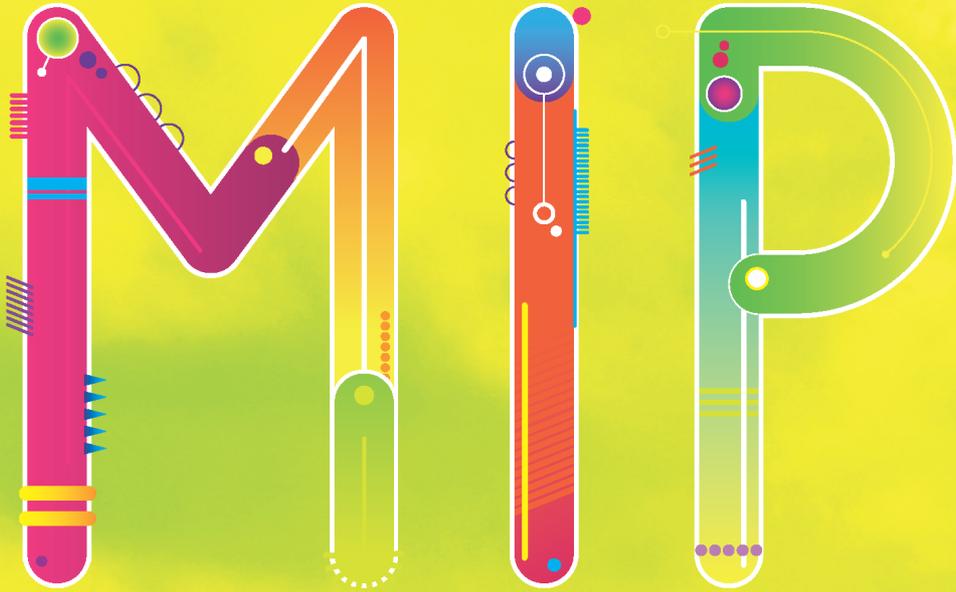


mip19osuna.es

2019



VIII REUNIÓN DEL
GRUPO ESPECIALIZADO
DE MICROBIOLOGÍA
DE PLANTAS

23·24·25 ENERO

ESCUELA UNIVERSITARIA DE OSUNA (SEVILLA)



Comités

Comité Científico

- Dra. Eloísa Pajuelo Domínguez. Departamento de Microbiología y Parasitología.
Universidad de Sevilla.
- Dra. Dolores Fernández Ortuño. Departamento de Microbiología. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea - Universidad de Málaga - CSIC "La Mayora".
- Dra. Nuria Ferrol González. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. CSIC-Estación Experimental del Zaidín (Granada).
- Dra. Emilia López Solanilla. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid - INIA.
- Dr. Francisco Javier Lloret Romero. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

Comité Organizador Local

Presidentes.

- Dr. Francisco Javier López Baena.
Dr. José María Vinardell González.

Miembros del comité.

- Dr. Francisco Javier Ollero Márquez.
Dr. Francisco Pérez Montaña.
Dra. María del Rosario Espuny Gómez.
Dr. Carlos Medina Morillas.
Dra. Irene Jiménez Guerrero.
Dr. Sebastián Acosta Jurado.
Dra. Cynthia Alías Villegas.
D. Pablo del Cerro Sánchez.
Dña. Pilar Navarro Gómez.

Colaboradores.

- Isamar Moyano Bravo.
Andrés Almozara García.
Jennifer Mesa Marín.
Salvadora Navarro de la Torre.
Pablo Buzón García.

JUNTA DIRECTIVA DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA DE PLANTAS

Presidente.

Emilia López Solanilla.
CBGP, Universidad Politécnica de Madrid.

Vicepresidente.

José Manuel Palacios Alberti.
CBGP, Universidad Politécnica de Madrid.

Secretario.

Diego F. Romero Hinojosa. IHSM-UMA-CSIC, Universidad de Málaga.

Tesorera.

María Trinidad Gallegos Fernández.
CSIC-Estación Experimental del Zaidín-Granada.

Vocal.

Francisco Javier López Baena.
Universidad de Sevilla.

Vocal.

Marta Martín Basanta.
Universidad Autónoma de Madrid.

PROGRAMA

Todas las sesiones se llevarán a cabo en el Aula Magna de la Colegiata de Nuestra Señora de la Asunción.

Miércoles 23 de enero de 2018	
9:00-11:30	Recogida de documentación en la Colegiata de Nuestra Señora de la Asunción
11:30-12:00	Apertura del Congreso
12:00-13:30	<i>Sesión I. <u>Diversidad y ecología de microorganismos asociados a plantas</u></i> Moderadora: Dra. Esther Menéndez Gutiérrez
13:30-15.30	Recepción y almuerzo
15:30-17:00	<i>Sesión II. <u>Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Patógenos 1)</u></i> Moderadora: Dra. Dulce Nombre Rodríguez Navarro
17:00-17:30	Pausa Café
17:30-19:00	<i>Sesión III. <u>Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Patógenos 2)</u></i> Moderador: Dr. Pablo Rodríguez Palenzuela
20:00-21:30	Visita guiada nocturna por Osuna
A partir de las 21:30	Tapas por Osuna

Jueves 24 de enero de 2018	
9:00-11:00	<i>Sesión IV. <u>Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Patógenos 3)/Interacciones beneficiosas planta-microorganismo (Microorganismos Beneficiosos 1)</u></i> Moderador: Dr. Cayo Ramos Rodríguez
11:00-11:30	Pausa Café
11:30-13:45	<i>Sesión V. <u>Interacciones beneficiosas planta-microorganismo II (Microorganismos Beneficiosos 2)</u></i> Moderadora: Dra. María del Rosario Espuny Gómez
14:00-16:00	Almuerzo
16:00-17:30	<i>Sesión VI. <u>Interacciones beneficiosas planta-microorganismo III (Microorganismos Beneficiosis 3)</u></i> Moderadora: Dra. Marta Martín Basana
17:30-18:00	Pausa Café

18:00-19:45	<i>Sesión VII. <u>Interacciones beneficiosas planta-microorganismo IV (Microorganismos Beneficiosos 4</u></i> Moderador: Dr. Pedro F. Mateos González
A partir de las 21:30	Cena de clausura. Hotel Marqués de la Gomera

Viernes 25 de enero de 2018	
10:00-11:30	<i>Sesión VIII. <u>Miscelánea 1</u></i> Moderadora: Dra. Matilde Barón Ayala
11:30-12:00	Pausa Café
12:00-13:15	<i>Sesión IX. <u>Miscelánea 2</u></i> Moderadora: Dra. Paula García Fraile
13:15-13:45	Asamblea MiP
13:45-14:15	Clausura del Congreso

ÍNDICE

COMUNICACIONES ORALES 1

Sesión I: Diversidad y ecología de microorganismos asociados a plantas..... 2

Evolución genómica de morfotipos espontáneos en colonias de *Bacillus cereus*.

Díaz-Martínez, L. *, Antequera-Gómez, M.L., de Vicente, A., Romero, D. 3

Aislamiento y estudio metagenómico de un consorcio bacteriano para la rizorremediación de diésel y aplicación en microcosmos.

Garrido-Sanz, D. *, Guirado, M., Millán, R., Redondo-Nieto, M., Martín, M., Rivilla, R. 4

Análisis de la diversidad microbiana en suelos de las marismas arroceras del Guadalquivir.

Ramírez-Moncayo, C., Álvarez, C., Alves-Martínez, P., Navarro, J.A., Hervás, M., Roncel, M., Ortega, J.M., Molina-Heredía, F.P., Mariscal, V. * 6

Shifts on microbial communities in soils under Montado system: effects of dolomitic limestone-based amendments.

Menéndez, E. *, Brígido, C., Igual, J.M., Materatski, P., Alexandre, A., Brito, I., Alho, L., Carvalho, M. 7

***Arthrocnemum macrostachyum* y su microbioma como herramienta en la fitorremediación de marismas contaminadas con metales pesados.**

Navarro-Torre, S. *, Barcia-Piedras, J.M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. 9

Diversidad filogenética de los rizobios que nodulan *Spartocytisus supranubius* en el Parque Nacional del Teide.

Pulido-Suárez, L. *, Medina-Cabrera, A., Pérez-Yépez, J., León-Barrios, M. 11

Sesión II: Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Patógenos 1) 13

Análisis comparativo de dos colecciones de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* asociadas a mango

Aprile, F. *, Gutiérrez-Barranquero, J.A., Cazorla, F.M., de Vicente, A. 14

Relevancia de la quimiopercepción durante el proceso de infección de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Cerna-Vargas, J.P. *, Santamaría-Hernando, S., Hurtado-Rodríguez, A., De Francisco-De Polanco, S., Rodríguez-Herva, J.J., Matilla, M.A., Rodríguez-Palenzuela, P., Krell, T., López-Solanilla, E. 16

Regulación global por la ruta Gac-rsm en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Ferreiro, M.D. *, Felipe, A., Gallegos, M.T. 18

Identificación bioinformática y análisis funcional de factores de transcripción de *Pseudomonas savastanoi* potencialmente implicados en la infección de *Mandevilla* spp.

Lavado-Benito, C. *, Martínez-Gil, M., Rodríguez-Palenzuela, P., Ramos, C. 19

Expresión heterogénea y colonización de la planta en *Pseudomonas syringae*.

López-Pagán, N. *, Sánchez-Romero, M.A., Rufián, J.S., Aussel, L., Casadesús, J., Ruiz-Albert, J., Beuzón, C.R.	20
Análisis genómico y transcriptómico de los efectores del sistema de secreción tipo III en <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335.	
Moreno-Pérez, A *, Rodríguez-Palenzuela, P., Ramos, C.	22
Sesión III: Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Patógenos 2)	23
Análisis bioinformático de los sensores de quimioatracción en bacterias fitopatógenas.	
Rodríguez-Palenzuela, P. *, Sánchez-Colmenero, J., Del Hoyo, D., Cerna-Vargas, J.P., Santamaría-Hernando, S., Ramos, C., López-Solanilla, E.	24
Nuevas secuencias codificantes ignoradas hasta la fecha podrían jugar un papel clave en el desarrollo de <i>Podosphaera xanthii</i>.	
Grifé-Ruiz, M. *, de Vicente, A., Pérez-García, A.	26
Fenotipado del oídio en cucurbitáceas mediante técnicas de imagen.	
Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M. *, Barón, M.	27
Proteínas secretadas por el haustorio y su importancia en el desarrollo de <i>Podosphaera xanthii</i>.	
Polonio, A. *, El-Azaz, J., Fernández-Ortuño, D., de Vicente, A., Pérez-García, A.	29
Búsqueda de diana en <i>Podosphaera xanthii</i> para el desarrollo de nuevas fitoterapias antifúngicas.	
Ruiz-Jiménez, L. *, Fernández-Ortuño, D., de Vicente, A., Pérez-García, A.	30
Monitorización de aislados resistentes a los fungicidas MBC en <i>Podosphaera xanthii</i>, oídio de cucurbitáceas, utilizando la técnica LAMP.	
Vielba-Fernández, A. *, de Vicente, A., Pérez-García, A., Fernández-Ortuño, D.	31
Sesión IV: Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Patógenos 3)/Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Beneficiosos 1)	32
Caracterización funcional del efector AopW1 secretado a través del Sistema de Secreción de Tipo 3 de la bacteria fitopatógena <i>Acidovorax citrulli</i>.	
Jiménez-Guerrero, I. *, Sonawane, M., Mateus Da Silva, G., Pérez-Montaño, F., Ollero, F.J., Burdman, S.	33
El regulador positivo de defensas ZIP1 es acetilado por el efector bacteriano HopZ1a para suprimir las respuestas de defensa en <i>Arabidopsis</i>.	
Rueda-Blanco, J. *, Rufián, J.S., López-Márquez, D., Beuzón, C.R., Ruiz-Albert, J.	35
Interacción mutualista entre cianobacterias y arroz: hacia el diseño de nuevos biofertilizantes.	
Álvarez, C. *, Ramírez-Moncayo, C., Navarro, J.A., Hervás, M., Roncel, M., Ortega, J.M., Molina-Heredia F.P., Mariscal, V.	36
Estudio de la regulación de la síntesis de factores de nodulación bajo estrés osmótico en <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.	
del Cerro, P. *, Ayala-García, P., Buzón, P., Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Megías, M., Ollero, F.J.	37

Las rizobacterias beneficiosas modifican la respuesta antioxidante (enzimática y no enzimática) en olivo en condiciones de estrés salino.

Galicia-Campos, E. *, Gutiérrez-Albanchez, E., Montero-Palmero, B., Ramos-Solano, B., García-Villaraco, A. 39

Caracterización funcional de NfeR1, un RNA regulador relacionado con la eficiencia simbiótica de *Sinorhizobium meliloti*.

García-Tomsig, N.I. *, Robledo, M., Peregrina, A., Millán, V., Becker, A., Jiménez-Zurdo, J.I. 41

La región génica SfHH103_00346-SfHH103_00348 de *Sinorhizobium fredii* HH103 está implicada en la movilidad en superficie inducida por genisteína de esta bacteria.

Navarro-Gómez, P. *, Alías-Villegas, C., Acosta-Jurado, S., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M. 42

Identificación de los determinantes genéticos que controlan la colonización del agente de biocontrol *Pseudomonas fluorescens* en cebada.

Pacheco-Moreno, A. *, Ridout, C., de Vos, S., Malone, J. 44

Sesión V: Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Beneficiosos 2) 47

La mutación en el gen *nolR* mejora la capacidad de nodulación de *Sinorhizobium fredii* HH103 en *Lotus japonicus* Gifu a través del cambio del modo de infección.

Acosta-Jurado, S. *, Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Carvajal, M.A., Pérez-Montaño, F., Navarro-Gómez, P., Alías-Villegas, C., López-Baena, F.J.¹, Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. .. 48

Estudio de la influencia de genes reguladores de la simbiosis y de los polisacáridos superficiales sobre la movilidad en superficie inducida por genisteína en *Sinorhizobium fredii* HH103.

Alías-Villegas, C. *, Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., López-Baena, F.J., Soto, M.J., Vinardell, J.M. 50

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

Ballesteros, M. *, Albareda, M., Duran, D., Palacios, J.M. 52

Implicación de la matriz extracelular de *Bacillus subtilis* en la interacción beneficiosa con la planta.

Berlanga-Clavero, M.V. *, Molina-Santiago, C., Navarro, Y., Sopeña-Torres, S., Blasco-Santamaría, M.L., Pérez-García, A., de Vicente, A., Romero, D. 54

AmrZ regula la síntesis de exopolisacáridos y proteínas relacionadas con la formación de biopelículas y colonización de la rizosfera en *Pseudomonas fluorescens* F113.

Blanco-Romero, E. *, Gómez-Luengo, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Martín, M. 55

Análisis de la mejora nutricional de cultivos de interés agroalimentario tras la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Jiménez-Gómez, A. *, García-Fraile, P., Rivas, R. 57

Exploración genómica de *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 para el análisis de rutas metabólicas potencialmente implicadas en su capacidad de inhibición del fitopatógeno de colza *Phoma lingam*.

Saati-Santamaría, Z. *, Jiménez-Gómez, A., Rivas, R., García-Fraile, P. 59

Efecto bioestimulante y bioprotector de diferentes rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (P.G.P.R.): ensayos en *Arabidopsis thaliana*.

Sacristán-Pérez-Minayo, G. *, López-Robles, D.J., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.	61
Papel del HPR como molécula señal en las interacciones multitróficas en la bacteria de control biológico <i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL1606.	
Tienda, S. *, Vida, C., Arrebola, E., de Vicente, A., Cazorla, F.M.	63
Sesión VI: Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Beneficiosos 3)	65
Estudio de las interacciones beneficiosas de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2^T con diferentes leguminosas.	
Díez-Méndez, A. *, Menéndez, E., Rivas, R., Mateos, P.F.	66
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> CDVBN10 is a plant growth promoting rapeseed endophyte with the capability to colonize and infect <i>Brassica napus</i> roots.	
Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Rivas, R., Mateos, P.F., García-Fraile, P. *	68
Mejora del contenido en antocianos en cultivo intensivo en fresa con microorganismos beneficiosos.	
Gutiérrez-Albanchez, E. *, García-Villaraco, A., Bernal-Govaerts, A., Lucas, J.A., Varó, A., Ramos-Solano, B.	70
El uso de rizobacterias para mejorar la capacidad defensiva de las plantas contra patógenos a través de la elicitación de los mecanismos de resistencia sistémica y sus interacciones con las rutas de transducción de señal mediadas por ácido salicílico y ácido jasmónico/etileno	
Martín-Rivilla, H. *, García-Villaraco, A., Ramos-Solano, B., Gutiérrez-Mañero, F.J., Lucas, J.A.	72
Respuestas de plantas crucíferas (<i>Brassicaceae</i>) a la aplicación combinada de <i>Trichoderma</i> y hongos micorrícicos arbúsculares.	
Poveda, J. *, Hermosa, R., Monte, E., Nicolás, C.	74
Evaluación de la capacidad nematocida de los agentes de biocontrol UMAF6614 y UMAF6639.	
Vela-Corcía, D. *, de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D.	76
Sesión VII: Interacciones microorganismos patógenos-plantas (Microorganismos Beneficiosos 4)	77
Uso de rizobacterias halófitas en la adaptación de cultivos al cambio climático.	
Bernabeu-Meana, M. *, Mesa-Marín, J., Mateos-Naranjo, E., Pérez-Romero, J.A., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Redondo-Gómez, S.	78
Selección de cepas de <i>Trichoderma</i> para su uso como bioestimulante de plantas de tomate bajo condiciones de estrés abiótico.	
Bovolini, M.P. *, Hermosa, R., Martínez-Fernández, J., Monte, E.	79
Tolerancia a la salinidad de las plantas en asociación con el endófito <i>Serendipita indica</i>: caracterización molecular de las ATPasas tipo ENA del hongo y su regulación.	
Lanza, M. *, Haro, R., Blázquez, L., Jaén, L., Benito, B.	81
Descifrando el papel de los flavonoides y las estrigolactonas en la simbiosis beneficiosa planta-hongo micorrícico arbúscular (AM).	
Lidoy-Logroño, J., Montalbán, C., Rial, C., Pozo, M.J., Macías, F.A., López-Ráez, J.A. *	83

La inoculación con endofitos incrementa el poder fitorremediador de *Spartina densiflora* frente a contaminantes orgánicos.

