccionaron 10 cepas morfológicamente diferentes que representaban todos los tipos de colonias que aparecieron en las placas.

La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen 16S rRNA¹. Las secuencias obtenidas se corrigieron manualmente y se compararon con las depositadas en la base de datos EzTaxon-e. Dos cepas se adscribieron al género *Pararhizobium* ya que sus secuencias fueron 100% idénticas a la cepa tipo *P. giardinii* H152^T, otras 2 al género *Agrobacterium* (*Rhizobium*) puesto que presentaron un 99,5% de similitud con *A. radiobacter* ATCC 19358^T, 5 al género *Ochrobactrum*, de las que 3 mostraron un 98.5% de similitud con *O. haematophilum* CCUG 38531^T y las otras 2 un 99.9% de similitud con *O. intermedium* LMG 3301^T y, finalmente, 1 secuencia que mostró 100% de similitud con *Mitsuaria chitosanitabida* 3001^T. El análisis filogenético confirmó que las cepas próximas a *A. radiobacter* y *O. haematophilum* representan nuevos linajes genéticos sugiriendo que podrían tratarse de nuevas especies de estos géneros.

Para confirmar la capacidad de nodulación de las cepas, las semillas de *P. vulgaris* se desinfectaron superficialmente con NaClO durante 3 minutos, se lavaron abundantemente con agua estéril, se colocaron en placas Petri que contenían agar estéril al 0,9% y, finalmente, se germinaron a 28 °C en oscuridad durante 48h. Las semillas germinadas se transfirieron a jarras Leonard que contenían vermiculita estéril en la parte superior y una solución mineral libre de N₂ en la inferior. Las semillas se inocularon independientemente

con 1 ml (~ 10⁸ células) de cada una de las cepas cultivadas previamente en medio líquido YEM. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de temperatura (25/18 °C día/noche) y luz (16/8 h de luz/oscuridad) durante un mes. Después de este tiempo se observó la presencia de nódulos solamente en las plantas inoculadas con las cepas afiliadas con *P. giardinii* y *A. radiobacter*. A partir de estos nódulos se reaislaron cepas cuyo DNA fue extraído y analizado mediante PCR-RAPD³, confirmando ser las mismas cepas endosimbiontes de *P. vulgaris* previamente inoculadas.

La amplificación y secuenciación del gen simbiótico *nodC*⁴ de cada cepa reveló, en ambos casos, una similitud del 100% con la secuencia del gen *nodC* de *R. vallis* CCBAU 65647^T, *R. leguminosarum* sv. *phaseoli* H132 y *P. giardinii* sv. *phaseoli* H251. La agrupación de estas secuencias en el clado del simbiovar *phaseoli* permite la inclusión de las cepas en este simbiovar.

Resulta muy interesante la presencia de una posible especie nueva del género *Agrobacterium* como endosimbionte de leguminosas de *P. vulgaris*, aunque se han encontrado frecuentemente como endófitos de esta leguminosa. Asimismo, la presencia de *P. giardinii* como endosimbionte de judía contrasta con citas anteriores de *R. leguminosarum* y *R. etli* como nodulantes de judía en el norte y sur de España, respectivamente⁵. Este trabajo amplía nuestro conocimiento sobre la diversidad de bacterias endosimbióticas y endófitas de *P. vulgaris*.

Referencias.

1. Rivas R *et al.* 2007. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Lett Appl Microbiol* **44**:181-187.
2. Rigaud J & Puppo A. 1975. Indol-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**: 223-228.
3. Rivas R *et al.* 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* **287**: 23-33.
4. Laguerre G *et al.* 2001 Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**: 981-993.
5. García-Fraile P *et al.* 2010. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Can J Microbiol* **56**: 657-666.

Agradecimientos.

Este trabajo se ha financiado con fondos FEDER del Proyecto de Excelencia PE2012-AGR1968 de la Junta de Andalucía, y MINECO-CSIC Recupera 2020. ACH agradece la ayuda cofinanciada por el Programa de Estancias Breves del Plan Propio de la Universidad de Granada y el Grupo de Microbiología Ambiental RNM 270 para la estancia en el IRNASA-CSIC de Salamanca. También se agradece la asistencia técnica de Z. García.

Evaluación del papel de los endófitos en la tolerancia a la sal de *Arthrocnemum macrostachyum*

S. Navarro-Torre¹, J.M., Barcia-Piedras^{2,3}, E., Mateos-Naranjo², S. Redondo-Gómez², M. Camacho³,
M.A. Caviedes¹, E. Pajuelo¹, I.D. Rodríguez-Llorente¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla;

²Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla; ³IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Sevilla.

E-mail: snavarro1@us.es

Se ha estimado que de 1 a 10 billones de hectáreas de suelo en el mundo están afectadas por la sal¹ y que existe una subida potencial del 10 al 16% al año² debido al cambio climático. Este aumento de áreas afectadas conducirá al uso de un agua de baja calidad, a un aumento de la salinización por la irrigación, a una expansión de tierras áridas, semi-áridas y desérticas y a un aumento del nivel del mar, contribuyendo a la intrusión salina en los acuíferos³.

Un ejemplo de este problema ambiental se encuentra en las Marismas del Guadalquivir, por culpa del uso de aguas de riego con altos contenidos en sal y por la evaporación, estos suelos han ido aumentando su salinidad y sodicidad presentando dificultades para su uso agrícola.

En los últimos años, ha habido un creciente interés en la revegetación de estos suelos usando plantas halófitas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue investigar si las bacterias presentes en la filosfera de estas plantas jugaban un papel importante en la alta tolerancia que presentan las plantas halófitas en presencia de excesiva salinidad.

A partir de plantas de *A. macrostachyum*, una planta halófitas⁴, crecidas en suelos agrícolas de la zona de Lebrija, se aislaron 8 endófitos de la parte aérea de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en suelos agrícolas de la zona de Lebrija. Estas bacterias aisladas pertenecieron al género *Bacillus* y otros géneros relacionados. Se determinó la presencia de propiedades PGP, la presencia de actividades enzimáticas y la tolerancia a sal en estas bacterias aisladas, y, en base a estas propiedades, las mejores bacterias fueron seleccionadas para la formación de un consorcio, con el cuál se estudió los efectos de la inoculación en la germinación de las semillas y en el desarrollo de las plantas en presencia de distintos tratamientos con sal (0, 510 y 1030 mM). Además, también se estudió en los aislados la presencia de genes implicados en la síntesis de osmoprotectores.

La inoculación mejoró considerablemente la germinación de las semillas y el porcentaje de germinación. Además, la inoculación con el consorcio disminuyó los efectos de la salinidad, mejorando el crecimiento de las plantas e incrementando el potencial de *A. macrostachyum* de acumular Na⁺ en los tallos.

Estos resultados sugieren que las bacterias aisladas de la filosfera de las plantas de *A. macrostachyum* parecen jugar un papel importante en la tolerancia de la planta a la sal bajo concentraciones de sal estresantes, mejorando la germinación de las semillas y el desarrollo de la planta.