Mesa-Marín, J. *, Barcia-Piedras, J.M., Mateos-Naranjo, E., Cox, L., Real, M., Navarro-Torre, S., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E., Parra, R., Redondo-Gómez, S. 85

Los componentes de la matriz extracelular de *Bacillus subtilis* son necesarios para proteger la colonia de la invasión de *Pseudomonas* y para la co-colonización en plantas.

Molina-Santiago, C. *, Pearson, J.R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M.V., Petras, D., Caraballo-Rodríguez, A.M., de Vicente, A., Dorresteijn, P.C., Romero, D. * 86

Root responses of mycorrhizal plants upon *Botrytis cinerea* infection in shoots.

Sanmartín, N. *, Mateu, D., Pastor-Fernández, J., Sánchez-Bel, P., Pastor, V., Pozo, M.J., Flors, V. 87

Sesión VIII: Miscelánea 1..... 89

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

Antequera-Gómez, M.L. *, de Vicente, A., Romero, D. 90

TagX1 is required for the full killing capability of the *P. putida* Type VI secretion system.

Bernal, P. *, Spiga, L., Lee, S., Fetch, S., Furniss, C., Mavridou, D., Filloux, A. 91

El papel dual del amiloide funcional TasA del biofilm de *Bacillus subtilis* en la fisiología bacteriana y la persistencia sobre la superficie de la planta.

Cámara-Almirón, J. *, Navarro, Y., Magno-Pérez-Bryan, M.C., Molina-Santiago, C., de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D. 93

Caracterización de la hipotética proteína de defensa codificada por el gen At5G38850 en *Arabidopsis thaliana*.

López-Márquez, D., Del Espino, A. *, López-Pagán, N., Ruiz-Albert, J., Bejarano, E.R., Beuzón, C. 94

Peptide-induced resistance against a necrotrophic fungus in intercrop species.

Pastor-Fernández, J. *, Sánchez-Bel, P., Pastor, V., Mateu, D., Sanmartín, N., Flors, V. 96

Un locus ampliamente distribuido en el grupo *B. cereus* se encuentra implicado en la formación de biofilms.

Álvarez-Mena, A. *, Caro-Astorga, J., de Vicente, A., Romero, D. 98

Sesión IX: Miscelánea 2..... 99

Análisis funcional de la maduración de la hidrogenasa [FeNi] de *Rhizobium leguminosarum*: una metaloenzima de expresión simbiótica en nódulos de leguminosas.

Albareda, M. *, Pacios, L.F., Palacios, J.M. 100

Comparative analyses of exoproteomes of non-rhizobial bacterial endophytes when exposed to chickpea root exudates by next-generation proteomics.

Paço, A., Steinmetz, G., Armengaud, J., Brígido, C. * 102

Estudio de la biopelícula formada por dos especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas.

Heredia-Ponce, Z.M. *, Gutiérrez-Barranquero, J.A., Purtschert, G., Eberl, L., Cazorla, F.M., de Vicente, A. 104

Regulación de la síntesis del exopolisacárido ML β -glucano por un sistema de “partner-switching” en *Sinorhizobium meliloti*.

Baena, I., Pérez-Mendoza, D., Bonilla, I., Sanjuán, J., Lloret, J. * 106

Impacto de la matriz extracelular de *Bacillus subtilis* en la respuesta fisiológica de cucurbitáceas.

Sopeña-Torres, S. *, de Vicente, A., Romero, D. * 107

COMUNICACIONES 108

Estudio del operón like-TetR reprimido en presencia de flavonoides en *Sinorhizobium fredii* HH103.

Almozara, A. *, Navarro-Gómez, P., Acosta-Jurado, S., Alías-Villegas, C., Pérez-Montaño, F., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M. 109

Estudio de la función de las tres copias del gen *nodA* presentes en *Rhizobium tropici* CIAT 899 en la simbiosis con leguminosas.

Ayala-García, P. *, del Cerro, P., Buzón, P., Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Megías, M., Ollero, F.J. 111

Inoculantes bacterianos aplicados al cultivo de fresa como agentes promotores de crecimiento y biocontrol, en ensayo de campo.

Viejobueno, J., De los Santos, B., Camacho, M. * 113

Impacto del “quorum sensing” sobre la simbiosis de *Rhizobium tropici* CIAT899.

Aunión, A., Alías-Villegas, C., Cubo, T., Ollero, F.J., del Cerro, P., Espuny, M.R. * 115

La proteína caseína quinasa CK2 de *Nicotiana benthamiana* fosforila al efector NopP de *Sinorhizobium fredii* HH103 que interacciona con la ciclofilina CYP40.

Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., Medina, C., Santero, E., Monreal, J.A., Burdman, S., Ollero, F.J., López-Baena, F.J. * 117

Estudio de las interacciones beneficiosas de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T con diferentes cereales.

Díez-Méndez, A., Celador-Lera, L., Mateos, P.F. *, Rivas, R. 119

Análisis de las propiedades simbióticas de mutantes en proteínas efectoras del sistema de secreción de tipo 3 de *Sinorhizobium fredii* HH103 en su interacción con *Lotus japonicus*.

Acosta-Jurado, S., Jiménez-Guerrero, I., Almozara, A., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Medina, C. * 121

Un regulador transcripcional de la familia AraC es esencial para la síntesis de factores de nodulación en condiciones de estrés osmótico en *Rhizobium tropici* CIAT 899.

del Cerro, P., Ayala-García, P., Buzón, P., Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Megías, M. Ollero, F.J. * 123

Fitomicrobiomas de halófitas: herramientas biotecnológicas para la fitorremediación de metales pesados en sedimentos costeros.

Pajuelo, E. *, Paredes-Páliz, K.I., Caviedes, M.A., Rodríguez-Llorente, I.D. 125

GunA de *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 es una celulasa secretada a través del sistema de secreción de tipo 3 que afecta diferencialmente a la simbiosis con soja y coupí.

Pérez-Montaño, F.* , Jiménez-Guerrero, I., Zdyb, A., Beutler, M., Gesa, W., Göttfert, M., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., López-Baena, F.J.....	127
Fenotipo simbiótico de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103, NGR234 y mutantes afectados en el sistema de secreción tipo III (T3SS) con <i>Glycine soja</i>.	
Rodríguez-Navarro, D.N.* , López-Baena, F.J., Temprano-Vera, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Acosta-Jurado, S., Vinardell, J.M.....	129
Nodulación de <i>Calicotome villosa</i> en suelos desérticos asistida por PGPBs.	
Bessadouk, K., Navarro-Torre, S., Pajuelo, E., Caviedes M.A., Fterich, A., Mars, M., Rodríguez-Llorente, I.D.*.....	132
El gen <i>nodD2</i> de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 reprime la transcripción de los genes de nodulación y está involucrado en la especificidad de nodulación.	
Ruiz-Sainz, J.E.* , Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Carvajal, M.A., Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M.....	134
Comportamiento simbiótico de ecotipos de <i>Glycine soja</i> procedentes de diversas regiones de China, Japón, Corea y Rusia con <i>Sinorhizobium fredii</i> y <i>Bradyrhizobium</i> sp.	
Temprano-Vera, F.* , Rodríguez-Navarro, D.N., Acosta-Jurado, S., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M.	136
El gen <i>syrM</i> de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 es un regulador global que actúa tanto en presencia como en ausencia de flavonoides inductores y cuya mutación permite la nodulación efectiva de <i>Lotus japonicus</i>.	
Vinardell, J.M.* , Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Alías-Villegas, C., Almozara, A., Medina, C., Rodríguez-Carvajal, M.A., López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E.....	138
Mutantes en genes reguladores de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 que inducen nódulos fijadores de nitrógeno en judía.	
Buzón, P.* , del Cerro, P., Ayala-García, P., Almozara, A., Navarro-Gómez, P., Alías-Villegas, C., Acosta-Jurado, S., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Ollero, F.J.	140
Use of <i>Rhizobium tropici</i> 899 metabolites in a consortium with soybean and wheat inoculants in Brazil.	
Bomfim, C.A.* , Reis Junior, F.B., Vale, H.M.M., Megías, E., Ollero, F.J., Megías, M.	142
Índice de autores.....	144

COMUNICACIONES ORALES

Sesión I: Diversidad y ecología de microorganismos asociados a plantas.

Moderadora: Esther Menéndez Gutiérrez.

Evolución genómica de morfotipos espontáneos en colonias de *Bacillus cereus*.

Díaz-Martínez, L.^{1*}, Antequera-Gómez, M.L.¹, de Vicente, A.², Romero, D.^{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. *luisdiaz@uma.es

Bacillus cereus es una bacteria patógena de humanos capaz de transmitirse a partir de la ingesta de alimentos contaminados causando importantes brotes de intoxicación alimentaria. La persistencia a través de la generación de *biofilm* y colonización de esta bacteria en frutos y vegetales supone un grave problema en la industria médica y alimentaria. Estudios previos sobre modelos como *Pseudomonas sp.* o *Bacillus subtilis* revelan que, durante la evolución en entornos estructurados como estos *biofilms*, las poblaciones isogénicas tienden a diversificarse en variantes fenotípicas genéticamente distintas (morfotipos). Estas variantes pueden adquirir y desarrollar nuevos tipos de interacciones que influyen en gran medida en la interacción con el resto de la población. Estudios previos en nuestro laboratorio han confirmado la aparición de mutantes espontáneos en las fracciones más externas de colonias de la cepa emética de *B. cereus* crecida en medio de movilidad *swarming* de forma recurrente. Este mutante da lugar a una colonia con morfología totalmente diferente y mayor capacidad de movilidad, originando un “punto de fuga” del *biofilm*. Estos morfotipos también fueron hallados *in vivo* en la superficie de hojas de melón en inoculaciones realizadas en el laboratorio.

La aparición de este tipo de mutantes ha estado asociada tradicionalmente al hecho de que la diversificación evolutiva tiende a mejorar la productividad de los *biofilms*, ya que las variantes recién surgidas se especializan en ocupar diferentes nichos, reduciendo así la competencia. Pero la historia evolutiva a nivel genético de estos morfotipos aun presenta grandes lagunas de conocimiento.

Para profundizar en esta cuestión hemos desarrollado un flujo de trabajo llamado BacRiavility con el que se analizaron SNPs, recombinaciones, variantes estructurales, InDels y reorganizaciones genómicas de los diferentes morfotipos encontrados en placa y en plantas a partir de secuenciación masiva del genoma de diferentes morfotipos de colonias. Los resultados mostraron patrones comunes de mutaciones y cambios genómicos asociados a elementos de la matriz en todas las muestras analizadas.

Aislamiento y estudio metagenómico de un consorcio bacteriano para la biorremediación de diésel y aplicación en microcosmos.

Garrido-Sanz, D.^{1*}, Guirado, M.², Millán, R.², Redondo-Nieto, M.¹, Martín, M.¹, Rivilla, R.¹

¹Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Darwin 2, 28049. Madrid (Spain). ²Departamento de Medio Ambiente. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Avenida Complutense 40, 28040. Madrid (Spain). *daniel.garrido@uam.es

INTRODUCCIÓN

Los vertidos de hidrocarburos suponen un grave problema medioambiental debido al gran número de constituyentes tóxicos que contienen. El diésel es una mezcla compleja de alcanos e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) que varían considerablemente dependiendo de la fuente geográfica del petróleo crudo. La biorremediación del diésel se puede conseguir mediante el uso de comunidades bacterianas nativas, las cuales poseen distintos sistemas enzimáticos para la degradación de los diversos constituyentes del diésel. Además, el bioaumentación mediado por plantas puede incrementar la eficiencia en la degradación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante técnicas de cultivo por enriquecimiento sucesivo usando diésel como única fuente de carbono y energía, hemos aislado un consorcio bacteriano capaz de crecer también en hexano, heptadecano, tetracosano, fenantreno y naftaleno a partir de muestras originales de suelo rizosférico contaminado con diésel de barcos. DNA de toda la comunidad extraído del consorcio creciendo en diésel y en cada uno de los alcanos y PAHs fue usado para analizar la biodiversidad mediante secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA. Además, el metagenoma total de la comunidad creciendo el diésel se secuenció por medio de WGS para analizar la presencia de genes implicados en la degradación de los distintos constituyentes del diésel. Finalmente, el consorcio aislado durante este trabajo se usó en microcosmos de larga duración (4 meses) para analizar su capacidad real de biorremediación de suelos contaminados con diésel y el posible bioaumentación mediante fito-rizoremediación usando plantas de alfalfa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El consorcio bacteriano está compuesto principalmente por *Pseudomonas* (24.1%), *Aquamicrobium* (20.2%), *Chyseeobacterium* (17.8%), *Sphingobium* (6.5%) y otras bacterias de la familia *Sphingomonadaceae* (4.3%). El consorcio crecido con heptadecano y tetracosano muestran un predominio de *Pseudomonas* (88%), siendo la abundancia del resto de géneros inferior al 5%. En el caso de hexano, aunque *Pseudomonas* sigue siendo el género más abundante (62.4%), otros géneros como *Stenotrophomonas* (26.1%) y *Gordonia* (10.2%) también están representados. En el caso de PAHs, el consorcio creciendo en naftaleno está totalmente dominado por *Pseudomonas* (99.9%), mientras que en el caso del fenantreno, además de *Pseudomonas* (42.1%), bacterias pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae* son las más abundantes (46.7%). El metagenoma total del consorcio, muestra la existencia de alcano 1-monooxigenasas (AlkB), alcano monooxigenasas de larga cadena (LadA) y citocromos P450 de la familia CYP153, enzimas implicadas en la oxidación inicial de alcanos. La asignación taxonómica de estas enzimas es congruente con la presencia de *Pseudomonas* y *Sphingomonadaceae* en el consorcio. Respecto a PAHs, la enzima naftaleno 1,2-monooxigenasa ha sido previamente descrita por su implicación en numerosas reacciones de degradación,

incluyendo naftaleno, antraceno, fenantreno y fluoreno (Resnick *et al.*, 1996). Esta enzima se encuentra presente en el metagenoma nueve veces, siendo asignada principalmente a bacterias de la familia *Sphingomonadaceae*. Finalmente, resultados iniciales en microcosmos de larga duración muestran una reducción del 15.4% en TPHs (*total petroleum hydrocarbon*) en suelos inoculados una única vez con el consorcio aislado en este trabajo. Esta reducción se incrementa al 33.5% usando técnicas de fitorremediación con plantas de alfalfa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado mediante el proyecto BIO2015-64480-R de MINECO/FEDER EU y el proyecto BIOXISOIL (LIFE11/ENV/ES/000505). DG-S es el receptor de un contrato FPU (FPU14/03965).

BIBLIOGRAFÍA

Resnick, S., *et al.* (1996) J. Ind. Microbiol. 17:438-457.

Análisis de la diversidad microbiana en suelos de las marismas arroceras del Guadalquivir.

Ramírez-Moncayo, C., Álvarez, C., Alves-Martínez, P., Navarro, J.A., Hervás, M., Roncel, M., Ortega, J.M., Molina-Heredia, F.P., Mariscal, V.*

¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla, Sevilla, (España).

*vicente.mariscal@ibvf.csic.es

Las marismas arroceras del Guadalquivir comprenden la mayor área de cultivo de arroz de España, donde más de 40 000 ha se dedican al cultivo de este cereal básico para la alimentación de millones de familias. El cultivo de arroz requiere del aporte de fertilizantes nitrogenados y fosforados, para aumentar el rendimiento de las cosechas, y de unas técnicas agronómicas especiales, debido a que se cultiva por encharcamiento. Este método de cultivo provoca cambios físicos, químicos y biológicos en el suelo, con un marcado efecto beneficioso para el crecimiento y rendimiento del arroz, pero también genera serios problemas medioambientales en la región, debido al uso masivo de fertilizantes de síntesis química. El encharcamiento de los cultivos proporciona, además, un hábitat idóneo único, no sólo para el desarrollo de la avifauna, sino para el crecimiento de microorganismos fotótrofos como cianobacterias y microalgas, ya que cumple con sus requisitos de luz, agua, temperatura y disponibilidad de nutrientes.

En nuestro equipo hemos realizado muestreos de suelo de diferentes parcelas de cultivo de las marismas del Guadalquivir, con el fin de establecer la diversidad microbiana asociada a los arrozales. Las muestras se han analizado mediante dos aproximaciones experimentales diferentes. Por un lado, hemos analizado el microbioma de los suelos mediante secuenciación masiva. Este análisis ha permitido identificar cambios en poblaciones microbianas asociados a diferentes prácticas de cultivo y composición de suelo. Además, hemos utilizado métodos de microbiología clásica para el aislamiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Para su identificación hemos desarrollado una estrategia basada en la amplificación de una región polimórfica específica, que permite incluso la caracterización de las diferentes especies dentro de una mezcla heterogénea de microorganismos. Este estudio ha permitido aislar e identificar especies de cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico autóctonas de las marismas del Guadalquivir, que podrían ser utilizadas como bioinoculantes de cultivos de arroz.

Shifts on microbial communities in soils under Montado system: effects of dolomitic limestone-based amendments.

Menéndez, E.^{1*}, Brígido, C.¹, Igual, J.M.², Materatski, P.³, Alexandre, A.¹, Brito, I.¹, Alho, L.¹, Carvalho, M.¹

¹Laboratório de Microbiologia do Solo, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Pólo da Mitra, 7002-554 Évora (Portugal). ²Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca (España). ³Laboratório de Virologia Vegetal, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Pólo da Mitra, 7002-554 Évora (Portugal). *esthermenendez@uevora.pt

INTRODUCTION

Montado is an agrosilvopastoral system commonly found in Southern Iberian Peninsula and in Portugal is mainly located in the Alentejo region. These complex systems are adapted to poor soils and to Mediterranean climate, and include three main land uses: open evergreen forest, grazing and cultivation. In this system, forage legumes and grasses are routinely used as pasture improvers; however, their yields are usually low. Soil acidity and manganese toxicity limit crop productivity, possibly due to the constraints on the microbial symbiotic processes (Alho *et al.*, 2015). A strategy for improving annual plant production in the most representative Montado soils will be the establishment of permanent pastures in pH corrected soils by the application of dolomitic limestone-based amendments (Carvalho *et al.*, 2015).

Plants benefit from their in & out microbiota, which can shift under different conditions (Panke-Busse *et al.*, 2015). Previous works showed a considerable AMF diversity in soils containing excessive Mn levels, in which plant hosts drive the AMF community assembly and composition in their roots (Brígido *et al.*, 2017). Moreover, one work reported the isolation of rhizobial strains from soils under Montado with different plant growth promotion traits (N fixation, phytohormone and siderophore production) (Soares *et al.*, 2016). Despite all these efforts, Montado remains poorly explored at the microbiological omics level. Furthermore, how the application of nutrients (fertilizers/amendments) will contribute to soil microbial structure and its activity is still unknown. We hypothesize that the soil microbial community structure is influenced by the application of dolomitic limestone-amendment and by the establishment of legume plants. Thus, to understand and predict the impact of these strategies on soils under Montado ecosystem, we aim to monitorize shifts in belowground microbiome driven by application of chemical amendments and different legume hosts.

MATERIAL AND METHODS

Soil samples were collected in 2017/2018, the second year of a long-term chemical soil amendment assay located at Alentejo region (Portugal), consisting in a randomized block design with four replicas. To test the effect of dolomitic limestone, two treatments were set: no amendment and 4.5 Mg. ha⁻¹ of dolomitic limestone, applied once at the beginning of the experiment. To evaluate the effect of the different leguminous plants of the pasture seed mixes, rhizospheric soil from 3 different legume hosts was recovered. Soil biochemical properties were determined using standard protocols. Plots were sown with commercial pasture mixes (Fertiprado[®]). At the harvest time, dry weight matter values were recorded.

The evaluation of the total soil microbial community composition was performed by two methods: PLFA (phospholipid fatty acid) profiling and high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. PLFA analysis was performed following procedures described in

Pose- Juan *et al.* (2017). Identification and quantification of the fatty acids were performed using the Sherlock[®] 6.0 software (MIDI Inc., Newark, DE, USA).

For 16S rRNA amplicon sequencing, DNA from soil samples were extracted using DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen[®]) according to manufacturer's specifications. 16S rRNA amplicon (V4 region) were paired-end sequenced (2x250bp) on an Illumina MiSeq platform at the Nuomics DNA sequencing research facility of the Northumbria University (Newcastle, UK). Raw sequences were trimmed and processed using MOTHUR (Schloss *et al.* 2009) tool suite within the Galaxy platform. Chimeric sequences were removed from analysis and the remaining sequences were aligned and clustered with similarity of 97%. Rare OTUs containing one sequence were removed from further analyses. One representative sequence per OTUs was used to assign cluster taxonomy. For diversity analyses, all samples were subsampled (lowest number of sequences per sample).

Data analysis was performed using PRIMER v6 software package with the PERMANOVA add-on package. The PCA was performed to explore patterns in multidimensional data by reducing the number of dimensions with minimal loss of information. PERMANOVA was also used to partition variance in microbial community composition in relation to legume host species and dolomitic limestone amendment treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

The combination of two microbial profiling techniques allowed us to obtain a big snapshot of total microbial communities existing in the studied soils and the shifts in composition due to the different treatments and at different stages.

Our results revealed that microbial communities shifted with dolomitic limestone amendment and with the presence of a mixture of different legume hosts compared to the original microbiota structure that was present on these soils under native conditions. These findings contribute to understand which are the agricultural practices that allow the establishment of important specific groups of beneficial microorganisms, i.e. in which conditions AMF and/or rhizobia are predominant in those soils.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FEDER Portugal2020/Alentejo2020 project ALT20-03-0145-FEDER-000039 and the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) funds in the Strategic Project UID/AGR/00115/2013. CB acknowledges a FCT Post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/94751/2013).

REFERENCES

- Alho, L., *et al.* (2015) *Soil Use Manag.* 31:337-344.
- Carvalho, *et al.*, (2015) *Revista de Ciências Agrárias* 38:518-527.
- Panke-Busse, K., *et al.* (2015) *ISME J.* 9:980-989.
- Brigido, *et al.* (2017) *Soil Biol. Biochem.* 112:237-247.
- Soares, *et al.* (2016) In: *BNF and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer Academic Press, pp, 171-182.
- Pose-Juan, E. *et al.* (2017) *Front. Microbiol.* 8:378.
- Schloss, P.D., *et al.* (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7537-7541.

***Arthrocnemum macrostachyum* y su microbioma como herramienta en la fitorremediación de marismas contaminadas con metales pesados.**

Navarro-Torre, S.^{1*}, Barcia-Piedras, J.M.^{2,3}, Mateos-Naranjo, E.², Redondo-Gómez, S.², Caviedes, M.A.¹, Pajuelo, E.¹, Rodríguez-Llorente, I.D.¹

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. *snavarro1@us.es

INTRODUCCIÓN

A. macrostachyum es una planta halófila hiperacumuladora e hipertolerante al cadmio y podría ser usada como herramienta en fitorremediación (Redondo-Gómez *et al.*, 2010). Esta planta crece de manera natural en las marismas del Odiel, un ecosistema contaminado con altos niveles de metales pesados. La degradación de estos ecosistemas tiene consecuencias ecológicas, agrícolas y para la salud humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante este trabajo se aislaron las bacterias tanto de la rizosfera como del interior de los tejidos de plantas recolectadas de las marismas del Odiel. A las bacterias cultivables aisladas se le realizaron pruebas para ver su tolerancia a los metales más frecuentes en el área contaminada, su tolerancia a la sal, y su capacidad para producir propiedades que promueven el crecimiento de la planta (PGP). Posteriormente, se seleccionaron las mejores bacterias en función de la presencia de las características anteriores y se formaron dos consorcios: CR, compuesto por bacterias aisladas de la rizosfera, y CE, formado por los endofitos aislados. Por último, se estudió la germinación de las semillas y el crecimiento de plantas de *A. macrostachyum* en presencia de estos consorcios, usando como sustrato sedimentos provenientes de las marismas del Odiel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron un total de 48 bacterias y todas ellas pudieron crecer en presencia de metales pesados y sal. Al menos una de las principales propiedades PGP estuvo presente en todas las bacterias aisladas y se observaron altos valores de estas propiedades. La presencia de metales pesados en el medio afectó a la producción de las propiedades PGP por las bacterias. Los resultados obtenidos sugieren que estas bacterias podrían promover el crecimiento de las plantas incluso en presencia de metales pesados (Navarro-Torre *et al.*, 2016). En cuanto al desarrollo de las semillas y plantas, la inoculación bacteriana aceleró la germinación de las semillas tanto en presencia como en ausencia de metales pesados. También, ambos consorcios mejoraron la capacidad de *A. macrostachyum* para acumular iones en sus raíces y, además, se amortiguaron los niveles de toxicidad. Estos resultados sugieren que la inoculación de *A. macrostachyum* con las bacterias seleccionadas podría favorecer el establecimiento y el crecimiento de esta planta en marismas contaminadas y mejorar la eficiencia de la remediación (Navarro-Torre *et al.*, 2017).

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.

BIBLIOGRAFÍA

Redondo-Gómez, S., *et al.* (2010) *J. Hazard Mater.* 184:299-307.

Navarro-Torre, S., *et al.* (2016) *Marine Poll. Bull.* 110:133-142.

Navarro-Torre, S., *et al.* (2017) *Marine Poll. Bull.* 117:340-347.

Diversidad filogenética de los rizobios que nodulan *Spartocytisus supranubius* en el Parque Nacional del Teide.

Pulido-Suárez, L.^{*}, Medina-Cabrera, A., Pérez-Yépez, J., León-Barrios, M.

¹Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Universidad de La Laguna. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez, s/n. 38200. Tenerife (España). *slaurama@ull.es

INTRODUCCIÓN

La retama del Teide (*Spartocytisus supranubius*) es una especie arbustiva endémica de las cumbres de Tenerife y La Palma. Esta planta es la leguminosa dominante de la vegetación de alta montaña en el P. N. del Teide.

En la actualidad esta especie se encuentra amenazada debido al detrimento progresivo de sus poblaciones por varios motivos: la herbivoría por conejos es la principal causa de la casi ausencia de ejemplares jóvenes y la sequía podría explicar la mortalidad de los individuos adultos. Los análisis del suelo en este ecosistema muestran que el contenido en nitrógeno en el P.N. es muy bajo (Arbelo *et al.*, 2009). *S. supranubius* es capaz de aportar nitrógeno al ecosistema mediante el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios (FBN). La importancia de la FBN queda evidenciada por el hecho de que la concentración de este elemento es muy superior en zonas alrededor de retama (Wheeler & Dickson, 1990). Teniendo en cuenta que la FBN debe ser por lo tanto la principal entrada de nitrógeno en este ecosistema, la reducción de retamas causaría un déficit de este nutriente que afectaría a todo el ecosistema.

En este trabajo nos proponemos caracterizar la diversidad de rizobios capaces de nodular retama y estudiar si la alteración de las propiedades del suelo como consecuencia de las letrinas de conejos pueden afectarla. Se pretende además seleccionar aquellas cepas que presenten la mejor eficacia simbiótica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recolección de suelos y aislamiento de rizobios. Los rizobios se han aislado a partir de nódulos de plantas trampas crecidas en los suelos recogidos en las zonas de interés.
2. Análisis químicos de los suelos (servicio de análisis del IPNA-CSIC, Tenerife).
3. Estimación de las poblaciones de rizobios simbiotes de *S. supranubius*: mediante la técnica del cálculo del número más probable (NMP) (Somasegaran, P. & Hoben, H.J, 1994).
4. Caracterización taxonómica de los rizobios aislados mediante secuenciación del gen del ARNr 16S, *recA*, *glnII* y *gyrB* (Pérez-Yépez *et al.*, 2014).
5. Ensayos de infectividad y eficacia simbiótica (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los suelos y aislamiento de rizobios.

El NMP de rizobios (445-580 rizobios/g suelo), como cabía esperar, fue mayor en muestras de la rizosfera que en suelos controles (10-17 rizobios/g suelo). Asimismo, los suelos en el entorno rizosférico de retama son los que presentan un mayor contenido en nitrógeno total (0,23%), superando incluso al suelo bajo la acción de letrinas. Esto evidencia la importancia de la FBN como fuente de entrada de N al ecosistema.

Caracterización taxonómica.

Los rizobios aislados se clasificaron primero a nivel de género utilizando la filogenia obtenida de las secuencias del gen del ARNr 16S. Estos resultados mostraron que la mayoría de los microsimbiontes de retama pertenecen al género *Bradyrhizobium*. Otros géneros minoritarios fueron: *Bosea*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium* y *Agrobacterium*.

Con el fin de clasificarlos a nivel de especie, se caracterizaron representantes de los dos géneros mayoritarios, (*Bradyrhizobium* y *Bosea*) mediante un análisis de multilocus (MLSA) basado en la concatenación de tres genes: ARNr 16S, *recA* y *glnII* para aislados del género *Bradyrhizobium* y ARNr 16S, *recA* y *gyrB* para las cepas de *Bosea*. Los resultados de MLSA revelaron que *Bradyrhizobium canariense* es la especie que nodula mayoritariamente *S. supranubius*, mientras que un grupo menor de bradirizobios pertenecen a una especie aún no descrita.

Infectividad y eficacia simbiótica.

Los ensayos de infectividad en plántulas de retama demostraron que ambas especies de *Bradyrhizobium* son efectivas fijadoras de nitrógeno mientras que las cepas de *Bosea* no fueron capaces de reinfectar a su hospedador original.

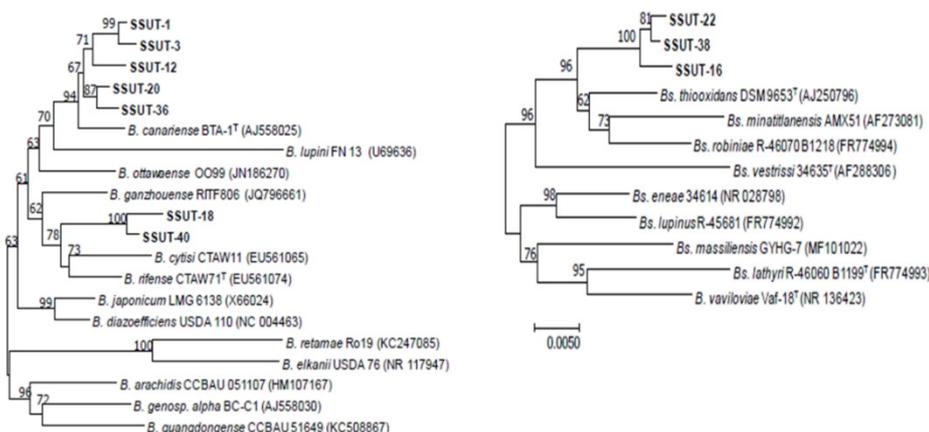


Figura 1. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en un concatenado de 3 genes (ARNr 16S, *recA*, *glnIII/gyrB*) de las cepas de *Bradyrhizobium* (izquierda) y *Bosea* (derecha).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con fondos de la Fundación Caja Canarias-La Caixa (Ref.: 2017REC13).

BIBLIOGRAFÍA

- Arbelo, C.D., *et al.* (2009) En: Proyectos de investigación en Parques Nacionales: 2005-2008. Ramírez L, Asensio B. (eds). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, pp, 43-71.
- Martínez-Hidalgo, P., *et al.* (2016) Plant Soil. 398:25-33.
- Pérez-Yépez, J., *et al.* (2014) Syst. Appl. Microbiol. 37:553-559.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1985) En: Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. Springer Verlag, Berlin, pp, 73-84.
- Wheeler, C.T. y Dickson, J.H. (1990) Vieraea 19:309-314.

**Sesión II: Interacciones microorganismos patógenos-plantas
(Microorganismos Patógenos 1).**

Moderadora: Dulce Nombre Rodríguez Navarro.

Análisis comparativo de dos colecciones de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* asociadas a mango

Aprile, F.* , Gutiérrez-Barranquero, J.A., Cazorla, F.M., de Vicente, A.
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC),
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. *april@uma.es

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas syringae es una bacteria ubicua a nivel ambiental, siendo además la bacteria patógena de plantas más estudiada a nivel mundial. Presenta una taxonomía compleja en la que se han descrito más de 60 patovares que causan enfermedad en muchas especies de plantas diferentes, tanto ornamentales como importantes desde el punto de vista agronómico, generando graves pérdidas económicas a nivel mundial. Entre los patovares más importantes se encuentra el pv. *syringae* debido a su amplio rango de hospedador, y al arsenal de mecanismos de virulencia que posee. A principios de los años 90, se describió a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) como el agente causal de la necrosis apical del mango (NAM), enfermedad que afecta a este cultivo en las principales áreas de clima mediterráneo distribuidas a nivel mundial. Pss aisladas de mango muestran características importantes para su biología, tanto en sus mecanismos de virulencia como para el *fitness* epifítico. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito que Pss aisladas de mango producen una toxina antimetabolito denominada mangotoxina (Arrebola *et al.*, 2003), implicada en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Además, se describió el operón *mbo* (*mangotoxin biosynthetic operon*) como el encargado de su biosíntesis (Carrión *et al.*, 2012). También han sido descritos genes diferentes implicados en la supervivencia y persistencia epifítica de las poblaciones de Pss sobre los cultivos de mango, como son el operón *wss*, implicado en la biosíntesis de celulosa y, por tanto, en la adhesión y formación de biofilm (Arrebola *et al.*, 2015), y los genes *cop* (*cop*ABCD y *cop*ABCD modificados) relacionados con la resistencia a compuestos cúpricos (Cazorla *et al.*, 2002; Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2013; 2017). Estudios fenotípicos, genéticos y filogenéticos apoyan que Pss aisladas de mango forman un filotipo diferenciado asociado principalmente con la producción de mangotoxina y a la adaptación a su hospedador (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2013; Carrión *et al.*, 2013). Con todos estos antecedentes, como objetivo principal de este trabajo, se plantea conocer en profundidad cómo han evolucionado las poblaciones de Pss a lo largo del tiempo sobre el mango, analizando cómo se verían afectados los principales mecanismos de adaptación y virulencia descritos. Por lo tanto, se va a llevar a cabo el estudio fenotípico, genético y de genómica comparativa de dos poblaciones de Pss de diferentes localizaciones geográficas y separadas en el tiempo (Colección I: años 90'/Colección II: 2016-2018).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ambas colecciones se han caracterizado desde el punto de vista fenotípico y genético en cuanto a sus características más relevantes implicadas en su fase patogénica y epifítica.

Análisis fenotípicos

Se han realizado bioensayos para detectar la producción de mangotoxina, basado en la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, y para detectar la producción de celulosa, mediante un ensayo de unión de este polisacárido a rojo congo. Además, se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el sulfato de cobre *in vitro*.

Análisis genéticos

Se ha llevado a cabo la detección y secuenciación por PCR de genes específicos implicados en cada una de las características analizadas anteriormente: *mboB*, para

mangotoxina, *wssE* de la celulosa y los genes *cop* responsables de la resistencia al cobre. Además se ha realizado un análisis de los perfiles plasmídicos para todas las cepas del estudio, junto con hibridación por *southern blot* para la detección de genes plasmídicos específicos como son *repA*, origen de replicación típico de plásmidos de la familia PT23A, *rulA*, implicado en resistencia a luz UV y para los genes *copABCD*.

También se ha analizado la filogenia de las cepas incluidas en este estudio, empleando secuencias parciales de dos genes *housekeeping* (*gyrB* y *rpoD*) utilizando el programa MEGA ver. 7.