Referencias

1. Yensen NP *et al.* 2006. Soil remediation via salt-conduction and the hypotheses of halosynthesis and photoprotection ecophysiology of high salinity tolerant plants. *In* Tasks for vegetation science. Ed. M A Khan & D J Weber. pp. 313–344. Springer, Netherlands.
2. Aydemir S *et al.* 2011. Bioreclamation effect and growth of a leguminous forage plant (*Lotus corniculatus*) in calcareous saline sodic soil. *Afr J Biotechnol* **10**: 115571–115577.
3. Jesus JM *et al.* 2015. Phytoremediation of salt-affected soils: a review of processes, applicability, and the impact of climate change. *Environ Sci Pollut Res* **22**: 6511-6525.
4. Redondo-Gómez S *et al.* 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology* **12**: 79–87.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias a la Junta de Andalucía (proyecto P11-RNM-7274MO), por el INIA (proyecto RTA 2012-0006-C03-03) y por la Universidad de Sevilla (proyecto VPPI-US). S. Navarro-Torre le agradece a la Junta de Andalucía y J.M. Barcia-Piedras al INIA por el apoyo financiero personal. Los autores también le agradecen al Servicio General de Invernadero (CITIUS) por su colaboración.

Aislamiento y caracterización de rizobacterias tolerantes a salinidad con actividad promotora del crecimiento vegetal

M. J. Lami^{1,2}, M. C. Caram di Santo¹, A. M. Zenoff¹, M. L. Travieso², P. Vincent¹, R. E. de Cristóbal¹, M. Espinosa-Urgel²

¹Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) CONICET-UNT e Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj”, Facultad de Bioquímica Química y Farmacia, UNT, Tucumán, Argentina;

²Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada.

E-mail: majesuslami@hotmail.com

La sobreexplotación de suelos agrícolas se está convirtiendo en un gran problema a nivel mundial, causando disminución de la materia orgánica, pérdida de la estructura natural del suelo, e incremento de la salinidad, entre otros efectos. La salinización del suelo reduce la producción de cultivos, ya que suprime el crecimiento normal de las plantas, posiblemente alterando los niveles endógenos de fitohormonas, lo que ocasiona efectos represivos en la germinación y crecimiento^{1,2}. Además, la salinidad afecta al crecimiento al reducir la disponibilidad de agua, creando un desequilibrio debido a la elevada concentración de iones (Na⁺, Cl⁻) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular³. La capacidad de mejorar la tolerancia a salinidad de plantas de interés agronómico es por tanto de gran relevancia⁴.

Se realizó un muestreo al azar en las Salinas Grandes de Santiago del Estero (Argentina), para aislar bacterias de la rizosfera de plantas de *Sesuvium edmonstone*, con el fin de seleccionar posibles PGPR para su uso como inoculantes en suelos salinos. Se obtuvieron 25 aislados diferenciables por la morfología de colonias en medio mínimo con benzoato como fuente de carbono. Se procedió a su identificación mediante la secuenciación de un fragmento de aproximadamente 1400 pb del gen correspondiente al rRNA 16S y comparación con las bases de datos. Los géneros más abundantes correspondieron a *Pseudomonas* (11 aislados) y *Bacillus* (6 aislados), siendo los restantes Enterobacterias (5), *Halomonas* (1) y *Acinetobacter* (1). Se analizó la capacidad de crecimiento de los diferentes aislados en presencia de concentraciones crecientes de NaCl y se caracterizaron en cuanto a actividades que pudieran indicar su posible relevancia como PGPR: capacidad de solubilizar fosfato inorgánico, producción de indoles totales (auxinas) y producción de sideróforos.

Además se realizó una prueba de germinación en semillas de soja con las distintas cepas en ausencia y en presencia de NaCl 0.5 M. Se comprobó que dos de las cepas (aislados 19 y 21, correspondientes a *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas sp.*) mejoran la germinación de soja, y otras dos la del maíz (aislados 6 y 8, que corresponden a *Halomonas sp.* y *Bacillus cereus*). En estudios posteriores se ha empleado solamente la cepa *Pseudomonas stutzeri* MJL19, para analizar en más detalle su capacidad colonizadora de raíces de soja y su efecto sobre la germinación y parámetros de las plantas tras distintos tiempos de crecimiento en ausencia y presencia de NaCl (peso fresco, peso seco, longitud de raíz, longitud de tallo, etc.). Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que esta cepa tiene propiedades PGPR en condiciones de salinidad. Actualmente

estamos analizando la influencia de la bacteria en parámetros como la producción de hormonas o de moléculas osmoprotectoras en la planta.

Referencias.

1. Feng W *et al.* 2016. Growing Out of Stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *Plant Cell* **28**: 1769-1782.
2. Verma V, Ravindran P & Kumar PP. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* **16**: 86.
3. Park HJ, Kim WY & Yun DJ. 2016. A new insight of salt stress signaling in plant. *Mol Cells* **39**: 447-459.
4. Jez JM, Lee SG & Shero AM. 2016. The next green movement: Plant biology for the environment and sustainability. *Science* **353**: 1241-1244.

Agradecimientos.

Este trabajo está financiado en parte por un proyecto del programa EMHE-CSIC (MHE-200019). M.J. Lami es perceptora de una beca predoctoral CONICET.

La interacción planta-bacteria al servicio de los ecosistemas: potencial de *Spartina maritima* e inoculantes bacterianos como bioherramienta para la recuperación de estuarios andaluces contaminados con metales pesados.

J. Mesa¹, E. Mateos-Naranjo², M. A. Caviedes¹, S. Redondo-Gómez², E. Pajuelo¹, I. D. Rodríguez-Llorente¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla;

²Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

E-mail: jmesam@us.es

El estuario conjunto de los ríos Tinto y Odiel en Huelva (España) es conocido como una de las zonas más contaminadas por metales pesados del mundo. En la zona se encuentra la mina operativa más antigua de Europa y el área está fuertemente industrializada. Para su recuperación, la fitorremediación se ha propuesto como una alternativa más económica y respetuosa con el medio ambiente que los procedimientos de remediación físico-químicos tradicionales. En este sentido, la gramínea autóctona *S. maritima* crece en las marismas occidentales de Andalucía con una capacidad natural de bioacumulación de metales pesados, haciéndola útil para la fitoestabilización de estos sedimentos. En este contexto, la interacción planta-microorganismo juega un papel importante, ya que el empleo de bacterias autóctonas promotoras del crecimiento vegetal podría mejorar el crecimiento y el potencial fitorremediador de esta especie.

Se aislaron bacterias cultivables de la rizosfera de *S. maritima* y, en base a sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal y multirresistencia a metales pesados, se diseñó un consorcio bacteriano con potencial empleo para la mejora de la fitorremediación¹. En condiciones de invernadero, con plantas y suelos contaminados naturales, la bioaumentación con el consorcio diseñado aumentó en *S. maritima* la formación de biomasa radicular y estimuló la rizoacumulación de metales pesados, hasta un 50% para Cu, 20% para As y 25% para Zn, comparado con las plantas no inoculadas². Se comprobó que esta respuesta fue debida a que la inoculación rizobacteriana ejerció una influencia positiva sobre la fisiología de *S. maritima*: mejoró sus parámetros fotosintéticos, redujo el estrés oxidativo y disminuyó su tasa respiratoria radicular^{2,3}.