Por último, se ha llevado a cabo la secuenciación de genomas completos de 20 cepas de Pss representativas de entre todas las cepas de estudio, empleando la plataforma NextSeq550 de Illumina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados a nivel de caracterización fenotípica y genética tras las pruebas ensayadas muestran pocas diferencias entre las dos colecciones, encontrando más variabilidad en cuanto a los determinantes de la resistencia a cobre, las CMI y a los perfiles plasmídicos. En cuanto a los análisis filogenéticos se observado que la distribución de las cepas de Pss aisladas de mango no depende de la época de aislamiento ni del origen geográfico, resultados que corroboran lo obtenido en trabajos anteriores (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2013). No obstante, se han observados algunos subgrupos característicos asociados con determinantes de resistencia a cobre.

Actualmente se está llevando a cabo el análisis de los genomas completos secuenciados de las 20 cepas seleccionadas, junto a nuestra cepa de referencia PssUMAF0158.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por ayuda de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (P12-AGR-1473), cofinanciados con fondos FEDER (UE).

BIBLIOGRAFÍA

- Arrebola, E., *et al.* (2003) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63:117-127.
Arrebola, E., *et al.* (2015) *FEMS Microbiol. Ecol.* 91:fiv071.
Carrión, V.J., *et al.* (2012) *PLoS ONE* 7(5):e36709.
Carrión, V.J., *et al.* (2013) *Appl. Environ. Microbiol.* 79:756-767.
Cazorla, F.M., *et al.*, (2002) *Phytopathology* 92:909-916.
Gutiérrez-Barranquero, J.A., *et al.* (2013) *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1028-1033.
Gutiérrez-Barranquero, J.A., *et al.* (2017) *BMC Genomics* 18:365.

Relevancia de la quimiopercepción durante el proceso de infección de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.

Cerna-Vargas, J.P.^{1*}, Santamaría-Hernando, S.¹, Hurtado-Rodríguez, A.¹, De Francisco-De Polanco, S.¹, Rodríguez-Herva, J.J.^{1,2}, Matilla, M.A.³, Rodríguez-Palenzuela, P.^{1,2}, Krell, T.³, López-Solanilla, E.^{1,2}

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 Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, UPM, 28040-Madrid, Spain. ³Departamento de Protección Ambiental, Estación experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Prof. Albareda 1, Granada, 18008, España. *jp.cerna@upm.es

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (*PsPto*) es una bacteria fitopatógena que puede sobrevivir como epífita en la superficie de las hojas sin causar enfermedad. Cuando las condiciones son favorables, entra a partir de aperturas naturales o heridas y se multiplica en el apoplasto activando mecanismos de virulencia e induciendo los síntomas asociados a la enfermedad. En esta situación, la supervivencia en la filosfera y la entrada en la planta son etapas críticas que determinan el alcance de la enfermedad. Una motilidad activa dirigida por procesos de quimiotaxis es esencial para promover la entrada en el apoplasto. La percepción de la luz es otro de los factores que determinan el cambio a un estilo de vida patogénico cuando las condiciones para la motilidad y la expresión de otros determinantes de virulencia son más favorables.

El principal objetivo de nuestra investigación es entender los mecanismos de percepción y respuesta de *PsPto* frente a las señales ambientales y de la planta en el desarrollo de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Clonación de dominio de unión a ligando en vectores de expresión de proteínas y purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel.
- Ensayos de unión a ligando mediante ensayos de capilares, Thermal shift e ITC.
- Generación de mutantes por single-crossover.
- Extracción de RNA de poblaciones epífitas y experimentos de hibridación de microarrays.
- Análisis de categorías funcionales.
- Comprobación de resultados de microarray mediante qRT-PCR

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hemos llevado a cabo la caracterización de un quimiorreceptor implicado en la percepción de D-Asp, L-Asp y L-Glu. La mutación de este quimiorreceptor produce una menor virulencia en plantas de tomate y una alteración en la formación de biopelículas bacterianas. Los resultados sugieren la función del quimiorreceptor en la percepción de la evolución de la población bacteriana ligada al control de mecanismos de virulencia durante el proceso de infección.

Además, estamos completando la caracterización de un quimiorreceptor implicado en la percepción de citrato, uno de los ácidos orgánicos más abundantes en el apoplasto de tomate. El mutante en este quimiorreceptor está severamente afectado en la entrada en plantas de tomate lo cual sugiere un papel relevante en la especificidad de la interacción de este patógeno con su planta huésped.

Por otro lado, para entender el papel de la luz como señal durante los estadios iniciales de la infección en *PsPto*, hemos llevado a cabo un análisis transcriptómico de poblaciones epífitas en hojas de tomate bajo diferentes condiciones de luz. Los resultados de este análisis se compararon con los de un análisis transcriptómico previo de bacterias cultivadas *in vitro* bajo las mismas condiciones de luz. Los resultados han mostrado que independientemente de la luz aplicada, los genes relacionados con la quimiotaxis presentan una mayor expresión en bacterias epífitas, poniendo de manifiesto el papel esencial de este mecanismo en la adaptación a la superficie de la hoja.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto AGL-2015-63851-R del Ministerio de Economía y Competitividad.

BIBLIOGRAFÍA

Santamaría-Hernando, S., *et al.* (2018) Environ. Microbiol. doi: 10.1111/1462-2920.14331.

Regulación global por la ruta Gac-rsm en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.

Ferreiro, M.D.* , Felipe, A., Gallegos, M.T.

¹Departamento de microbiología del suelo y sistemas simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Calle Profesor Albareda sn. 18008. Granada. (España). *m.ferreiro@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La ruta Gac-rsm es una ruta de regulación global que está presente en gamma-proteobacterias. 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 función. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pto DC3000) es una bacteria fitopatógena que infecta plantas de tomate, crucíferas y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En Pto DC3000, la ruta Gac-rsm controla virulencia, motilidad, producción de metabolitos secundarios, metabolismo del carbono y otros procesos en Pto DC3000 (Chatterjee *et al.*, 2003). Nuestro objetivo es dilucidar qué componentes de la ruta son cruciales para la fisiología de la bacteria y su interacción con la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una mutagénesis dirigida por intercambio alélico en distintos genes de la ruta, así como su sobreexpresión desde un vector. Los mutantes y sobreexpresantes fueron caracterizados fenotípicamente en motilidad, producción de exopolisacáridos y virulencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la expresión de los distintos CsrA mostró que las proteínas CsrA2, CsrA3 y CsrA5 son las más abundantes en los medios ensayados. Curiosamente, CsrA1-3 son los homólogos conservados dentro del género que habían sido anteriormente descritos como reguladores.

Las proteínas CsrA3 y, en menor medida CsrA2, alteran la expresión de genes pertenecientes a rutas importantes para la motilidad, síntesis de exopolisacáridos, crecimiento y virulencia. Hemos propuesto que la conexión entre el crecimiento y el desarrollo de síntomas en planta está controlada por CsrA3, que funciona como un regulador fundamental del modo de vida de Pto DC3000 reprimiendo la síntesis de factores de virulencia y promoviendo la división celular en respuesta a estímulos ambientales. Sin embargo, no hemos encontrado una función para CsrA1 en las condiciones ensayadas.

Con respecto a los ARNs *rsm*, la sobreexpresión de *rsmY* y *rsmZ* consiguió revertir el fenotipo *gacA*⁻ en motilidad y virulencia en planta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos BIO2014-55075-P y BIO2017-83533 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España cofinanciado con FEDER y por un contrato predoctoral FPU (ECD/1619/2013) otorgado a M.D.F. por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España. El grupo PAIDI BIO-180 pertenece al Campus Agrifood de excelencia internacional ceiA3.

BIBLIOGRAFÍA

Chatterjee, A., *et al.* (2003) Mol. Plant Microbe Interact. 16:1106-1117.
Ferreiro, M.D., *et al.* (2018) Mol. Plant Microbe Interact. 31:525-536.

Identificación bioinformática y análisis funcional de factores de transcripción de *Pseudomonas savastanoi* potencialmente implicados en la infección de *Mandevilla* spp.

Lavado-Benito, C.^{1*}, Martínez-Gil, M.¹, Rodríguez-Palenzuela, P.^{2,3}, 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 (Málaga). ²Centro de Biotecnología y Genómica de plantas. Universidad Politécnica de Madrid (UPM)-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Campus Montegancedo UPM, 28223-Pozuelo de Alarcón (Madrid). ³Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, UPM, 28040 (Madrid). *carlavado@uma.es

La bacteria fitopatógena *Pseudomonas savastanoi*, perteneciente al complejo *Pseudomonas syringae*, incluye cuatro patovares aislados de diferentes plantas leñosas: pv. *savastanoi* (olivo), pv. *nerii* (adelfa), pv. *fraxini* (fresno) y pv. *retacarpa* (retama). Recientemente, se ha caracterizado en nuestro grupo un nuevo patovar (Psm) causante de necrosis bacteriana en la planta ornamental dipladenia (*Mandevilla* spp.) (Caballo-Ponce, E, 2017, Tesis Doctoral). Estudios filogenéticos han demostrado la estrecha relación existente entre cepas del patovar *nerii* (Psn) y las aisladas de *Mandevilla* spp., aun cuando éstas difieren en el rango de huésped. En este trabajo hemos llevado a cabo un análisis bioinformático comparativo del repertorio de posibles factores de transcripción (Fts) codificados en los genomas de la cepa Ph3 de Psm y de las cepas de Psn ICMP16943 (capaz de infectar dipladenia y adelfa) y ESC23 (infecta solamente adelfa). La búsqueda se centró en aquellos Fts posiblemente implicados en la infección de dipladenia, es decir, Fts específicos de Psm Ph3 o comunes para las dos cepas que infectan dipladenia (Psm Ph3 y Psn ICMP 16943) y ausente Psn ESC23. Se seleccionaron un total de nueve posibles Fts: tres factores exclusivos de Psm Ph3, dos factores truncados exclusivamente en Psm Ph3 y cuatro factores ausentes tanto en Psn ICMP16943 como Psm Ph3. La ausencia/presencia o el truncamiento de los genes codificadores de estos factores se ha comprobado en estas y otras cepas de *P. savastanoi* mediante técnicas de PCR y secuenciación. De entre los TFs identificados, hemos seleccionado tres que forman parte de un posible operón junto a otros genes implicados en quimiotaxis. Se han construido mutantes de este operón en cada uno de los tres genes codificadores de los Fts seleccionados y en dos genes codificadores de *Methyl Chemotaxis proteins* (MCP). Actualmente estamos analizando el papel de estos genes en la patogenicidad en plantas de dipladenia y su implicación en quimiotaxis. Este trabajo pretende contribuir en el conocimiento de los determinantes genéticos implicados en la especificidad de huésped de los diversos patovares de la especie *P. savastanoi*.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el proyecto AGL2017-82492-C2-1-R (MINECO, FEDER).

Expresión heterogénea y colonización de la planta en *Pseudomonas syringae*.

López-Pagán, N.^{1*}, Sánchez-Romero. M.A.², Rufián, J.S.^{1,3}, Aussel, L.⁴, Casadesús, J.², Ruiz-Albert, J.¹, Beuzón, C.R.¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos s/n, Málaga, E-29071-Spain. ²Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. ³Shanghai Center for Plant Stress Biology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602, China. ⁴Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institute de Microbiologie de la Méditerranée, Aix-Marseille Université, Marseille, France. *nieves.lpg@uma.es

INTRODUCCIÓN

La heterogeneidad fenotípica se ha descrito en poblaciones clonales durante décadas. Bajo ciertos circuitos regulatorios, la heterogeneidad o ruido en la expresión génica puede dar lugar a un patrón de expresión bimodal en un ambiente homogéneo. Este proceso donde la población se divide en una subpoblación ON y una subpoblación OFF para la expresión de un determinado gen es conocido como biestabilidad. La relevancia de este proceso se ha demostrado en patógenos de animales durante la persistencia a antibióticos. Un fenómeno similar se ha observado en proteínas asociadas a virulencia, cuya reducción de la expresión se asocia con un incremento del fitness metabólico en células individuales. Dado que individuos no productores pueden beneficiarse de las proteínas de virulencia producidas por otros, la heterogeneidad fenotípica podría suponer una ventaja adaptativa para la población manteniendo la identidad genética de ésta. En *Pseudomonas syringae*, una bacteria fitopatógena Gram negativa, hemos observado que genes importantes para su virulencia muestran expresión heterogénea durante la colonización de la planta. Siendo este el primero caso descrito de heterogeneidad fenotípica en un huésped no animal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para analizar la expresión a nivel de célula individual se han generado fusiones transcripcionales en el cromosoma de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* a genes reporteros codificantes de proteínas fluorescentes. Los genes seleccionados fueron codificantes de diferentes elementos del sistema de secreción tipo III (T3SS) y la flagelina. Su análisis se ha llevado a cabo mediante técnicas de microscopía confocal y de citometría.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de genes del T3SS y del flagelo es heterogénea durante la proliferación en los espacios intercelulares de la hoja huésped. No obstante, en medio de inducción en el laboratorio, los genes del T3SS, pero no del flagelo, muestran expresión biestable que requiere división celular activa. Previamente hemos demostrado que las subpoblaciones que se forman durante la expresión biestable presentan diferencias fenotípicas respecto a virulencia. Asimismo, resultados previos de nuestro laboratorio indican un cierto grado de contra-regulación entre la expresión del T3SS y la motilidad flagelar. Mediante análisis de expresión de estos genes a nivel de célula individual, hemos confirmado que esta contra-regulación existe, pero no es todo o nada pudiéndose observar subpoblaciones que además de expresar uno u otro sistema, expresan ambos o ninguna.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a la financiación concedida por el Programa “Retos” del Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto BIO2015-64391R) a Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz-Albert, y la COST Action SUSTAIN (FA1208).

BIBLIOGRAFÍA

Ortiz-Martín, I., *et al.* (2010) *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:665-681.
Rufián, J.S., *et al.* (2016) *Environ. Microbiol.* 18:3593-3605.

Análisis genómico y transcriptómico de los efectores del sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335.

Moreno-Pérez, A.^{1*}, Rodríguez-Palenzuela, P.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. ²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Parque Científico y Tecnológico de la UPM, Madrid, Spain.
*albamp@uma.es

La especie *Pseudomonas savastanoi* pertenece al complejo *Pseudomonas syringae*, el cual está constituido por un conjunto de bacterias fitopatógenas Gram (-) de alto interés agrícola y económico. Dentro de esta especie se han descrito hasta la fecha cuatro patovares capaces de infectar huéspedes leñosos: pv. *savastanoi* (aislados de olivo), pv. *nerii* (aislados de adelfa), pv. *fraxini* (aislados de fresno) y pv. *retacarpa* (aislados de retama). La cepa NCPPB 3335 del patovar *savastanoi* (Psv), establecida como modelo para el estudio de la interacción de *Pseudomonas* patógenas con plantas leñosas, es el agente causal de la tuberculosis del olivo, enfermedad caracterizada por la aparición de tumores en las partes aéreas de la planta. Uno de los factores de patogenicidad de Psv más relevante es el sistema de secreción tipo III (T3SS) y su repertorio de efectores (T3E). La disponibilidad de la secuencia de Psv NCPPB 3335 nos ha permitido la predicción bioinformática de los genes que codifican su T3SS y su repertorio de T3E en base a la homología con otros efectores previamente descritos. Esta cepa presenta un repertorio de efectores constituido por 28 T3E. Con el objetivo de analizar la expresión del repertorio de T3E en Psv, se ha llevado a cabo un análisis RNAseq comparativo entre la cepa silvestre Psv NCPPB 3335 y un mutante de la misma del gen *hrpL*, el cual codifica un activador transcripcional de los genes del T3SS y de la mayoría de sus T3E. Las secuencias procedentes de este RNAseq se están analizando actualmente y los resultados que se obtengan del mismo nos permitirá no sólo analizar la expresión de los T3E que hemos identificado en esta cepa, sino también caracterizar el regulón HrpL completo en la misma y quizás identificar nuevos posibles T3E. Los resultados obtenidos, se compararán con una predicción de promotores regulados por HrpL (*hrp-box*), que se llevará a cabo utilizando una herramienta bioinformática generada por nuestro equipo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2017-82492-C2-1-R (MINECO-FEDER).

**Sesión III: Interacciones microorganismos patógenos-plantas
(Microorganismos Patógenos 2).**

Moderador: Pablo Rodríguez Palenzuela.

Análisis bioinformático de los sensores de quimioatracción en bacterias fitopatógenas.

Rodríguez-Palenzuela, P.^{2,3*}, Sánchez-Colmenero, J.², Del Hoyo, D.³, Cerna-Vargas, J.P.², Santamaría-Hernando, S.², Ramos, C.¹, López-Solanilla, E.^{2,3}

¹Área de Genética, Facultad de Ciencias, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga, E-29071, Spain. ²Centro 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 Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid, 28223, Spain. ³Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Avenida Complutense, 3, Madrid, 28040, Spain. *pablo.rpalenzuela@upm.es

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son capaces de percibir cambios en la concentración de algunos compuestos relevantes y modificar su movimiento con el resultado de acercarse o alejarse de la zona donde se encuentran tales moléculas. La quimiotaxis se inicia mediante la unión de una molécula quimiorreceptora (también denominada *methyl accepting chemotaxis protein*, MCP) con el compuesto correspondiente, lo que inicia una cadena de transducción de señal que termina con el control del flagelo bacteriano. Se ha demostrado que esta capacidad de moverse y navegar por el entorno de la planta es un componente esencial de la virulencia en diversas interacciones planta-bacteria (Antúñez-Lamas *et al.*, 2009).

La proliferación de genomas bacterianos secuenciados en los últimos años ha permitido abrir nuevas aproximaciones bioinformáticas en el estudio de la interacción bacteria-planta. En nuestro grupo hemos desarrollado herramientas que permiten el análisis automático de sistemas de secreción (Martínez García *et al.*, 2105), y de factores de patogenicidad presentes en un genoma dado (Martínez-García *et al.*, 2016). (<http://bacterial-virulence-factors.cbgp.upm.es/PIFAR>); así mismo, hemos empleado técnica de aprendizaje automático supervisado para predecir la capacidad bacteriana de interacción con plantas (Martínez-García *et al.*, 2016).