En resumen, la bioaumentación con rizobacterias autóctonas en la gramínea nativa *S. maritima* podría constituir una bioherramienta para mejorar su adaptación y capacidad de acumulación de metales pesados en las marismas andaluzas degradadas. Este trabajo resalta el importante papel de la interacción planta-microorganismo, en este caso planta-bacteria, y su potencial biotecnológico e invita a indagar más profundamente en los mecanismos biológicos que hay detrás de esta relación simbiótica.

Referencias.

1. Mesa J *et al.* 2015. Scouting contaminated estuaries: Heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizoaccumulator *Spartina maritima*. *Mar Pollut Bull* **90**: 150–159. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.11.002

2. Mesa J *et al.* 2015. Moving closer towards restoration of contaminated estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. *J Haz Mat* **300**: 263–271. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.07.006

3. Mesa J. *et al.* What lies behind PGPR-induced plant growth and heavy metal rhizoaccumulation: rhizobacterial bioaugmentation decreases *Spartina maritima* root respiration and oxidative stress in polluted estuaries. (*En preparación*)

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía [P11-RNM-7274MO] y el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) [RTA2012-00006-C03-03]. J. M. agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la ayuda FPU [AP2012-1809]. Los autores agradecen su ayuda al Servicio de Invernadero de la Universidad de Sevilla.

Inoculantes bacterianos para mejorar la germinación de las semillas de *Spartina densiflora*: implicaciones para la restauración de áreas contaminadas con metales.

K.I. Paredes-Páliz¹, E. Pajuelo-Domínguez¹, E. Mateos-Naranjo²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla;

²Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

E-mail: kparedes@us.es

Las zonas costeras y de estuarios se encuentran entre los lugares con mayores índices de población del planeta¹. Al mismo tiempo, debido a la rápida urbanización y la industrialización, son también algunos de los sitios más contaminados. En particular, la contaminación de estuarios marinos por metales pesados repercute a largo plazo sobre la salud humana y del ecosistema, ya que tienden a acumularse en los sedimentos y en los organismos acuáticos². La remediación de estos ecosistemas es complicada debido a su carácter intermareal. Por ello, las estrategias más utilizadas consisten en la estabilización de los metales en el sedimento, evitando su dispersión y entrada en la cadena trófica. En este sentido, la fitorremediación con plantas autóctonas de las marismas, se presenta como una alternativa económica y ecológica a los métodos físico-químicos de remediación³. Las comunidades microbianas que interactúan con las raíces de las plantas tienen un papel decisivo en el establecimiento de las mismas, su desarrollo y su tolerancia a los metales pesados^{4, 5, 6}.

El diseño de programas eficaces de fitorremediación se ve severamente dificultado por la mala germinación de las semillas en suelos contaminados con metales⁷. En este trabajo se plantea la posibilidad de que la inoculación de plantas con rizobacterias con propiedades promotoras del crecimiento (PGPR) podría ayudar a superar este problema; por tal motivo, este trabajo se centró en investigar la influencia de dichas rizobacterias en la germinación de semillas de *Spartina densiflora* en sedimentos con diferentes características fisicoquímicas y grados de contaminación de metales.

Semillas de *S. densiflora* fueron inoculadas con diferentes tratamientos bacterianos. Los tratamientos estuvieron conformados por: cepas gram-negativas *Pantoea agglomerans* RSO6 y RSO7, cepa gram-positiva *Bacillus aryabhatai* RSO25 y un consorcio con las tres cepas bacterianas juntas.

La presencia de los metales As, Cu, Pb y Zn en sedimentos contaminados del Río Odiel redujo la germinación de *S. densiflora* en un 80% comparado con semillas cultivadas en sedimentos no contaminados del Río Piedras. La inoculación por separado con la cepa *Bacillus aryabhatai* RSO25, así como con la cepas *Pantoea agglomerans* RSO6 y RSO7, mejoró 2,5 veces la tasa de germinación de *S. densiflora* en sedimentos contaminados en comparación con el control sin inoculación. Además, el proceso de germinación se aceleró y las características generales de germinación mejoraron considerablemente en las semillas inoculadas con los tratamientos bacterianos de cepas independientes frente al tratamiento control (sin inoculación)⁸. El consorcio formado por todas las cepas seleccionadas no mostró una mejora en la germinación de *S. densiflora*.

Finalmente podemos decir que la inoculación con aislados bacterianos seleccionados de forma apropiada de la rizósfera de *Spartina densiflora* podría contribuir a mejorar su tasa y período de germinación, lo cual sería crucial en el diseño de proyectos de restauración de zonas contaminadas con metales pesados.

Referencias

1. Xia P *et al.* 2011. Eighty-year sedimentary record of heavy metal inputs in the intertidal sediments from the Nanliu River estuary, Beibu Gulf of South China Sea. *Environ Pollut* **159**: 92-99.
2. Gao W *et al.* 2015. Heavy metal accumulation reflecting natural sedimentary processes and anthropogenic activities in two contrasting coastal wetland ecosystems, eastern China. *J Soils Sediments* **16**: 1093-1108.
3. Soliman NF, Nasr SM & Okbah AA. 2015. Potential ecological risk of heavy metals in sediments from the Mediterranean coast. *Egypt J Env Health Sci Eng* **13**: 70.
4. Andrades-Moreno L. 2014. Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. *Environ Sci Pollut Res* **21**: 3713-3721.
5. Pajuelo E. 2014. Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an overview. *CAB Rev* **9**: 1.
6. Mateos-Naranjo E. 2015. Deciphering the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the tolerance of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* to physicochemical properties of salt-marsh soils. *Plant Soil* **394**: 45-55.
7. Sethy SK & Ghosh S. 2013. Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med* **4**: 27-275.
8. Paredes-Páliz KI. 2016. Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram positive and gram negative strains. *Environ Sci Pollut Res* **23**: 19825-19837.

Agradecimientos

K.I. Paredes-Páliz agradece a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (SENESCYT – Ecuador) por la financiación de su beca pre-doctoral. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P11-RNM-7274 (Proyecto de Excelencia Junta de Andalucía).

Estudio del microbioma nodular en alfalfa californiana

Pilar Martínez-Hidalgo¹, Esteban A. Veliz² and Ann M. Hirsch²

¹*Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca;* ²*Department of Molecular Cell and Developmental Biology, University of California, Los Angeles, U.S.A.*

E-mail: martinezhp@usal.es

La asociación *Rhizobium*-leguminosa es un sistema complejo y muy estudiado en el que la bacteria induce la formación de un nuevo órgano en la planta, el nódulo, diseñado específicamente para que la bacteria fije nitrógeno atmosférico que aporta a la planta.

De acuerdo con este conocimiento se puede inferir que en un nódulo funcional y sano, solo deberíamos encontrar bacterias fijadoras de nitrógeno. Esta idea se ha mantenido durante muchos años y ningún investigador la había cuestionado.

Sin embargo, en la actualidad nuestras ideas sobre la microbiota del nódulo han cambiado de forma drástica: (i) Los rizobios clásicos se diversifican y del primer género *Rhizobium* se desgajan nuevos géneros: *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) etc. (ii) Se describen nuevos géneros de microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno muy alejados filogenéticamente de los rizobios clásicos. Y (iii) se descubre que en el interior del nódulo existen otros microorganismos que no fijan nitrógeno pero que se aíslan de forma constante de los nódulos de las leguminosas¹. Estos microorganismos son el objeto de este trabajo realizado con nódulos de *Medicago* en diversas localizaciones de California

Las cepas bacterianas aisladas en este estudio, de nódulos de *Medicago* esterilizados en superficie, pertenecen a los siguientes géneros:

Phylum Firmicutes: *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Oceanobacillus*.

Phylum Actinobacteria: *Micromonospora*, *Pseudonocardia* y *Streptomyces*.

Phylum Proteobacteria: *Ochrobactrum* y *Methylobacterium* (*alfa-Proteobacteria*) y *Variovorax* (*beta-Proteobacteria*).

El primer género microbiano en base al número de aislados en este estudio (excluyendo los rizobia) es el género *Bacillus*. Su interés como PGPR ha sido estudiado extensamente y desde diferentes ópticas². En este estudio se han analizado la diversidad de nuestros aislados y su potencial como PGPR.

Ochrobactrum es un género de bacterias Gram negativas que ha sido aislado de raíces de plantas leguminosas. Dos de las especies más próximas a nuestros aislados proceden también de nódulos de leguminosas (*Cytisus* y *Lupinus*). Nuestros aislados se agrupan estrechamente con algunas de las especies válidamente descritas hasta la fecha. Sin embargo, de acuerdo con la topología del árbol y teniendo en cuenta la similitud del gen *rrs* de las especies ya descritas, también en este caso, probablemente se podrán describir nuevas especies para lo que será necesario profundizar en la caracterización de estos aislados, en proyectos futuros.

Dentro del phylum *Actinobacteria*, cabe destacar las cepas aisladas pertenecientes a los géneros *Micromonospora* y *Streptomyces* que actualmente están recibiendo la atención que

merecen como bacterias promotoras del crecimiento y defensa vegetal (PPB)^{3,4}. Desde su descubrimiento en este entorno, se han descrito nuevas especies e identificado muchas otras cepas de nódulos de leguminosas pertenecientes a estos géneros¹. Cabe destacar el caso de *Micromonospora*, que ha sido aislada de más de 20 especies vegetales distintas lo que sugiere una amplia distribución, y su potencial como PGPR está siendo estudiado por nuestro grupo. Sin embargo, en este estudio el número de aislados de este género ha sido menor que lo obtenido en experimentos similares en España y en Australia. Nuestras cepas no se agrupan estrechamente con ninguna de las especies válidamente descritas hasta la fecha. Esta diversidad ha sido una constante en todos los estudios realizados hasta la fecha tanto por nuestro grupo como por otros autores.

Tras la identificación de nuestras cepas, realizamos también una caracterización de sus capacidades PGPR. Cabe destacar la capacidad de la mayoría de las cepas para utilizar CMC como única fuente de carbono y los resultados de crecimiento a diferentes pHs que indican una excelente adaptación a diferentes condiciones edáficas y a la utilización de restos vegetales para su nutrición. La capacidad para crecer en medios libres de nitrógeno puede indicar que son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera, sin embargo, debido a que no es una prueba definitiva para la confirmación de la capacidad de fijación de nitrógeno, es necesario completar este estudio dado el interés de esta característica para la selección de cepas de interés en interacción con plantas⁵.

El análisis genómico asociado con algunas de las características PPB de cepas de *Bacillus* y *Micromonospora* nos permite concluir que la presencia de los genes responsables y su entornos genéticos apoyan los resultados fisiológicos y bioquímicos analizados.

Posteriores ensayos en microcosmos mostraron que nuestros microorganismos tenían una buena capacidad como potenciales biofertilizantes.

Referencias.

1. Martínez-Hidalgo P & Hirsch AM. 2017. The nodule microbiome; N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes* (Invited review; in review).
2. Schwartz AR *et al.* 2013. *Bacillus simplex*-a little known PGPB with anti-fungal activity alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy* **3**: 595-620.
- 3 Martínez-Hidalgo P *et al.* 2014. *Micromonospora* from nitrogen-fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Sci Rep*, **4**: 6389 doi: 10.1038/srep06389
4. Martínez-Hidalgo P, García JM & Pozo MJ. 2015. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Front Microbiol* **6**: 922. doi: 10.3389/fmicb.2015.00922
5. Martínez-Hidalgo P *et al.* 2014. Endophytic *Micromonospora* from *Medicago sativa* are apparently not able to fix atmospheric nitrogen. *Soil Biol Biochem* **74**: 201-203.

Agradecimientos.

Contrato posdoctoral a PMH de la JCyL-FEDER (Ref. SA058U16) y un contrato postdoctoral de la "Fundación Ramón Areces". E.A.V. agradece financiación de NIH IMSD GM055052. Investigación en el laboratorio en UCLA financiado por un "NSF Award IOS 1201735" y por la "Shanbrom Family Foundation".



SESIÓN VIII:

OTROS TEMAS
OTROS TEMAS

Análisis del transcriptoma de la interacción Geminivirus - tomate

A. Piedra-Aguilera¹, A. P. Luna¹, F. Villanueva-Montiel¹, A. Esteve-Codina², J.A. Díaz-Pendón¹, E. R. Bejarano¹ y A. G. Castillo¹.

¹Area de Genética. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Campus Teatinos, 29010 Málaga, Spain. ²Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). Barcelona Science Park. 08028. Barcelona. Spain.

E-mail:0618413385@uma.es

Los geminivirus son virus de plantas pertenecientes a la familia *Geminiviridae*. Poseen un genoma compuesto por una o dos moléculas de DNA circular de cadena simple y una cápside compuesta de dos partes icosaédricas gemelas, de ahí el nombre de geminivirus. Uno de los geminivirus mejor caracterizados es el virus del *rizado amarillo de la hoja de tomate* (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*), causante de importantes pérdidas en cosechas de tomate en zonas templadas, subtropicales y tropicales. Este geminivirus codifica 6 proteínas, de las cuales sólo la proteína Rep es esencial para su replicación¹. Detrás de la aparente simplicidad de los geminivirus se esconde una compleja red de interacciones moleculares con su huésped, lo cual induce una gran variedad de cambios a nivel transcripcional, post-transcripcional y a nivel cromatínico, tanto en la planta como en el geminivirus². Con el objetivo de estudiar dichos cambios, llevamos a cabo una aproximación global de la interacción TYLCV-tomate, consistente en el análisis del transcriptoma mediante secuenciación masiva (NGS, *next generation sequencing*) de RNAs mensajeros (mRNA) y de pequeños RNAs (*small RNA*).