El objetivo concreto de esta investigación ha sido desarrollar una herramienta bioinformática que permita analizar los quimiorreceptores de los genomas bacterianos con objeto de hacer predicciones sobre su relevancia en patogénesis, de modo que se generen hipótesis comprobables experimentalmente. Adicionalmente, estamos utilizando los perfiles de quimiorreceptores generados para construir clasificadores mediante Aprendizaje Automático que permitan realizar predicciones sobre la virulencia/estilo de patogenicidad de la bacteria a partir de datos genómicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La herramienta *MCP-analyzer* se ha desarrollado como un método perteneciente a un objeto *MyGenomes* en OOP y puede ejecutarse de forma aislada o combinada con el uso de una base de datos MySQL a la que se accede mediante un módulo DBI. Dicha herramienta emplea HMMER para identificar MCPs, seguidamente analiza los dominios Pfam que se encuentren en las MCPs identificadas y realiza la predicción de segmentos trans-membraba mediante los algoritmos TMHMM y Memsat. Finalmente procede a la extracción del LBD empleando reglas *ad hoc*. El *output* es doble: se obtienen la secuencia de los *Ligand Binding Domains* en formato FASTA y la “fórmula” de la MCP, que muestra los dominios presentes y las TMs, empezando por el N-terminal. El análisis de las LBDs se realiza con un pipeline de PERL que combina: a) la suite BLAST; b) una función *ad hoc* que obtiene y analiza los vectores filogenéticos a partir del NCBI y c) un

programa de que investiga si una bacteria dada tiene una interacción de tipo patógeno con plantas, combinando la información procedente de: 1) los atributos del genoma; 2) la bases datos de interacciones bióticas (<https://www.globalbioticinteractions.org/>) y 3) un programa *ad hoc* escrito en PERL que analiza de forma semántica los abstracts relacionados y obtenidos en PubMed.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha aplicado la herramienta MCP-analyzer sobre un conjunto de aproximadamente 40 genomas bacterianos elegidos por su importancia agronómica. El análisis de los LBD dio como resultado 78 conjuntos de dominios “ortólogos” (en los que la similitud de secuencia entre ellos es de al menos el 66%) y que están presentes predominantemente en bacterias fitopatógenas (al menos el 75% de las especies son fitopatógenas). Dada la similitud de secuencia dentro de cada grupo puede suponerse que todas tienen la misma función. Este conjunto de secuencias permite establecer un punto de partida para una caracterización de los quimiorreceptores adaptados al ambiente vegetal. Debe destacarse la presencia de cuatro grupos filogenéticamente muy diversos, que incluyen la mayoría de las especies de bacterias fitopatógenas importantes. Por otro lado, se han encontrado algunos grupos altamente específicos que parecen en una sola especie o un conjunto limitado de éstas, los cuales podrían estar implicados en la especificidad de hospedador. En la actualidad estamos dedicados a la construcción de clasificadores mediante técnicas de Aprendizaje Automático, con el objetivo de utilizar el perfil de LBDs como signatura para la clasificación de genomas en fitopatógenas/no fitopatógenas, así como para distinguir bacterias con diferentes estilos de patogenicidad (p.e hemibiotrofos vs macerógenos).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a los proyectos AGL2017-8249-C2-1-R y AGL2015-63851-R

BIBLIOGRAFÍA

- Antúñez-Lamas, M., *et al.* (2009) Mol. Microbiol. 74:662-671.
Martínez-García, R., *et al.* (2015) PLoS One 10:e0132261.
Martínez-García, R., *et al.* (2016) Environ. Microbiol. 18:4847-4861.

Nuevas secuencias codificantes ignoradas hasta la fecha podrían jugar un papel clave en el desarrollo de *Podosphaera xanthii*.

Grifé-Ruiz, M.^{*}, de Vicente, A., Pérez-García, A.

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"-Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). *0619821671@uma.es

Podosphaera xanthii es un hongo biotrofo obligado y el principal agente causante del oídio de las cucurbitáceas, enfermedad que provoca grandes pérdidas económicas cada año en España y en otros países productores. Hasta el momento, el control químico de la enfermedad ha resultado ser la herramienta más eficaz, aunque la aparición de aislados resistentes a las principales clases de fungicidas ha generado la necesidad de buscar alternativas y nuevas dianas para luchar contra este agente fitopatógeno.

Con el objetivo de identificar nuevas dianas, partiendo de los perfiles transcriptómicos tanto haustorial como epifítico de *P. xanthii* previamente realizados en nuestro laboratorio, se han seleccionado secuencias desechadas en un principio por no presentar anotación ni siquiera como proteínas hipotéticas. Estas secuencias, sin embargo, mantenían un sitio de unión al ribosoma, un marco abierto de lectura y el mismo patrón codificante que el resto de las secuencias anotadas. Además, estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio han validado funcionalmente algunas de ellas, verificando su expresión durante el proceso infectivo y su necesidad para el correcto desarrollo del hongo. Todo esto hace pensar que son secuencias codificantes presentes solo en *P. xanthii* y en otros hongos fitopatógenos cercanos. Estas secuencias han sido denominadas PNPCG (*Podosphaera* new protein-coding genes).

Para conocer la posible función de dichas proteínas, en primer lugar, llevamos a cabo un análisis *in silico* detallado de las proteínas que incluye modelado 3D, predicción de posibles ligandos e identificación de dominios funcionales. En segundo lugar, una vez identificadas funciones de interés, llevamos a cabo experimentos de silenciamiento génico para la identificación de proteínas clave para la patogénesis de *P. xanthii*. El modelado proteico de algunas de estas nuevas secuencias ha revelado la presencia de posibles inhibidores de enzimas de la planta relacionadas con la resistencia a hongos fitopatógenos. En esta reunión se presentarán los resultados obtenidos hasta la fecha. Nuestra hipótesis es que estas nuevas secuencias ignoradas hasta la fecha, podrían ser clave en la búsqueda de nuevas dianas exclusivas para el control de oídios.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por una ayuda del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad (AGL2016-76216-C2-1-R), cofinanciada por fondos FEDER (UE).

Fenotipado del oídio en cucurbitáceas mediante técnicas de imagen.

Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M. *, Barón, M.

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. *m.pineda@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Los patógenos causan alteraciones en el metabolismo primario y secundario de las plantas hospedadoras, que conducen a descensos significativos en la calidad y producción de los cultivos. *Podosphaera xanthii* es el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas y, por tanto, uno de los mayores factores limitantes en la producción de estos cultivos en el mundo (Pérez-García *et al.*, 2009). Los cambios en la fisiología de las plantas infectadas pueden estudiarse a través de técnicas de imagen que suministran información sobre diferentes procesos que tienen lugar en los vegetales, proporcionando “firmas de estrés” que son específicas de cada interacción planta-patógeno (Barón *et al.*, 2016). Por tanto, estas técnicas ya se aplican de forma rutinaria en la agricultura de precisión y el fenotipado vegetal (Mahlein, 2016). En combinación con las herramientas matemáticas que proporciona el *machine learning*, los datos obtenidos mediante estas técnicas sirven para calcular algoritmos capaces de clasificar plantas en infectadas o sanas, incluso en ausencia de síntomas (Behmann *et al.*, 2015).

En este trabajo hemos estudiado los cambios metabólicos causados por *P. xanthii* en plantas cucurbitáceas de gran interés agronómico en Andalucía, como son el melón y el calabacín. Los cambios en transpiración se han monitorizado mediante termografía de imagen, la fluorescencia roja de la clorofila (Chl-FI) proporcionó información sobre los procesos fotosintéticos, mientras que la fluorescencia multicolor (MCFI) reveló alteraciones en el metabolismo secundario de las plantas infectadas. Diferentes modelos matemáticos fueron capaces de proporcionar un alto rendimiento de clasificación entre plantas sanas e infectadas (Pérez-Bueno *et al.*, 2016; Pineda *et al.*, 2017).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas de melón de tres semanas de edad se inocularon en la segunda hoja mediante spray usando una suspensión de 10^6 esporas/ml de *P. xanthii*. Para la inoculación de calabacín se procedió a depositar acúmulos de esporas en cuatro puntos diferentes de la segunda hoja desarrollada. Las medidas mediante técnicas de imagen se realizaron a 1 y 3 días postinoculación (dpi) en el caso del melón, y a 1, 3 y 7 dpi en el caso del calabacín. Para las medidas termales se usó una cámara FLIR A305sc (FLIR Systems, Wilsonville, OR, Estados Unidos); las medidas de Chl-FI se llevaron a cabo mediante el FluorCam 700MF (PSI, Brno, Chequia) y las de MCFI se recogieron con la ayuda del FluorCam 800-O (PSI). Para los análisis estadísticos y el desarrollo de algoritmos clasificatorios se empleó el software SPSS 23.0 acoplado a R (IBM Corporation, Armonk, NY, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas de melón inoculadas con el hongo mostraron un descenso de temperatura, y por tanto, una mayor transpiración desde 1 dpi, cuando el micelio aún no es visible. La fotosíntesis, medida como el rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}) también disminuyó desde 1 dpi, a la vez que la disipación de la energía no usada en fotosíntesis (NPQ) aumenta para evitar el daño fotoinhibitorio (lo que se refleja en la ausencia de cambios del parámetro F_v/F_m). Sin embargo, no se detectaron cambios en la emisión de fluorescencia azul y verde proveniente de compuestos del metabolismo secundario. De

estos resultados puede deducirse que la planta está tratando de limitar la disponibilidad de carbono para el hongo mediante el descenso de la fotosíntesis (Bolton, 2009); sin embargo, el hongo podría estar inhibiendo el metabolismo secundario de la planta para evitar la formación de compuestos defensivos, al igual que ocurre en plantas de cebada infectadas con *Blumeria graminis* (Swarbrick *et al.*, 2006).

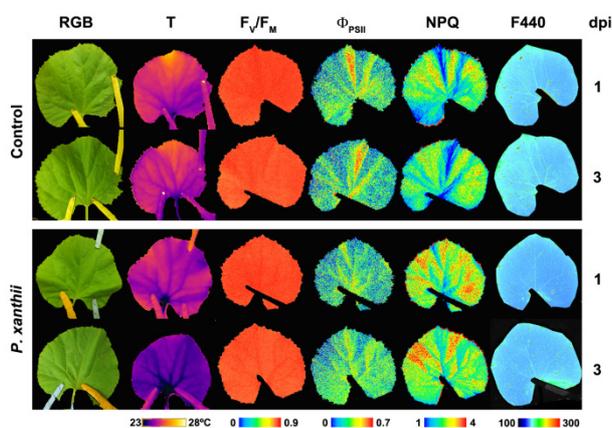


Figura 1. Imágenes de hojas de melón controles e inoculadas con *P. xanthii* obtenidas mediante diferentes técnicas. RGB: imágenes fotográficas; T: imágenes termales; F_v/F_m , Φ_{PSII} y NPQ: imágenes provenientes de la Chl-FI (máximo rendimiento cuántico del fotosistema II, rendimiento cuántico del fotosistema II y quenching no fotoquímico, respectivamente); y F440 (fluorescencia azul), obtenida mediante MCFI. Dpi: días postinoculación.

En cambio, las plantas de calabacín infectadas con acúmulos de *P. xanthii* sí mostraron un aumento de fluorescencia verde y azul, posiblemente relacionada con las paredes celulares del hongo. El cociente entre la fluorescencia verde y la roja (F520/F680) fue útil para entrenar algoritmos (redes neuronales, regresiones logísticas binarias y máquinas de vectores de soporte) que fueron capaces de clasificar nuevas muestras con alta precisión (Pineda *et al.*, 2017).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto CICE-Junta de Andalucía (P12-AGR-0370), y los fondos FEDER / Ministerio de Economía y Competitividad-CSIC (RECUPERA 2020/ 20134R060).

BIBLIOGRAFÍA

- Barón, M., *et al.* (2016) Z. Naturforsch. C. 71:355-368.
 Behmann, J., *et al.* (2015) Precis. Agric. 16:239-260.
 Bolton, M.D. (2009) Mol. Plant Microbe Interact. 22:487-497.
 Mahlein, A.-K. (2016) Plant Dis. 100:241-251.
 Pérez-Bueno, M.L., *et al.* (2016) Front. Plant Sci. 6:1209.
 Pérez-García, A., *et al.* (2009) Mol. Plant Pathol. 10:153-160.
 Pineda, M., *et al.* (2017) Funct. Plant Biol. 44:563-572.
 Swarbrick, P.J., *et al.* (2006) Plant Cell Environ. 29:1061-1076.

Proteínas secretadas por el haustorio y su importancia en el desarrollo de *Podosphaera xanthii*.

Polonio, A.^{1*}, El-Azaz, J.², Fernández-Ortuño, D.¹, de Vicente, A.¹, Pérez-García, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM–UMA–CSIC). ²Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. *polonio@uma.es

El cultivo de las cucurbitáceas en España se ve afectado, entre otros problemas, por *Podosphaera xanthii*, un hongo biotrofo obligado y principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas. Este hongo, que requiere células vivas de la planta para completar su ciclo de vida asexual, desarrolla unas estructuras especiales de parasitismo denominadas haustorios. Los haustorios prosperan dentro de las células epidérmicas y son responsables de la relación directa entre el patógeno y el hospedador, participando en la absorción de nutrientes de la planta y en la liberación de efectores en las células del huésped.

Dada la estrecha relación entre los haustorios y las células vegetales, desarrollamos un transcriptoma haustorial *de novo* de *P. xanthii* y definimos su secretoma con la intención de encontrar proteínas secretadas que sean esenciales para la patogénesis. De esta manera pudimos identificar diferentes proteínas, la mayoría de ellas sin función anotada, expresadas específicamente en el haustorio. Gracias al modelado proteico obtuvimos información relevante sobre la posible función de alguna de estas proteínas secretadas sin anotación funcional y seleccionamos varias para su validación funcional mediante silenciamiento génico en el hospedador mediado por *Agrobacterium* (ATM-HIGS). Además, la expresión heteróloga de las proteínas seleccionadas y los subsecuentes ensayos enzimáticos nos ha permitido corroborar su actividad bioquímica predicha. Así, pudimos comprobar cómo proteínas secretadas específicamente por el haustorio son muy importantes para el desarrollo fúngico.

Este abordaje multidisciplinar nos ha permitido identificar y dilucidar la función de proteínas esenciales para *P. xanthii* que, dado su papel clave, se convierten en dianas esperanzadoras para el desarrollo de nuevo fitosanitarios contra el oídio de las cucurbitáceas y otros hongos fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-41939-R; AGL2016-76216-C2-1-R) cofinanciado con fondos FEDER (UE). Álvaro Polonio es beneficiario de un contrato predoctoral (BES-2014-068602) para la formación de doctores del Ministerio de Economía y Competitividad.

Búsqueda de diana en *Podosphaera xanthii* para el desarrollo de nuevas fitoterapias antifúngicas.

Ruiz-Jiménez, L.* , Fernández-Ortuño, D., de Vicente, A., Pérez-García, A.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”-Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Bulevar Louis Pasteur 31, 29010 Málaga.

*laura110493@uma.es

La resistencia a fungicidas es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la agricultura del siglo XXI, y esto es especialmente patente en el caso de los oídios, hongos fitopatógenos biotrofos obligados que requieren células vivas para completar su ciclo de vida. Infectan hojas, tallos, flores y frutos de plantas económicamente importantes llegando a ser uno de los grupos de fitopatógenos de mayor relevancia en el sector agrícola. En España y en las principales áreas productoras del mundo, el oídio de las cucurbitáceas es una amenaza muy grave, y *Podosphaera xanthii* es considerado como el principal agente causante de la enfermedad. Hasta la fecha, la aplicación de fungicidas y el uso de variedades resistentes son las principales herramientas para el control de la enfermedad. Otras herramientas como el control biológico todavía están lejos de su implantación práctica. En cualquier caso, el oídio sigue imponiendo serias limitaciones en la producción agrícola, siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias de control. En este estudio se pretende proporcionar información sobre las bases moleculares de *P. xanthii* que pueda ser de utilidad para el desarrollo de nuevas herramientas de fitoprotección. Para lograr este objetivo, estamos centrando nuestra atención en un conjunto de proteínas fúngicas carentes de función, determinado en un estudio anterior. Ante la falta de homología con proteínas funcionalmente anotadas, para conocer la posible función de dichas proteínas, en primer lugar, llevamos a cabo un análisis *in silico* detallado de las proteínas que incluye modelado 3D, predicción de posibles ligandos e identificación de dominios funcionales. En segundo lugar, para la identificación de proteínas clave para la patogénesis de *P. xanthii*, silenciaremos proteínas del hongo con función predicha bioinformáticamente mediante silenciamiento génico inducido por hospedador (HIGS) empleando *Agrobacterium tumefaciens* como vector para la expresión transitoria de construcciones de silenciamiento en células de melón, y desde ellas, al hongo diana. Finalmente, las proteínas con un fenotipo claro de silenciamiento serán seleccionadas para la caracterización de su actividad biológica. En este congreso se mostrarán los resultados más relevantes obtenidos hasta la fecha, relativos a la asimilación de azufre.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por una ayuda del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad (AGL2016-76216-C2-1-R), cofinanciada con fondos FEDER (UE).

Monitorización de aislados resistentes a los fungicidas MBC en *Podosphaera xanthii*, oídio de cucurbitáceas, utilizando la técnica LAMP.

Vielba-Fernández, A.^{1,2*}, de Vicente, A.^{1,2}, Pérez-García, A.^{1,2}, Fernández-Ortuño, D.^{1,2}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España.