Plantas de tomate (*Moneymaker*) se infectaron con TYLCV bajo condiciones controladas de luz y temperatura, como se indica a continuación: un grupo de plantas se infectaron empleando *Agrobacterium tumefaciens* como vector, y otro grupo usando mosca blanca (*Bemisia tabaci*), vector natural de los geminivirus. Como tratamientos de control, se utilizaron plantas *naive*, plantas inoculadas con *A. tumefaciens* que no contenía el geminivirus, y plantas puestas en contacto con mosca blanca no virulífera. Tejido apical de estas plantas fue colectado a distintos tiempos (2, 7, 14 y 21 días tras la inoculación), y RNA total fue extraído para posteriormente ser analizado mediante secuenciación masiva. Para cada tratamiento y tiempo se generaron tres réplicas biológicas, cada una consistente en un *pool* de seis plantas. Se presentarán y discutirán los datos preliminares obtenidos con esta aproximación.

Referencias.

1. Fondong. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Mol Plant Pathol* **14**: 635-649.
2. Hanley-Bowdoin *et al.* 2013. Geminivirus: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol* **11**: 777-788.

La proteína Rep de geminivirus reduce la sumoilación de PCNA

B. Sabarit, M. Arroyo-Mateos, M. A. Sánchez-Durán, E. R. Bejarano

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, La Mayora (IHSM-UMA-CSIC), Área de Genética, Universidad de Málaga, Teatinos, Málaga 29010

E-mail: bsabarit@uma.es

Los geminivirus, llamados así por la forma icosaédrica de su cápside, son una familia de virus patógenos de plantas que causan algunas de las enfermedades con mayor impacto económico a nivel mundial. Estos pequeños virus de DNA se replican en el núcleo de las células vegetales utilizando la maquinaria celular del hospedador, además de requerir de forma esencial la presencia de una de sus proteínas, denominada Rep (replication protein). Para llevar a cabo la infección, los geminivirus alteran rutas de regulación post-traduccionales, lo cual consiguen mediante la interacción de algunas de sus proteínas con componentes de estas rutas^{1,2,3}. Dos de las modificaciones post-traduccionales más importantes, la sumoilación y la ubiquitinación, que consisten en la adición mediante una cascada enzimática de pequeños péptidos (ubiquitina y SUMO) a residuos de lisina de la molécula diana, están involucradas en numerosos procesos de la planta, incluidos el desarrollo y el ciclo celular, y juegan un papel relevante en la respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos.

Trabajos previos desarrollados en nuestro grupo mostraron que la proteína Rep del geminivirus *Tomato Golden mosaic virus* interacciona con SCE1 (SUMO Conjugating enzyme)⁴, una de las enzimas que participan en la ruta de sumoilación, y PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)^{5,6}, una proteína homotrimérica que actúa como coordinador central en la replicación y reparación del DNA y en la que las modificaciones postraduccionales juegan un importante papel regulando su interacción con otras proteínas. Posteriormente, se vio que la interacción entre Rep y SCE1 es necesaria para la infección por geminivirus y que la expresión de Rep tiene un efecto específico sobre la sumoilación de las proteínas de la planta^{4,7}. Mediante ensayos en *Escherichia coli* usando el sistema de sumoilación de *Arabidopsis thaliana*, hemos detectado que una de estas proteínas es PCNA y que su sumoilación se ve reducida por la presencia de la proteína viral. Así mismo, se ha comprobado que esa disminución se produce por un mecanismo que no implica la interacción de Rep con SCE1 e identificado las lisinas de PCNA cuya sumoilación se ve afectada.

Además, utilizando un sistema de ubiquitinación en *E. coli*⁸, se comprobó si la presencia de Rep produce el mismo efecto en la ubiquitinación. Resultados preliminares indican que la proteína viral no reduce, al menos al mismo nivel, la ubiquitinación de PCNA. Se discutirán las posibles consecuencias que para el virus puede tener la interferencia en la sumoilación de PCNA.

Referencias.

1. Eini O. *et al.* 2009. Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 737-746. DOI: 10.1094/MPMI-22-6-0737.

2. Bachmair A *et al.* 1990. Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant. *EMBO J* **9**: 4543-4549.
3. Lozano-Duran R *et al.* 2011. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1014-1032. DOI: 10.1371/journal.pone.0022383.
4. Castillo AG. *et al.* 2004. Interaction between a geminivirus replication and the plant sumoylation system. *J Virol* **78**: 2758-2769.
5. Castillo AG. *et al.* 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology* **312**: 381-394.
6. Bagewadi B. *et al.* 2004. PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates Rep activity. *J Virol* **78**: 11890-11903. DOI: [10.1128/JVI.78.21.11890-11903.2004](https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11890-11903.2004).
7. Sanchez-Duran MA. *et al.* 2011. Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection. *J Virol* **85**: 9789-9800. DOI: 10.1128/JVI.02566-10.
8. Sztralka W. *et al.* 2013. RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen. *J Exp Bot* **64**: 859-69. DOI: 10.1093/jxb/ers368.
9. Tsutakawa SE *et al.* 2015. Structurally Distinct Ubiquitin- and Sumo-Modified PCNA: Implications for Their Distinct Roles in the DNA Damage Response. *Structure* **23**: 724-33. DOI: [10.1080/07391102.2015.1032745](https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1032745).

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Ref: AGL2013-48913-C2-2-R).

Efectos sobre planta y suelo de un compost enriquecido con biochar

N. Ortiz-Liévana, M. E. Sánchez, J. Cara, F. González-Andrés

Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad (IRENA), Universidad de León.

E-mail: nortl@unileon.es

El biochar es un producto obtenido a partir de biomasa mediante el proceso de pirolisis, cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas lo hacen de alto interés en agricultura^{1,2}. A su vez, el compost supone un aporte de nutrientes en plantas³ y un aumento de la producción agrícola⁴. El presente trabajo tiene como objetivo general analizar los efectos agronómicos, sobre la respiración del suelo y sobre su actividad enzimática, de la utilización de biochar como aditivo del compost.

Se trabajó en condiciones de microcosmos en invernadero, con un cultivo de maíz, en un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones y dos factores: la dosis de compost (0 t/ha o control y 5t/ha) y la dosis de biochar en el compost (0% o control y 3%). Los efectos sobre las plantas de maíz se evaluaron a partir de diversos parámetros como la biomasa aérea fresca y seca de la planta, y el análisis de varios elementos en la misma, como N, P, K, Ca y Mg; los efectos sobre el suelo se analizaron mediante la actividad enzimática y la respiración del mismo.

Los resultados obtenidos indican que el enriquecimiento del compost con biochar tiene un efecto agronómico positivo, al aumentar ligeramente la biomasa fresca y seca con respecto al tratamiento que recibió compost sin enriquecer. Por otra parte, existe una disminución en la concentración de macro y mesonutrientes en la planta para este mismo tratamiento, lo cual indica una mayor eficiencia en el uso de los nutrientes por parte de la planta. A su vez, se observa un efecto positivo en la actividad biológica del suelo frente al compost sin enriquecer, ya que aumenta ligeramente la cantidad de carbono liberado como CO₂. Debido a que no hay un aumento de la actividad enzimática del suelo, de los experimentos realizados no puede deducirse si esta mayor respiración del suelo se debe a una mayor actividad microbiana, a una mayor respiración radicular por el mayor desarrollo de las plantas, o a una combinación de ambas. Por otra parte, se observa una disminución de la concentración de N y P en el suelo, como consecuencia del enriquecimiento del compost con biochar. En consecuencia, el incremento de biomasa del cultivo no se debe a una mayor riqueza en nutrientes de suelo, y es posible que esté relacionado con efectos directos o indirectos sobre la flora microbiana del suelo. Por tanto, como línea de trabajo futura, se propone utilizar otras técnicas que permitan averiguar si la utilización de biochar en el compost produce una modificación en el tipo de microorganismos de suelo o en su relación con la planta, de manera que se pueda explicar el efecto positivo sobre el crecimiento vegetal.

Finalmente, se demuestra la utilidad de este producto como enmienda en base a sus efectos sobre suelo y planta.

Referencias.

1. Sohi S *et al.* 2009. Biochar's roles in soil and climate change: A review of research needs. *CSIRO Land and Water Science Report* **5(09)**: 1-57.
2. Lehmann J *et al.* 2011. Biochar effects on soil biota-a review. *Soil Biol Biochem* **43**: 1812-1836.
3. Sullivan DM *et al.* 2002. Food waste effects on fertilizer nitrogen efficiency, available nitrogen and tall fescue yield. *Soil Sci Soc Am J* **66**: 154-161.
4. Carrera LM *et al.* 2007. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. *Appl Soil Ecol* **37**: 247-255.

Estudio de la comunidad microbiana de *MealFrass*, el abono mejorado de MealFood Europe: análisis de su potencial para promover el crecimiento vegetal

J. Poveda¹, A. Jiménez-Gómez², A. Díez-Méndez², J. D. Flores-Félix², M. Marcos-García², X.A. Cruz-González², Z. Saati-Santamaría², R. Rivas^{2,3,4} y P. García-Fraile¹.

¹*MealFood Europe S.L.*; ²*Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca*; ³*Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Salamanca*; ⁴*Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC.*

E-mail: paulagarcia@mealfoodeurope.com

En las próximas décadas el mundo deberá hacer frente a la demanda creciente de alimentos. Cirera y Masset¹ estimaron que durante la el siglo XXI las producciones de los cultivos agrícolas deberían incrementarse en un 100% para asegurar alimentos suficientes para todos. La síntesis de fertilizantes químicos requiere del consumo de grandes cantidades de energía, que contribuyen al cambio climático, y su aplicación origina la contaminación de suelos y agua, teniendo marcados efectos nocivos para el medio ambiente y la salud de las personas. Así, el desarrollo de una agricultura eficiente, que garantice la producción de alimentos para la creciente población mundial al tiempo que se minimicen los daños al medio ambiente es uno de los grandes retos de nuestros días; el desarrollo y aplicación de nuevos productos de origen orgánico con la capacidad de promover el desarrollo y producción de los cultivos es una de las posibles vías para conseguir dichos retos.

MealFoodEurope es una empresa dedicada a la cría industrial del insecto *Tenebrio molitor* (gusano de la harina) con fines de alimentación animal. Uno de los subproductos de esta actividad son los excrementos del insecto. El contenido NPK del estiércol de *Tenebrio* obtenido según las condiciones de cría específicas de MealFood Europe es de 4-4-3 (NPK) y su aplicación en diversos cultivos ha mostrado grandes incrementos en sus rendimientos y se comercializa como abono ecológico con el nombre comercial de MealFrass. La utilización de estas deposiciones como abono para plantas ha sido estudiada por varios autores. Se ha observado que la aplicación de este posible abono mejora los cultivos de judía (*Phaseolus vulgaris*) ocasionando un aumento en el peso de la legumbre de hasta un 18%, además de un aumento significativo en la productividad de cultivos de colza (*Brassica napus*)². En ambos estudios se destaca la posibilidad de que este aumento en la productividad agrícola, ligado a la aplicación de este abono, está íntimamente relacionado con los nutrientes que el mismo es capaz de aportar a las plantas a través de las raíces, aunque se sugiere al mismo tiempo que deben existir más causas para poder obtener los resultados observados.

Puesto que es de sobra conocida la presencia de microorganismos simbioses residentes en el intestino de *Tenebrio molitor*³, es de esperar que su estiércol tenga un elevado contenido microbiano, el cual dependerá de las condiciones de cría y alimentación del insecto.

Diversos microorganismos producen, como resultado de su metabolismo, incrementos de la producción de las plantas, ya sea mediante su capacidad para facilitar nutrientes o

mediante la síntesis de fitohormonas. Así, es posible que entre la microbiota de *Tenebrio* existan microorganismos con potencial para promover el crecimiento vegetal (PGPM, Plant Growth Promoting Microorganisms).

El objetivo de este estudio fue analizar la comunidad microbiana del estiércol de *Tenebrio* producido en las condiciones específicas de cría de la granja de MealFood Europe, obteniendo información tanto sobre la comunidad de microorganismos que contiene, como de su potencial para promover el crecimiento vegetal.

Para ello, se identificaron las comunidades de bacteria y hongos mediante secuenciación masiva de amplicones del 16S en el caso de las bacterias y del ITS en el caso de los hongos. Además, se procedió al aislamiento de las cepas fúngicas y bacterianas cultivables mediante la siembra de diluciones decimales seriadas de MealFrass en diversos medios de cultivo y se evaluó la capacidad de los aislados para producir los siguientes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal: solubilización de P y de K, posible fijación biológica de nitrógeno, producción de sideróforos, ácido indol acético y enzima ACC desaminasa.

Los resultados muestran la probable ausencia de microorganismos patógenos para el ser humano entre la microbiota de MealFrass. Además, todos los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal ensayados son producidos por varios de los microorganismos analizados.

Así, podemos concluir que la gran capacidad de promoción del crecimiento vegetal obtenida al aplicar MealFrass a los cultivos se debe, con gran probabilidad, no solo al contenido en nutrientes de dicho producto, sino también a la presencia de microorganismos que presentan mecanismos promotores del crecimiento vegetal.

Referencias.

1. Cirera X. & Masset E. 2010. *Royal Society B* **365**: 2821-2834
2. Liu H *et al.* 2002. *Journal of Quanzhou Normal College (Natural Science)* **21**(4): 68-71
3. Genta FA *et al.* 2006. *J Insect Physiol* **52** (6): 593-601.

Agradecimientos.

PGF es perceptora de un contrato Torres Quevedo cofinanciado por el Ministerio de Economía y Competitividad (PTQ-14-07381) y JP es preceptor de un contrato para la realización de un Doctorado Industrial, cofinanciado por el Ministerio de Economía y Competitividad (DI-15-07460).

Evaluación de las interacciones planta microorganismo de bacterias empleadas para la bioconsolidación de suelos

M. Fradejas-Bayón¹, J. D. Flores-Félix^{1,3}, R. Rivas^{1,2,3}

¹*Departamento de Microbiología y Genética, USAL;* ²*I+D Unidad asociada USAL-CSIC (IRNASA);* ³*Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).*

E-mail: mariafradejas@usal.es

Algunas bacterias son capaces de desarrollar interacciones positivas con las plantas como estrategia para adaptarse a su ambiente. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal benefician a las plantas a través de diferentes mecanismos como son la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas y sideróforos, la solubilización de fosfato y el biocontrol de patógenos. Mediante la utilización de estas bacterias se puede aumentar el crecimiento y por tanto la producción vegetal, reduciendo la necesidad de fertilizantes nitrogenados, que actualmente se utilizan en grandes cantidades pudiendo ser dañinos para el medio ambiente y la salud de las personas¹. Otro problema al que nos enfrentamos en la actualidad es la sobreexplotación de los terrenos requiriendo el desarrollo de nuevas técnicas para mejorar las características mecánicas de los suelos, ya que las existentes no son rentables económicamente y pueden ser perjudiciales para el medio ambiente y la salud de las personas².