²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"-Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, España. *avielba@uma.es

El oídio, causado por el hongo biotrofo *Podosphaera xanthii*, es una de las enfermedades más importantes que afectan a los cultivos de cucurbitáceas en España. El control de esta enfermedad es principalmente químico, a través del uso continuado de fungicidas durante la campaña de cultivo; sin embargo, la rápida aparición de resistencias, por parte del patógeno, a estos compuestos es un hecho bien conocido, lo que dificulta el manejo de la enfermedad. En estudios previos, se detectaron altos niveles de resistencia a los fungicidas Metil Benzimidazol Carbamatos (MBC) en la población española de *P. xanthii*. La resistencia fue debida al cambio aminoacídico E198A en β -tubulina, diana de estos fungicidas. Para llevar a la práctica una agricultura más sostenible y productiva en el cultivo de cucurbitáceas, se hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan reducir el número de aplicaciones de fungicidas y que optimicen los programas de aplicación para cada finca. En este estudio se ha usado por primera vez en el oídio de cucurbitáceas, la técnica LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle) para distinguir de forma rápida y fiable el genotipo mutante A198 en *P. xanthii*. Nuestros resultados han demostrado que la técnica LAMP es un método específico y reproducible que puede ser usado para monitorizar la resistencia a fungicidas MBC en *P. xanthii* en campo, proporcionando información exacta para cada finca analizada, y permitiendo a cada agricultor ajustar sus programas de aplicación de fungicidas antes de la pérdida de la cosecha.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por AGL2016-76216-C2-1-R.

**Sesión IV: Interacciones microorganismos patógenos-plantas
(Microorganismos Patógenos 3)/Interacciones microorganismos
patógenos-plantas (Microorganismos Beneficiosos 1)**

Moderador: Cayo Ramos Rodríguez.

Caracterización funcional del efector AopW1 secretado a través del Sistema de Secreción de Tipo 3 de la bacteria fitopatógena *Acidovorax citrulli*.

Jiménez-Guerrero, I.^{1,2*}, Sonawane, M.², Mateus Da Silva, G.², Pérez-Montaño, F.¹, Ollero, F.J.¹, Burdman, S.²

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

²Department of Plant Pathology and Microbiology, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot (Israel). *ijimgue@us.es

INTRODUCCIÓN

Las bacterias patógenas de plantas emplean el Sistema de Secreción de Tipo 3 o T3SS (del inglés, Type 3 Secretion System) para translocar proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedadora. Estos efectores promueven la virulencia mediante la alteración del metabolismo de la célula eucariota y/o de la supresión de las respuestas de defensa del hospedador (Alfano y Collmer, 2004; Bogdanove *et al.*, 1996).

Acidovorax citrulli es una bacteria Gram negativa responsable de la mancha bacteriana del fruto, enfermedad que afecta a plantas cucurbitáceas y que supone un alto riesgo para los cultivos de melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Citrullus lanatus*) a nivel mundial (Burdman y Walcott, 2012). En base a ciertas características genéticas, bioquímicas y al rango de hospedador, las poblaciones de estirpes de *A. citrulli* se dividen en dos grupos principales: grupo I, que incluye estirpes aisladas del melón y de otras cucurbitáceas (no de sandía), siendo moderada o altamente agresivas sobre un amplio rango de cucurbitáceas; y grupo II, compuesto por estirpes que son altamente agresivas en sandía y que fueron aisladas principalmente de planta (Burdman *et al.*, 2005; Eckshtain-Levi *et al.* (2016). El análisis de la secuencia de los genes que codifican efectores del T3SS de una población global de estirpes de *A. citrulli* reveló que estos dos grupos difieren uno del otro según el repertorio de efectores y sus secuencias (Eckshtain-Levi *et al.*, 2016).

MATERIAL Y MÉTODOS

La extracción de proteínas extracelulares de *A. citrulli* se realizó mediante la precipitación con acetona (Krishnan y Pueppke, 1993). Los ensayos de translocación se llevaron a cabo mediante el sistema reportero Bs2-*X. euvesicatoria* AvrBs2 (Teper *et al.*, 2016). Los ensayos de virulencia se realizaron a través de la infiltración de las estirpes parentales de *A. citrulli* representantes de los grupos I y II y mutantes derivados afectados en el gen *aopW1* en hojas de melón y sandía, respectivamente. Posteriormente, se realizó un recuento de colonias a través de la extracción de discos de 1 cm. Los ensayos *in vitro* para comprobar la actividad de despolimerización de los filamentos de actina se realizaron mediante el uso del kit G-Actin/F-actin In Vivo Assay Biochem (Cytoskeleton, Inc). La expresión de AopW1 en hojas de *N. benthamiana* se llevó a cabo mediante la fusión de *aopW1* en el plásmido binario pEarlyGate 101 y la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Roden *et al.*, 2004). Para el estudio del tráfico vesicular se expresó junto a AopW1 diferentes marcadores moleculares de la planta (plásmidos cedidos por la Dra. Maya Bar, Volcani Center, Israel).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios preliminares demostraron que AopW1 de *A. citrulli* se secreta y se transloca a través del T3SS y, por lo tanto, es una proteína efectora. Asimismo, el análisis de la secuencia de *aopW1* reveló que este gen se encuentra altamente conservado entre los dos

grupos de estipes, con la excepción de una región de 138 pb, denominada región hipervariable, localizada entre las posiciones 439 y 576. Los estudios sobre la expresión de las dos versiones de AopW1 en *N. benthamiana*, así como los ensayos de virulencia realizados en las plantas hospedadoras melón y sandía, reveló que AopW1 del grupo I provoca una fuerte toxicidad y promueve la virulencia de la bacteria, mientras que los efectos que ejerce AopW1 del grupo II son considerablemente menores. Por otro lado, mientras que los ensayos *in vitro* muestran que ambas versiones de la proteína rompen los filamentos de F-actina, los ensayos *in vivo* realizados mediante microscopía confocal en hojas de *N. benthamiana* mostraron que AopW1 del grupo I promueve un mayor efecto sobre la degradación del citoesqueleto de actina (Figura 1), así como otros procesos relacionados con éste, como son la endocitosis y el tráfico de proteínas en la célula eucariota. Estos resultados sugieren que el gen *aopW1* podría ser un ejemplo de la especialización de los grupos de *A. citrulli* sobre sus plantas hospedadoras.

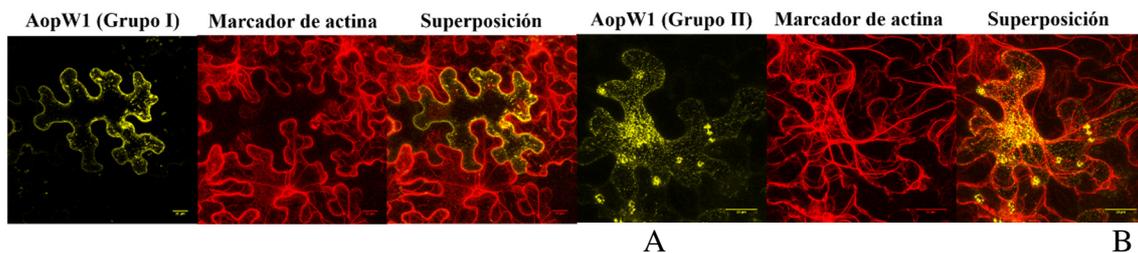


Figura 1: Efecto de la expresión de AopW1 sobre el citoesqueleto de actina de la célula vegetal a las 24 horas tras la infiltración. A: la versión I de AopW1 degrada la actina *in vivo*. B: la versión II de AopW1 no degrada la actina.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos US-4734-14C (US-Israel Binational Agricultural Research and Development) y AGL2016-77163-R (Ministerio de Economía y Competitividad de España).

BIBLIOGRAFÍA

- Alfano y Collmer (2004) *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.
 Bogdanove, *et al.* (1996) *Mol. Microbiol.* 20:681-683.
 Burdman, *et al.* (2005) *Plant Dis.* 89:1339-1347.
 Burdman y Walcott (2012) *Mol. Plant Pathol.* 13:805-815.
 Eckshtain-Levi, *et al.* (2016) *Front. Microbiol.* 7: 430.
 Krishnan y Pueppke (1993) *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:107-113.
 Roden, *et al.* (2004) *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:633-643.
 Teper, *et al.* (2016) *Mol. Plant Pathol.* 17:398-411.

El regulador positivo de defensas ZIP1 es acetilado por el efector bacteriano HopZ1a para suprimir las respuestas de defensa en *Arabidopsis*.

Rueda-Blanco, J. *, Rufián, J.S., López-Márquez, D., Beuzón, C.R., Ruiz-Albert, J.
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga, E-29071 (España). *jrblanco@uma.es

Durante la interacción planta-patógeno, el éxito en la colonización y desarrollo de la enfermedad del patógeno viene determinado por su capacidad de evadir y/o suprimir las respuestas de defensas disparadas por la planta. La planta es capaz de detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como por ejemplo flagelina o EF-Tu, desencadenando una primera respuesta de defensa llamada PTI (*PAMP-Triggered Immunity*). Sin embargo, algunas bacterias patógenas pueden suprimir esta respuesta de defensa mediante la translocación de proteínas de virulencia, llamadas efectores, al interior de la célula vegetal. En plantas resistentes, la célula vegetal es capaz de detectar dichos efectores mediante receptores intracelulares conocidos como proteínas R, lo que desencadena una segunda línea de defensa, más específica e intensa, llamada ETI (*Effector-Triggered Immunity*), que conduce a una muerte celular programada conocida como HR (*Hypersensitive Response*). La activación de las respuestas de defensa a nivel local, PTI y en mayor medida ETI, inducen la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) en hojas distales al sitio de inoculación, evitando así ataques posteriores del patógeno.

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena Gram-negativa, de gran importancia económica y agrícola, capaz de infectar y desarrollar la enfermedad en una gran variedad de plantas, entre las cuales se incluye la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Este patógeno tiene una gran relevancia científica como modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno. La virulencia de este patógeno depende fundamentalmente de su capacidad de translocar proteínas efectoras, llamadas Efectores Tipo III (T3Es), directamente al citosol de la célula hospedadora mediante un Sistema de Secreción Tipo III (T3SS). Algunas cepas incluyen HopZ1a, un efector capaz de suprimir, en *Arabidopsis*, tanto las defensas locales (PTI y ETI) como las sistémicas (SAR), por medio de su actividad acetiltransferasa. Han sido propuestas diversas dianas en la planta para HopZ1a, pero ninguna de ellas explica la capacidad de supresión de defensas de dicho efector. En bacterias patógenas de animales, los homólogos de HopZ1a actúan inactivando por acetilación a quinasas del hospedador implicadas en señalización positiva de defensa. En plantas resistentes, HopZ1a acetila la pseudoquinasa ZED1, propuesta como señuelo que imita al objetivo HopZ1a en la planta, activando una proteína R (ZAR1) para desencadenar la ETI dependiente de HopZ1a. Estos datos sugieren una quinasa reguladora positiva de defensa, tanto a nivel local como sistémico, como probable diana de HopZ1a.

En este trabajo identificamos una quinasa, ZIP1, que funciona como un regulador positivo de PTI, ETI y SAR, que interactúa con HopZ1a y es acetilada por este efector en una lisina esencial para su actividad quinasa. Además, HopZ1a puede suprimir específicamente los fenotipos de defensa resultantes de la expresión de ZIP1 en *Arabidopsis*. Este trabajo describe el mecanismo molecular por el cual HopZ1a suprime las defensas de la planta a nivel local y sistémico mediante la acetilación de un regulador positivo de defensas.

Interacción mutualista entre cianobacterias y arroz: hacia el diseño de nuevos biofertilizantes.

Álvarez, C. *, Ramírez-Moncayo, C., Navarro, J.A., Hervás, M., Roncel, M., Ortega, J.M. Molina-Heredia F.P., Mariscal, V.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla, Sevilla, (España)

*consolacion@ibvf.csic.es

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico son capaces de establecer simbiosis con plantas de prácticamente todos los grupos conocidos. De ellas, las simbiosis con la angiosperma *Gunnera manicata* y con la briofita *Blasia pusilla* son las más conocidas a nivel molecular. En arrozales, las cianobacterias *Nostocales* son las responsables de la mayor parte de la actividad de fijación biológica de nitrógeno atmosférico; sin embargo, no se sabe casi nada de la relación mutualista que se establece entre las cianobacterias y el arroz. Nuestro equipo de investigación está estudiando en profundidad dicha interacción mutualista mediante técnicas de microscopía y de proteómica. Por microscopía de fluorescencia hemos evaluado el tipo de asociación que establece la cianobacteria modelo *Nostoc punctiforme* y la planta *Oryza sativa* var. puntal. Hemos encontrado que los hormogonios de *Nostoc punctiforme*, que son las unidades móviles infectivas, son atraídos hacia las raíces de la planta, donde maduran y establecen una asociación epífita con ella. Mediante estudios proteómicos estamos identificando qué rutas metabólicas se activan durante este proceso, tanto en la cianobacteria como en la planta. Estos estudios permitirán conocer qué señales son importantes para el reconocimiento planta-microorganismo e identificar las proteínas implicadas. Alternativamente, estamos estudiando la capacidad de fortificación de plantas de arroz, usando diferentes especies de cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico aisladas de las marismas del Guadalquivir. Hemos encontrado que algunos de estos aislados promueven un mayor enraizamiento y vigor de la planta. Estos aislados podrían utilizarse como base para la formulación de nuevos biofertilizantes ecológicos alternativos a los fertilizantes de síntesis química.

Estudio de la regulación de la síntesis de factores de nodulación bajo estrés osmótico en *Rhizobium tropici* CIAT 899.

del Cerro, P.^{1*}, Ayala-García, P.¹, Buzón, P.¹, Jiménez-Guerrero, I.¹, Pérez-Montaña, F.¹, López-Baena, F.J.¹, Gil-Serrano, A.M.², Megías, M.¹, Ollero, F.J.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 1. 41012 Sevilla, España. *pdelcerro@us.es

INTRODUCCIÓN

En el establecimiento de la simbiosis entre un grupo de bacterias conocidas como rizobios y las leguminosas, los genes de nodulación de la bacteria están implicados en sintetizar y exportar unas moléculas de naturaleza lipoquitoligosacáridica conocidas como Factores de nodulación (NF) en presencia de los flavonoides adecuados. Estos NF se unen a unos receptores específicos presentes en las células del córtex de la raíz, induciendo una cascada de señalización que culmina con la formación de los nódulos donde el rizobio se establecerá y fijará el nitrógeno atmosférico en amonio (Oldroyd *et al.*, 2013). *Rhizobium tropici* CIAT 899 establece simbiosis con diferentes leguminosas, entre las que destaca la judía y la leguminosa modelo *Lotus japonicus*. Este rizobio es capaz de tolerar diferentes tipos de estreses abióticos, entre el que se incluye el estrés osmótico por medio de acumulación de moléculas compatibles como la trehalosa, el manitol y el glutamato (Fernández-Aunión *et al.*, 2010). No obstante, la mayor peculiaridad de CIAT 899 es su capacidad de producir NF en respuesta a un estrés salino independientemente del flavonoide inductor (Guasch-Vidal *et al.*, 2013).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio transcriptómico, el ARN total fue extraído usando un kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Suiza). Dos muestras independientes de ARN total fueron obtenidas por cada condición y estirpe. El ARNm fue purificado usando el kit MICROB Express Bacterial mRNA Purification kit (Ambion, USA). La secuenciación del ARNm y los análisis informáticos fueron llevados a cabo por Sistemas Genómicos. Los genes diferencialmente expresados por cada estirpe y condición fueron obtenidos por comparación con la estirpe silvestre control, siendo significativamente diferente cuando los valores de expresión eran mayores que 3 y menores que -3. Los ensayos de actividad β -galactosidasa fueron realizados en la estirpe CIAT 899 y derivadas, portando el plásmido pMP240 (promotor del gen *nodA* fusionado transcripcionalmente al gen reportero *lacZ*). Los ensayos de cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron marcando los NF con 0.2 μ Ci of N-acetil-D-[1-¹⁴C]-glucosamina (actividad 0.05 mCi). Los NF fueron extraídos con butanol y aplicados en placas de TLC utilizando acetonitrilo/agua (1:1) como fase móvil. Las placas de TLC fueron expuestas en películas Fuji BAS-III durante 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de comprobar qué estrés osmótico induce los genes de nodulación de CIAT 899, se realizó un ensayo de actividad β -galactosidasa en diferentes condiciones: control, NaCl 300 mM, manitol 455 mM, sacarosa 400 mM y flavonoide apigenina (3,7 μ M) (Figura 1). Los resultados mostraron que había una alta actividad y por tanto activación de los genes de nodulación en NaCl, manitol, apigenina y algo menos en sacarosa.

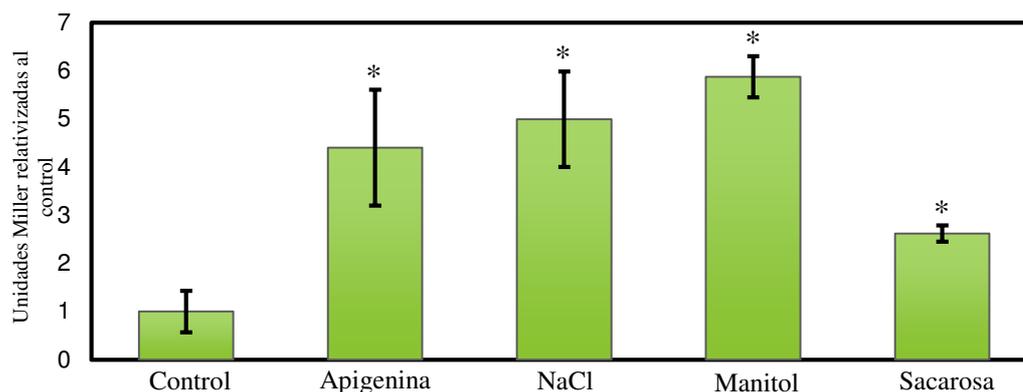


Figura 1. Ensayo de actividad β -galactosidasa en *R. tropici* CIAT 899 pMP240 en diferentes condiciones. Valores con (*) son significativamente diferentes al nivel $\alpha = 5\%$ respecto al control.