En este trabajo se propone el aislamiento e identificación de bacterias (mediante la secuenciación del gen ribosómico 16S)³ capaces de llevar a cabo la consolidación del sustrato mediante la precipitación de carbonato cálcico favoreciendo las características mecánicas de los suelos de una manera más ecológica y económica de las que se utilizan en la actualidad. Para ello se evaluaron aspectos de interés en las cepas aisladas, como son la precipitación de carbonatos, su capacidad bioconsolidante o la formación biofilms que demostraría gran capacidad colonizadora de las cepas.

Con la finalidad de no solo mejorar las características mecánicas de los suelos sino también de conseguir una interacción positiva entre los microorganismos utilizados y las plantas que crecen en ellos, se evaluó la capacidad de las bacterias aisladas para promover el crecimiento vegetal, favoreciendo de esta manera el crecimiento de las plantas. Para ello se analizaron diferentes capacidades como son la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfato y la producción de sideróforos.

Se propone la aplicación de estas bacterias a campos sembrados plántulas de césped (*Festuca rubra*), ya que son sustratos que soportan vegetación que requiere de grandes cantidades de agua para su mantenimiento y que están sometidos a un desgaste intenso que hace necesaria la realización de revegetación continua. Por lo que la consolidación de estos sustratos es de interés debido a la consiguiente reducción de agua necesaria para su riego, así como el aumento de los tiempos de revegetación⁴.

Analizando los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que la cepa CUIC02 es la más adecuada en cuanto a su utilización para la consolidación de suelos que poseen una cobertura vegetal de césped, presentando un aumento de la longitud aérea y radicular así como del número de raíces secundarias mayor que las demás cepas

evaluadas, observándose también una capacidad bioconsolidante y una producción de cristales de carbonato, de biofilms, de sideróforos y de ácido indolacético de una manera similar a las demás cepas.

Referencias.

1. Mehboob I, Naveed M & Ahmad Z. 2009. Rhizobial Association with NonLegumes: Mechanisms and Applications. *Crit Rev Plant Sci* **28**: 432–456.
2. Ivanov J & Chu J. 2008. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Rev Environ Sci Biotechnol* **7**: 139–153.
3. De Muynck W, De Belie N & Verstraet W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering* **36**: 118136.
4. Navarrete-Tindall N & Van Sambeek JW. 2010. Evaluating Poverty Grass (*Danthonia spicata*) for Golf Courses in the Midwest. *USGA Turfgrass and Environmental Research Online* **9**: 1-8.



ANEXO I:

LISTADO DE PARTICIPANTES

LISTADO DE PARTICIPANTES

Listado de participantes

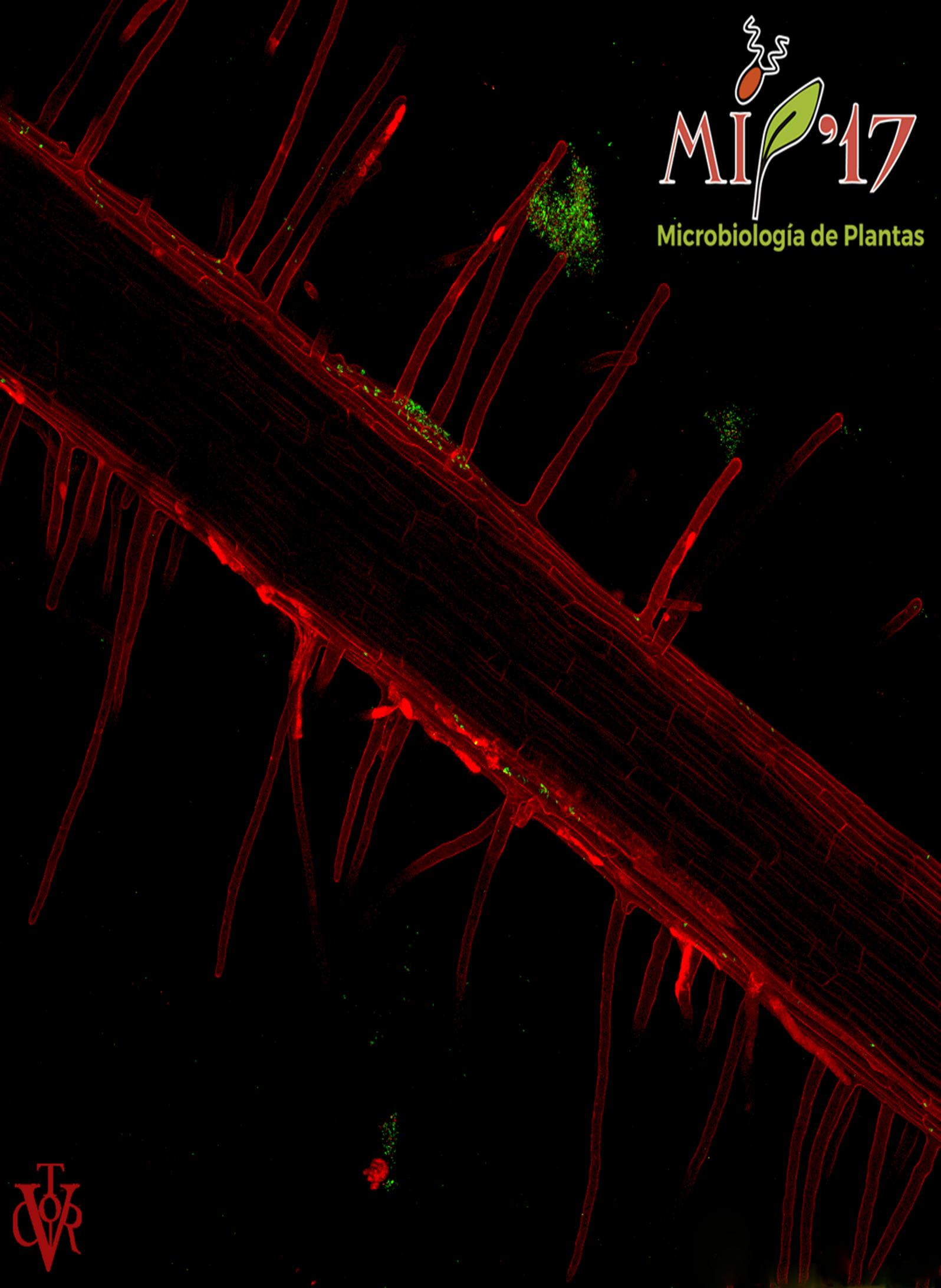
Acosta Morel	Wilson	wily@usal.es
Anta Fernández	Francisco	u86028@usal.es
Antequera Gómez	María Luisa	marialan@uma.es
Aprile Mancha	Francesca	aprile@uma.es
Ballesteros	Marta	marta.ballesterosg@alumnos.upm.es
Bejarano	Carol	carol.bejarano@idenbiotechnology.com
Bernal Guzman	Patricia	p.bernal@imperial.ac.uk
Blanco Romero	Esther	esther.blanco@uam.es
Caballo Ponce	Eloy	eloy_cprm@uma.es
Carrasco Carrasco	Jaime	carrasco.jaime@gmail.com
Carrasco Carrasco	Jaime	carraco.jaime@gmail.com
Carvalho Pereira	Eric	eric.carvalho@irnasa.csic.es
Casado del Castillo	Virginia	virginiacasado@usal.es
Castellano Hinojosa	Antonio	ach@ugr.es
Cazorla López	Francisco M.	cazorla@uma.es
Celador Lera	Lorena	lorenacelador@usal.es
Cerna Vargas	Jean Paul	jeanpaul.cerna.vargas@alumnos.upm.es
Cruz González	Xavier Alexis	xavier.cruz@usal.es
de Vicente Moreno	Antonio	adevicente@uma.es
del Cerro Sánchez	Pablo	pdelcerro@us.es
Díez Méndez	Alexandra	alexandradm@usal.es
Duran Wendt	David	david.duran@uam.es
Fernández Llamosas	Helga	hfllamosas@cib.csic.es
Flores Félix	José David	jdflores@usal.es
Flors Herrero	Víctor	flors@uji.es
Fradejas Bayón	María	mariafradejas@usal.es
Gallegos Fernández	Mª Trini	maritrini.gallegos@eez.csic.es
Gamir Felip	Jordi	jordi.gamir@eez.csic.es
García Fraile	Paula	gerencia@mealfoodeurope.com
García Sánchez	Juan Antonio	jags4595@gmail.com
Garita Cambronero	Jerson	jgarita84@gmail.com
Garrido Sanz	Daniel	daniel.garrido@uam.es
Gonzalez Andres	Fernando	fgona@unileon.es
Grondona España	Mª Isabel	isabel.grondona@mirat.net
Gutiérrez Albánchez	Enrique	enrique.gutierrezalbanchez@ceu.es

Listado de participantes

Gutiérrez Barranquero	Jose Antonio	jagutierrez@uma.es
Igual Arroyo	José Mariano	mariano.igual@csic.es
Jiménez Gómez	Alejandro	alexjg@usal.es
Jiménez Zurdo	José Ignacio	jjjz@eez.csic.es
Lami	María Jesús	majesuslami@hotmail.com
Lidoy Logroño	Javier	jlidoy@gmail.com
LLuch Pla	Carmen	clluch@ugr.es
López Baena	Francisco Javier	jlopez@us.es
López Márquez	Diego	dln@uma.es
López Pagán	Nieves	nieves.lopezpagan@gmail.com
López Solanilla	Emilia	emilia.lopez@upm.es
Marcos García	Marta	martamg@usal.es
Martín Basanta	Marta	m.martin@uam.es
Martin Rivilla	Helena	hel.martin.ce@ceindo.ceu.es
Martínez Hidalgo	Pilar	martinezhp@usal.es
Martínez Molina	Eustoquio	emm@usal.es
Mateos González	Pedro Francisco	pfmg@usal.es
Mateu Garcia	Diego	dmateu@uji.es
Matilla Vázquez	Miguel Ángel	miguel.matilla@eez.csic.es
Menendez Gutierrez	Esther	esthermenendez@uevora.pt
Mesa Marín	Jennifer	jmesam@us.es
Morán-Diez	María Eugenia	me.morandiez@usal.es
Moreno Pérez	Alba	albamp@uma.es
Mulas García	Rebeca	rmulg@unileon.es
Muriel	Candelas	candelas.muriel@uam.es
Navarro de la Torre	Salvadora	snavarro1@us.es
Navarro Gómez	Pilar	pnavarro2@us.es
Ortiz Liébana	Noemí	nortl@unileon.es
Osorno Bedoya	Laura	lauraosornobedoya@gmail.com
Palacios Alberti	Jose Manuel	jose.palacios@upm.es
Paredes Páliz	Karina	kparedes@us.es
Pastor de los Bueis	Raquel	rpasb@unileon.es
Pastor Fuentes	Victoria	pastorm@uji.es
Peix Geldart	Álvaro	alvaro.peix@csic.es
Peñalver Navarro	Ramón	rpenal@ivia.es

Listado de participantes

Pérez García	Alejandro	aperez@uma.es
Pérez Mendoza	Daniel	dpmendoza@eez.csic.es
Pescador Azofra	Leyre	lpescador001@usal.es
Piedra Aguilera	Álvaro	alasdefuego3813@hotmail.com
Polonio Escalona	Álvaro	polonio@uma.es
Poveda Arias	Jorge	jorgepoveda@usal.es
Pozo	Maria José	mjpozo@eez.csic.es
Ramírez Bahena	Martha Helena	mh.ramirez@usal.es
Ramos Rodríguez	Cayo Juan	crr@uma.es
Ramos Solano	Beatriz	bramsol@ceu.es
Redondo Nieto	Miguel	miguel.redondo@uam.es
Rey Navarro	Luis	luis.rey@upm.es
Rivas González	Raúl	raulrg@usal.es
Rivera-Mendez	William	wirivera@itcr.ac.cr
Rivilla Palma	Rafael	rafael.rivilla@uam.es
Robledo Garrido	Marta	martarg@usal.es
Rodríguez Palenzuela	Pablo	pablo.rpalenzuela@upm.es
Rodríguez Vazquez de Aldana	Beatriz	beatriz.dealdana@irnasa.csic.es
Romero Hinojosa	Diego Francisco	diego_romero@uma.es
Rubio Pérez	M. Belén	belenru@usal.es
Rueda Blanco	Javier	jrblanco@uma.es
Sabarit Peñalosa	Blanca	bsabarit@uma.es
Salinero Lanzarote	Alvaro	alvaro.salinero@upm.es
Sánchez Bel	Paloma	pbel@uji.es
Sánchez-Cao	Manuel	manuelsanchezcao@gmail.com
Sanjuan Pinilla	Juan	juan.sanjuan@eez.csic.es
Sanmartín Martínez	Neus	nsanmart@uji.es
Tienda Serrano	Sandra	sandratienda@uma.es
Torés Montosa	Juan Antonio	tores@eelm.csic.es
Travieso Huertas	Maria Luisa	mluisa.travieso@eez.csic.es
Velázquez	Encarna	evp@usal.es
Vida Hinojosa	Carmen María	cvida@uma.es
Vilchez Morillas	Juan Ignacio	juan@sibs.ac.cn
Vinardell González	José María	jvinar@us.es
Zabalgogazcoa González	Iñigo	i.zabalgo@irnasa.csic.es

A fluorescence microscopy image of a plant stem, likely a root or stem section, showing a network of red fluorescent structures. The main stem is a thick, elongated structure with a clear cellular structure, surrounded by numerous thinner, branching structures. Green fluorescent spots are scattered throughout the image, particularly along the main stem and in the surrounding area. The background is black.

MI'17
Microbiología de Plantas