Para estudiar todos los genes diferencialmente expresados en presencia de apigenina, sal y manitol, se llevó a cabo un estudio transcriptómico por ARNseq. En resumen, los resultados mostraron que los genes de nodulación, síntesis de ácido indolacético, fijación de nitrógeno, eran transcripcionalmente activados, además de otros procesos, algunos de ellos relacionados con la tolerancia a estrés. Además, se estudió si la activación de los genes de nodulación se correlacionaba con la síntesis de NF. Para ello, se realizaron ensayos de cromatografía en capa fina y de espectrometría de masas. Los resultados mostraron de nuevo que en las condiciones inductoras de los genes de nodulación también hay síntesis de NF. A continuación, se comprobó si esta síntesis de NF en presencia de apigenina, NaCl y manitol puede inducir la formación de primordios nodulares en raíces de judía. Para ello, se purificaron estos NF y se aplicaron en raíces. En todas las condiciones hubo un aumento del número de primordio nodulares con respecto a las condiciones control, indicando que estos NF, incluidos los producidos en presencia de estrés osmótico, son biológicamente activos. Por otra parte, se buscaron posibles elementos reguladores de esta síntesis de NF en presencia de estrés osmótico. Tras realizar mutagénesis dirigida de genes potencialmente candidatos, se observó que la activación de los genes de nodulación en NaCl y manitol es regulada tanto por NodD2 como por un regulador transcripcional de la familia AraC.

¿Por qué un estrés osmótico está induciendo los genes de nodulación de CIAT 899? La razón podría ser una vía de escape a la presencia de un estrés osmótico del suelo y que la acumulación de moléculas compatibles active la maquinaria simbiótica. Futuros trabajos aportarán más datos que permitirán dar un sentido biológico a estos resultados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a un Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad referencia AGL2016-77163-R. Además, del Cerro, P. posee una beca FPU (FPU14-00160) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

BIBLIOGRAFÍA

- Oldroyd, G.E. (2013) Nat. Rev. Microbiol. 11:252.
 Guasch-Vidal, B., *et al.* (2013) Mol. Plant Microbe Interact. 26:451-60.
 Fernández-Aunión, C., *et al.* (2010) BMC Microbiology 10:192.

Las rizobacterias beneficiosas modifican la respuesta antioxidante (enzimática y no enzimática) en olivo en condiciones de estrés salino.

Galicia-Campos, E.* , Gutiérrez-Albanchez, E., Montero-Palmero, B., Ramos-Solano, B., García-Villaraco, A.

Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities. Facultad de Farmacia, Ctra Boadilla del Monte km 5,300, Boadilla del Monte 28668 Madrid. *e.galicia@usp.ceu.es

INTRODUCCIÓN

La salinidad es una de las causas que produce mayores pérdidas económicas anualmente que oscilan alrededor de los 10 billones de dólares americanos, cantidad que supera el producto interior bruto de más de 50 países subdesarrollados (Qadir *et al.*, 2014). El informe de la FAO (2012, www.fao.org/docrep/meeting/024/md324e.pdf) indica que la superficie de tierras afectadas por el aumento de la salinidad alcanza los 34 millones de hectáreas irrigadas. Aunque es muy difícil evaluar la pérdida de productividad y calidad del suelo debido al estrés abiótico en general, está claro que la superficie afectada es cada vez mayor, y que tiene un impacto significativo en la calidad y cantidad de producción de suelos agrícolas (Cramer *et al.*, 2011).

Las plantas son vulnerables al estrés hídrico, por sequía y por salinidad. En estas condiciones, se generan radicales libres y la supervivencia de las plantas depende en parte de su capacidad para eliminar radicales libres. Por otra parte, las plantas tienen un metabolismo muy versátil debido a su naturaleza sésil y son capaces de adaptarse a condiciones cambiantes (Yolcu *et al.*, 2016). Esta capacidad de adaptación se ve potenciada por los microorganismos que conviven con la planta y que conocemos en su conjunto como microbioma (Turner *et al.*, 2013). Dentro de este microbioma son de especial interés las rizobacterias beneficiosas ya que se ha demostrado su gran potencial para estimular el metabolismo de la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se evalúa la capacidad de 10 cepas beneficiosas procedentes de la rizosfera de *Pinus* (Barriuso *et al.*, 2005) para mejorar la adaptación de las plantas de olivo var. Arbosana al estrés salino, presente en el suelo y en agua. Para ello, se trasplantaron olivos de 6 meses a macetas de 5L con suelo de la Marisma del Guadalquivir. Las bacterias, 9 del género *Bacillus* y 1 *Arthrobacter* se inocularon vía radical cada 15 días desde octubre a abril, cuando se midió la fotosíntesis y se determinaron pigmentos fotosintéticos y la capacidad antioxidante de las plantas tanto el aparato enzimático como no enzimático. Se midieron las actividades superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, como indicadores del aparato enzimático y fenoles y flavonoles totales como indicadores del *pool* no enzimático. Con todas las variables analizadas se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Canoco) y se hicieron ANOVA unidireccionales (Statgraphcis Centurion XVIII) para cada una de las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran dos tipos de estrategias de las bacterias beneficiosas en cuanto a los pigmentos fotosintéticos. Un grupo de bacterias (L44, L81, L56, L24, L36, L62, L79, y G7) disminuyen los pigmentos (clorofila a, b y carotenos) mientras que las otras dos bacterias (K8 y H47) mantienen los niveles de pigmentos similares al control, sin que esto afecte al funcionamiento potencial de los fotosistemas, como se aprecia en los datos de fluorescencia; las modificaciones más acusadas en los parámetros evaluados las causa la cepa L79, lo que indica el fuerte efecto de esta cepa sobre la variedad arbosana. Por tanto,

la disminución de pigmentos fotosintéticos podría considerarse como una estrategia de protección frente al estrés oxidativo.

En cuanto a las enzimas antioxidantes, las plantas tratadas con todas las bacterias, así como las plantas sin tratar, presentan valores de actividad de 100% o superiores de la enzima SOD, mientras que el incremento en la actividad APX sólo se observa en las plantas inoculadas con L44, L36, G7, K8 y H47; L24 presenta una disminución significativa en esta actividad. Dado que sólo se han analizado dos actividades enzimáticas antioxidantes no se puede descartar la participación de otras enzimas del sistema de *scavenging* de ROS. En cualquier caso, el fuerte estrés abiótico al que están sometidas las plantas se pone de manifiesto por la alta actividad enzimática antioxidante. Respecto al *pool* antioxidante no enzimático, no se detectan diferencias en los fenoles totales con ninguno de los tratamientos; sin embargo, algunas de las bacterias modifican el contenido en flavonoles totales lo que indica que estas bacterias afectan a la ruta de fenilpropanoides. L24, L44 y H47 disminuyen los flavonoles mientras que G7 y K8 los aumentan.

En resumen, se detectan 5 estrategias entre las 10 cepas estudiadas: aumento de la capacidad antioxidante (enzimático y no enzimático) y disminución de pigmentos (G7); aumento de capacidad antioxidante sin disminuir pigmentos (K8); disminución de antioxidantes no enzimáticos/aumento enzimáticos y disminución pigmentos (L44), disminución de antioxidantes no enzimáticos/aumento enzimáticos y mantener pigmentos (H47); disminución de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y disminución de pigmentos (L24).

BIBLIOGRAFÍA

- Barriuso, *et al.* (2005) *Microb. Ecol.* 50: 82-89. doi: 10.1007/s00248-004-0112-9
- Cramer, *et al.*, (2011) *Plant Biol.* 11: 163.
- Informe de la FAO (2012) www.fao.org/docrep/meeting/024/md324e.pdf.
- Qadir, *et al.*, (2014) *Nat. Resour. Forum* 38: 282-295.
- Turner, *et al.*, (2013) *Genome Biol.* 14: 209.
- Yolcu, *et al.*, (2016) *Plant Physiol. Biochem.* 100:37-46.

Caracterización funcional de NfeR1, un RNA regulador relacionado con la eficiencia simbiótica de *Sinorhizobium meliloti*.

García-Tomsig, N.I.^{1*}, Robledo, M.¹, Peregrina, A.¹, Millán, V.¹, Becker, A.², Jiménez-Zurdo, J.I.¹

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada (España). ²LOEWE Center for Synthetic Microbiology and Faculty of Biology, Philipps-Universität Marburg, 35043 Marburg (Alemania).

*natalia.garcia@eez.csic.es

Los pequeños RNAs no codificantes (small non-coding RNAs o sRNAs) constituyen una nueva categoría de moléculas reguladoras, ubicua en bacterias, para las que ya se ha descrito su implicación en toda clase de procesos, e.g. virulencia, quorum sensing o formación de biofilms. La transcripción de los sRNAs está a su vez estrictamente regulada, por lo que suelen formar parte de los principales regulones de respuesta de las bacterias a cambios en el medio externo. El mecanismo principal de actividad de los sRNAs implica la interacción con series cortas y discontinuas de nucleótidos complementarios, generalmente localizados en el entorno del sitio de unión a ribosoma o Shine Dalgarno (SD) de múltiples mRNAs codificados en *trans* (Jiménez-Zurdo *et al.* 2013). Esto resulta en el bloqueo de la traducción y, en muchos casos, la degradación subsiguiente del mRNA diana por ribonucleasas (e.g. RNasa E o RNasa III).

En nuestro laboratorio estamos caracterizando el transcriptoma no codificante de *Sinorhizobium meliloti*, microorganismo del suelo de biología compleja que establece simbiosis mutualistas fijadoras de nitrógeno con leguminosas del género *Medicago*. La delección de uno de los cientos de *trans*-sRNAs identificados en *S. meliloti*, que hemos denominado NfeR1, altera la organogénesis nodular y compromete la eficiencia de la fijación de nitrógeno en simbiosis con alfalfa (Robledo *et al.* 2017). El estudio de la expresión de NfeR1 mediante hibridación Northern y fusiones de su promotor al gen informador GFP reveló la máxima acumulación y transcripción del sRNA durante todas las etapas de la interacción simbiótica, en respuesta a la salinidad y probablemente en relación al estrés de fosfato. La expresión diferencial de NfeR1 es conferida por un motivo conservado en su región promotora con probable afinidad por un factor de transcripción no identificado todavía.

Las predicciones bioinformáticas, parte de las cuales han sido confirmadas experimentalmente, revelaron que NfeR1 silencia múltiples mRNAs que codifican el componente periplásmico de transportadores ABC a través de tres motivos anti-Shine Dalgarno (aSD) idénticos, que tendrían función redundante en la regulación. Nuestra hipótesis de trabajo es que NfeR1 contribuye a coordinar la adquisición de nutrientes con la reprogramación metabólica que sufre la bacteria durante el establecimiento de la simbiosis. En la comunicación se presentarán detalles sobre la regulación transcripcional, mecanismos de actividad, potencial regulador y función simbiótica de NfeR1.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos BFU2013-48282-C2-2-P y BFU2017-82645-P del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

BIBLIOGRAFÍA

Jiménez-Zurdo, J.I., *et al.* (2013) Mol. Plant Interact. 26:160-167.
Robledo, M., *et al.* (2017) Environ. Microbiol. 19:2661-2680.

La región génica SfHH103_00346-SfHH103_00348 de *Sinorhizobium fredii* HH103 está implicada en la movilidad en superficie inducida por genisteína de esta bacteria.

Navarro-Gómez, P. *, Alías-Villegas, C., Acosta Jurado, S., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). *pnavarro2@us.es

INTRODUCCIÓN

Sinorhizobium fredii HH103 es uno de los rizobios con mayor rango de nodulación conocido, capaz de nodular tanto especies de leguminosas formadoras de nódulos determinados, como la soja, así como especies que forman nódulos indeterminados, como *Glycyrrhiza uralensis* (Margaret *et al.*, 2011). *S. fredii* HH103 presenta un genomio complejo (7.239.684 pb) organizado en 7 replicones: el cromosoma (4.305.723 pb) y 6 plásmidos denominados con una letra en función de su tamaño, pSfhh103a1 (~24 Kb), pSfhh103a2 (~25 Kb), pSfhh103b (~62 Kb), pSfhh103c (~144 Kb), pSfhh103d (~589 Kb) y pSfhh103e (~2,1 Mb) (Vinardell *et al.*, 2015).

Recientemente hemos iniciado estudios transcriptómicos que combinados con análisis de *q*PCR, revelan como la expresión de un número considerable de genes de HH103 se ve afectada por la presencia de flavonoides. Muchos de estos genes no han sido estudiados en *S. fredii*, y la mayoría de éstos tampoco en otros rizobios. En base a su regulación, los genes afectados pueden dividirse en tres grupos: a) Genes dependientes de cajas *nod* (NB), b) Genes dependientes de cajas *tts* (TB), y c) Genes independientes de NB y TB.

En este trabajo se ha caracterizado una región génica cromosómica constituida por tres genes (SfHH103_00346 a SfHH103_00348) cuya transcripción es inducida por flavonoides, NodD1 y TtsI y reprimida por NodD2 y NolR. El primer gen es *flgJ*; los otros dos codifican proteínas hipotéticas. Recientemente se ha determinado que FlgJ es necesario para el adecuado ensamblaje del flagelo en *Salmonella* pero también actúa como una autolisina (actividad β -N-acetilglucosaminidasa) que permite la degradación localizada del peptidoglucano (Herlihey *et al.*, 2014). Hemos comprobado que la motilidad de HH103 en superficie se incrementa notablemente en presencia de genisteína.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han construido mutantes de *S. fredii* HH103 en SfHH103_00347 y SfHH103_00348, además de dos mutantes independientes en *flgJ* (por delección en fase y por inserción del casete *lacZ* Δ p-Gm^R) siguiendo metodologías habituales en nuestro laboratorio (Acosta-Jurado *et al.* 2016a). Los ensayos de *swimming* y movilidad en superficie se han realizado siguiendo la metodología descrita en Acosta Jurado *et al.* (2016b) con algunas modificaciones, ya que el medio que se ha utilizado ha sido el medio mínimo descrito por Robertsen *et al.* (1981). La visualización de bacterias al TEM se han realizado por tinción negativa siguiendo el protocolo descrito por Calatrava-Morales *et al.* (2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por RNAseq de la región cromosómica constituida por los genes SfHH103_00346, SfHH103_00347 y SfHH103_00348 reveló que su transcripción se induce por flavonoides, NodD1 y TtsI y se reprime por NodD2 y NolR. Esta región está precedida por una caja SyrM (SB) y *tts* (TB) putativas, ambas imperfectas. Para estudiar la función de dichas cajas hemos amplificado dos fragmentos de la región promotora que incluye sólo la caja *tts* y ambas cajas respectivamente y se han hecho ensayos de actividad

β -galactosidasa tanto en la estirpe silvestre como en diferentes fondos mutantes afectados en los genes simbióticos reguladores (*nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *ttsI*, *syrM*), en presencia y ausencia de genisteína. Los resultados obtenidos confirman que la expresión de esta región génica depende de la caja *tts* situada 124 pb aguas arriba de esta región.

Debido al papel que desempeña FlgJ en la formación del flagelo, se han hecho ensayos de movilidad con estos mutantes. La inactivación de cualquiera de estos genes causa una pérdida de movilidad de tipo *swimming* que queda constatada con los estudios microscópicos que se han hecho (Figura 1), en donde se puede ver la desaparición del flagelo en los mutantes en *flgJ* y 00347. En el mutante en 00348, en cambio, el flagelo está presente, aunque aparentemente no es funcional. La presencia de genisteína induce la movilidad en la estirpe silvestre HH103 Rif^R. El mutante en *flgJ* presenta reducción parcial en su movilidad en superficie, mientras que esta reducción es total en los mutantes en 00347 y 00348. Además, la inactivación de *flgJ* da como resultado un aumento de la movilidad en superficie cuando hay ausencia de genisteína.

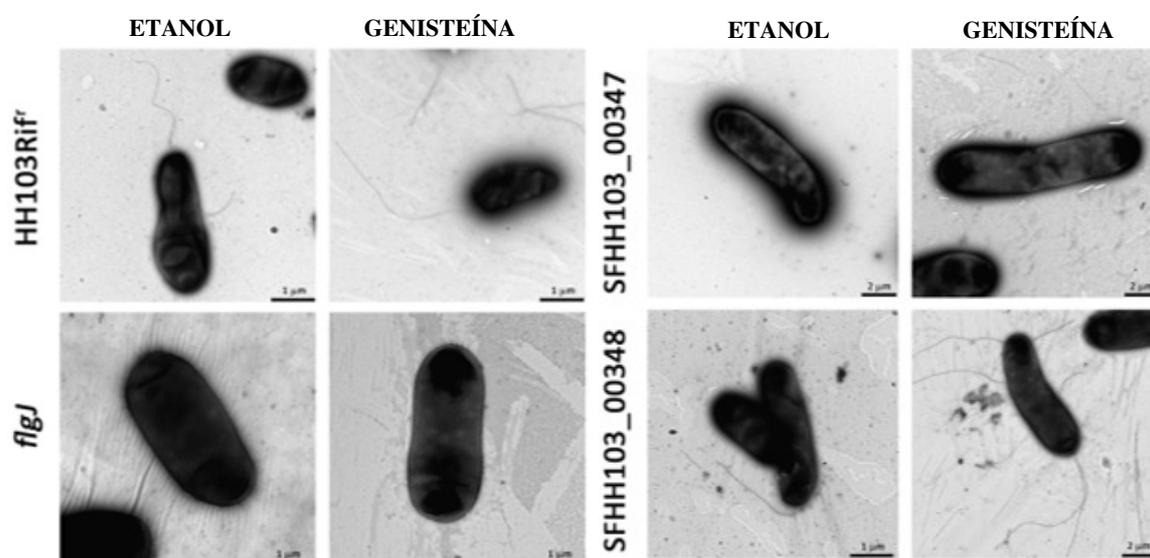


Figura 1. Presencia o ausencia de flagelo en HH103 Rif^R y sus mutantes en *flgJ*, 00347 y 00348.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a las V y VI convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016a) *Mol. Plant Microbe Interact.* 29:700-712.
 Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016b) *Mol. Plant Microbe Interact.* 29:925-937.
 Calatrava-Morales, N., *et al.* (2017) *Mol. Plant Microbe Interact.* 30:566-577.
 Herlihey, F.A., *et al.* (2014) *J. Biol. Chem.* 289:31029-31042.
 Margaret, I., *et al.* (2011) *J. Biotechnol.* 155:11-19.
 Robertsen, B.K., *et al.* (1981) *Plant Physiol.* 67:389-400.
 Vinardell, J.M., *et al.* (2015) *Mol. Plant Microbe Interact.* 28:811-824.

Identificación de los determinantes genéticos que controlan la colonización del agente de biocontrol *Pseudomonas fluorescens* en cebada.

Pacheco-Moreno, A.^{1*}, Ridout, C.¹, de Vos, S.¹, Malone, J.^{1,2}

¹Departamento de Microbiología Molecular, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich, United Kingdom. ²Universidad de East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom. *alba.pacheco@jic.ac.uk

INTRODUCCIÓN

El microbioma de la rizosfera constituye el conjunto de microorganismos más diverso que interacciona directamente con la planta. La abundancia relativa de microorganismos que habitan en la rizosfera es mucho mayor que en el resto del suelo debido a un fenómeno conocido como el efecto rizosfera. Las plantas son capaces de secretar hasta un 21% de sus fotoasimilados, cuya composición varía con la especie, el estado de desarrollo de la planta e incluso con los factores ambientales y como consecuencia dos principales fenómenos tendrán lugar en la rizosfera: 1) un cambio en la composición microbiana y 2) un incremento entre 10 y 1000 veces en su densidad. Por lo tanto, el impacto de la comunidad microbiana en el desarrollo y adaptación de la planta puede llegar a ser enorme. Los beneficios de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR han sido ampliamente estudiados. Las PGPRs pueden afectar el crecimiento vegetal de forma directa, mediante la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de nutrientes o la producción de fitohormonas; o de forma indirecta, al inhibir el crecimiento de patógenos. Este trabajo utiliza como modelo la interacción entre la cebada, cuarto cereal más cultivado en el mundo, y *Pseudomonas fluorescens*, bacteria ya conocida por sus excelentes capacidades como PGPR, y tiene como objetivo fundamental el estudio del reconocimiento planta-bacteria que ocurre en la rizosfera y la posible identificación del QTL o locus de carácter cuantitativo en cebada responsable del control de este proceso. Una mejor comprensión de esta relación bidireccional podría proporcionar las bases para el desarrollo de cepas de biocontrol más eficientes, así como de plantas con una mejora en su capacidad para reclutar microorganismos beneficiosos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1. Material vegetal y bacteriano usados en este trabajo

Material vegetal	
Variedad de cebada	
Chevallier	Johanna
Tipple	Archer
Golden Promise	Betzes
Highlight	SusPtrit
Union	Ingrid
Yokohama	Pallas
Material bacteriano	
Cepas	Referencia
<i>P. fluorescens</i> SBW25	(Rainey and Bailey, 1996)
<i>P. fluorescens</i> SBW25 $\Delta rccR$	(Campilongo <i>et al.</i> , 2017)
<i>P. fluorescens</i> SBW25 $\Delta hexR$	(Campilongo <i>et al.</i> , 2017)
<i>P. fluorescens</i> SBW25 $\Delta rccR-lacZ$	Este trabajo
15 Biosensores <i>Rlv3841-lux</i>	(Pini <i>et al.</i> , 2017)
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	(Bibb <i>et al.</i> , 2012)

El material vegetal usado en este trabajo se compuso por un panel de 12 variedades de cebada para garantizar la mayor diversidad genética (Tabla 1), así como por una población F7 de 188 líneas resultado del cruce de la variedad Chevallier x Tipple. Las cepas bacterianas usadas en este trabajo se enumeran en la Tabla 1.

Las poblaciones de *Pseudomonas* spp. asociadas a las raíces de cebada fueron aislados mediante una versión adaptada del método descrito por Mauchline *et al.*, 2015. Los análisis fenotípicos realizados con esta colección bacteriana se llevaron a cabo con una adaptación para procesamiento de gran número de muestras de los protocolos descritos por Mauchline *et al.* (2015) y Castric y Castric (1983). Los ensayos de colonización de rizosfera, así como las curvas de crecimiento bacteriano, se realizaron mediante los métodos descritos por Campilongo *et al.* (2017). Los análisis de colonización por los diferentes biosensores con NightOWL y el subsecuente análisis de QTL se hicieron en base a lo descrito por Pini *et al.* (2017).

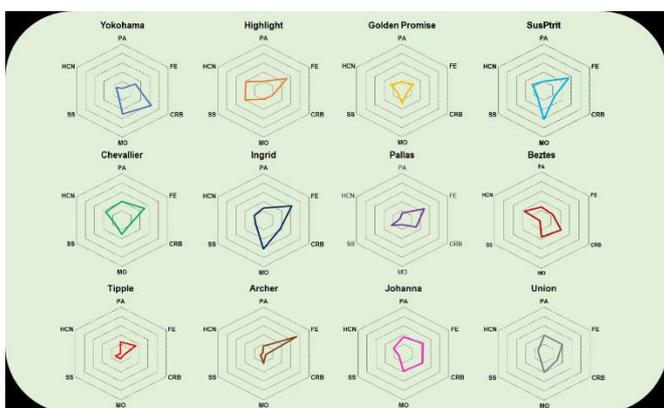


Figura 1. Perfiles microbiológicos de las distintas variedades de cebada

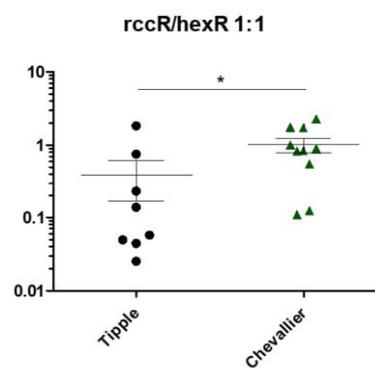


Figura 2. Ensayos de colonización

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis fenotípico de los 800 aislados mostró grandes diferencias entre las poblaciones de *Pseudomonas* spp. asociadas a cada una de las 12 variedades, lo que sugiere una especialización de estas comunidades a cada uno de los genotipos estudiados (Fig 1). Las variedades Chevallier y Tipple presentaron diferentes patrones de colonización por los mutantes afectados en el metabolismo de Carbono, lo que sugiere una secreción diferencial de fuentes de carbono (Fig 2). Esta observación se vio respaldada cuando estas dos mismas variedades fueron inoculadas con los 15 biosensores de rizobio, cuya respuesta varió para cada una de las variedades. Con el objetivo de analizar estas diferencias, los aislados rizosféricos de Chevallier y Tipple se crecieron en medio mínimo con una fuente de carbono sencilla, acetato, y una compleja, glucosa. Interesantemente, se pudo observar una mejor adaptación de los aislados provenientes de Tipple cuando estos fueron crecidos en glucosa. En base a estos datos preliminares, se comenzó la búsqueda de las regiones genéticas o QTLs responsables del control de las poblaciones de *Pseudomonas* spp. asociadas a las raíces de cebada mediante el uso de los biosensores rizobianos. Este análisis aún sigue en curso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) del Reino Unido y la empresa NHB Ltd. Especial mención al grupo de Phil Poole de la Universidad de Oxford por proporcionarme los biosensores rizobianos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bibb, M.J., *et al.* (2012) *Mol. Microbiol.* 84:1033-1049.
- Campilongo, R. *et al.* (2017) *PLoS Genet.* 13:e1006839.
- Castric, K.F. y Castric, P.A. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45:701-702.
- Mauchline, T. H. *et al.* (2015) *Environ. Microbiol.* 17:4764-4778.
- Pini, F. *et al.* (2017) *Plant Physiol.* 174:1289-1306.
- Rainey, P.B., Bailey, M.J. (1996) *Mol. Microbiol.* 19:521-533.

**Sesión V: Interacciones microorganismos patógenos-plantas
(Microorganismos Beneficiosos 2)**

Moderadora: María del Rosario Espuny Gómez.

La mutación en el gen *nolR* mejora la capacidad de nodulación de *Sinorhizobium fredii* HH103 en *Lotus japonicus* Gifu a través del cambio del modo de infección.

Acosta-Jurado, S.^{1*}, Rodríguez-Navarro, D.N.², Rodríguez-Carvajal, M.A.³, Pérez-Montaña, F.¹, Navarro-Gómez, P.¹, Alías-Villegas, C.¹, López-Baena, F.J.¹, Ruiz-Sainz, J.E.¹, Vinardell, J.M.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, España. ²IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil. Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, España. ³Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 1. 41012 Sevilla, España. *sacosta@us.es

INTRODUCCIÓN

Sinorhizobium fredii HH103 es un rizobio de amplio rango de nodulación que incluye plantas formadoras de nódulos de tipo determinado e indeterminado. La secuenciación de su genoma ha permitido conocer la existencia y localización de los genes relacionados con la simbiosis, así como la presencia de los principales reguladores que intervienen en dicho proceso como los reguladores de tipo LysR, NodD y SyrM y otros reguladores que intervienen en el *fine-tuning* como el regulador negativo NolR (Vinardell *et al.*, 2015). NolR es un regulador de tipo hélice-vuelta-hélice que se une a secuencias no palindrómicas [(A/T)TTAG-N₉-A(T/A)] regulando la expresión del gen diana e interviene en procesos como la regulación de la producción de factores de nodulación (LCOs), exopolisacárido (EPS) (Vinardell *et al.*, 2004; Acosta-Jurado *et al.*, 2016c) y en la secreción de proteínas efectores (Nops) a través del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) (López-Baena *et al.*, 2008). En este trabajo se estudia la capacidad simbiótica del mutante en el regulador NolR con la leguminosa modelo *Lotus* y las posibles causas de dichos fenotipos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los mutantes en el gen *nolR* se realizaron mediante la inserción del casete *LacZ-Gm*^R (SVQ548). La complementación se llevó a cabo mediante la integración de una copia silvestre del gen clonado en pK18mob. Los ensayos de nodulación con las diferentes especies de *Lotus* se han llevado a cabo en cámaras de plantas siguiendo la metodología descrita por Acosta-Jurado *et al.* (2016a, b). Los estudios de expresión génica mediante RNAseq y/o PCR cuantitativa (qPCR) se han realizado según lo descrito por Acosta-Jurado *et al.* (2016a) con la modificación de que las estirpes se crecieron en presencia de exudados radicales de *L. japonicus* Gifu. Los experimentos de microscopía y determinación de factores de nodulación (LCOs) mediante HPLC y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) se llevaron a cabo por lo descrito en Acosta-Jurado *et al.* (2016b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

S. fredii HH103 es capaz de formar nódulos fijadores en *L. burtii* pero no en las otras especies de *Lotus* testadas, como en *L. japonicus* Gifu donde sólo induce nódulos inefectivos. Sin embargo, la mutación en el gen *nolR* no sólo mejora la capacidad simbiótica con plantas de *L. burtii*, sino que también permite la capacidad de formar nódulos fijadores en *L. japonicus* Gifu y Miyakojima MG-20, *L. filicaulis* y *L. krylovii*. Esta ganancia de capacidad de nodulación se pierde cuando se introduce una copia funcional del gen *nolR*.

Para investigar la posible causa de estos fenotipos del mutante *nolR* se llevaron a cabo estudios de RNAseq como la expresión génica global en presencia de exudados radicales (ER) de *L. japonicus* Gifu. Los resultados obtenidos mostraron que los genes implicados en la producción de los LCOs se encuentran diferencialmente expresados en comparación con la estirpe silvestre en presencia de ER. Mediante estudios de HPLC-HRMS se corroboró la presencia tanto de una mayor cantidad como variedad de LCOs en presencia del flavonoide inductor genisteína e incluso en ausencia del mismo lo que concuerda con el aumento de expresión de los diferentes operones implicados en su producción.

Como se describió anteriormente en Acosta-Jurado *et al.* (2016b), la estirpe parental penetra en las raíces de *L. burttii* a través del modo denominado infección intercelular. Sin embargo, el mutante *nolR* infecta las raíces de *L. burttii* y *L. japonicus* Gifu a través de tubos de infección, un modo considerado más evolucionado que el de la estirpe parental. La estirpe complementada vuelve al modo de infección intercelular en *L. burttii* encontrándose sólo en microcolonias en los pelos radicales curvados y a sólo formar microcolonias en los pelos radicales de *L. japonicus* Gifu (Figura 1).

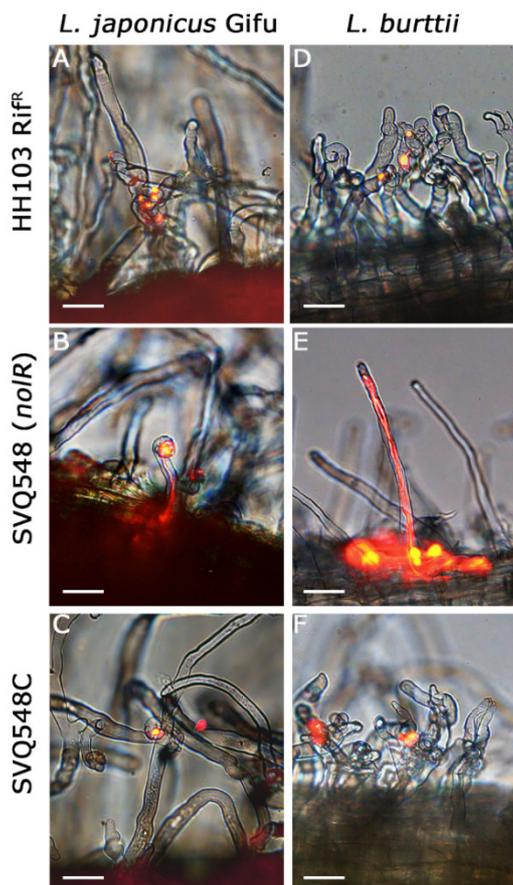


Figura 1. Microscopía de epifluorescencia de pelos radicales de *L. japonicus* Gifu (A-C) y *L. burttii* (D-F) inoculados con HH103 Rir^R (A, D), SVQ548 (B, E) y SVQ548C (C, F). Las barras corresponden a 50 μ m

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a las V y VI convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016a) Mol. Plant Microbe Interact. 29:700-712.
 Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016b) Mol. Plant Microbe Interact. 29:925-937.
 Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016c) PLoS One 11:e0160499.
 López-Baena, F.J., *et al.* (2008) Microbiology 154:1825-36
 Pérez-Montañó *et al.* (2016) Sci. Rep. 6:31592.
 Vinardell, J.M., *et al.* (2015) Mol. Plant Microbe Interact. 28:811-824.
 Vinardell, J.M., *et al.* (2004) Mol. Plant Microbe Interact. 17:676-685.

Estudio de la influencia de genes reguladores de la simbiosis y de los polisacáridos superficiales sobre la movilidad en superficie inducida por genisteína en *Sinorhizobium fredii* HH103.

Alías-Villegas, C.^{1*}, Acosta-Jurado, S.¹, Navarro-Gómez, P.¹, López-Baena, F.J.¹, Soto M.J.², Vinardell, J.M.¹.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). ²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC. C/ Profesor Albareda, 1. 18008. Granada, (España). *calias@us.es

INTRODUCCIÓN

Sinorhizobium fredii HH103 es un rizobio de crecimiento rápido y considerado de amplio rango de nodulación. A pesar de que no se conocen con exactitud todos sus hospedadores, se sabe que nodula eficientemente plantas formadoras de nódulos determinados como *Glycine max* (soja) y de nódulos indeterminados como *Glycyrrhiza uralensis*. Actualmente, se conoce el genoma de HH103 (Vinardell *et al.*, 2015) y se han realizado estudios transcriptómicos en presencia y ausencia del flavonoide inductor genisteína (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). En estos estudios, se ha visto que la genisteína funciona activando la expresión de los genes implicados en la síntesis de factores de nodulación (LCOs), así como de los genes del sistema de secreción de tipo tres (T3SS) y de las proteínas efectoras (Nops). Por otra parte, cabe destacar que dicho flavonoide provoca la reducción de la producción de exopolisacárido (EPS) en esta estirpe (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a).

Con estos antecedentes, se ha realizado un estudio de la implicación de la genisteína en la movilidad en superficie de *S. fredii* HH103, así como de una serie de mutantes independientes en los genes reguladores de la nodulación, en el regulador del T3SS y en un gen de cada uno de los tipos de polisacáridos superficiales, exopolisacárido (EPS), glucanos cíclicos (GC), polisacárido capsular de tipo antígeno K (KPS) y lipopolisacárido (LPS). Además, se han visualizado todas las estirpes al microscopio electrónico de transmisión (TEM) con el objetivo de observar la morfología del flagelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos de movilidad en superficie se han realizado siguiendo la metodología descrita en Acosta Jurado *et al.* (2016b) con algunas modificaciones, ya que el medio que se ha utilizado ha sido el medio mínimo descrito por Robertsen *et al.* (1991). La visualización de bacterias al TEM se han realizado por tinción negativa siguiendo el protocolo descrito por Calatrava-Morales *et al.* (2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios de movilidad en superficie en presencia de genisteína se han realizado en *S. fredii* HH103, así como en una serie de mutantes independientes en los genes reguladores de la nodulación, *nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *syrM* y *mucR1*; en el regulador del T3SS, *ttsI*, y en genes implicados en la producción de los diferentes tipos de polisacáridos superficiales: *exoA* (mutante EPS⁻), *ndvB* (mutante GC⁻), *rkpA* (mutante KPS⁻) y *lpsB* (mutante con LPS alterado).

En este trabajo describimos por primera vez que la genisteína induce la movilidad en superficie de HH103 en comparación con la condición control con etanol, solvente del flavonoide. Esta inducción de la movilidad es visible desde las primeras 24 horas tras la inoculación y se hace aún más evidente a las 48 y 72 horas después de la inoculación. La movilidad en superficie en presencia de genisteína se ve severamente disminuida cuando

se mutan los genes *nodD1*, *ttsI*, *nolR* o *mucR1*; sin embargo, no se afecta significativamente al mutar *nodD2* o *syrM*. Cuando nos centramos en la condición control se aprecia justo lo contrario, son los mutantes en los genes *nodD2* y *syrM* los que sufren un aumento de la movilidad en superficie estadísticamente significativo, hecho que no ocurre en los mutantes *nodD1*, *ttsI* o *nolR* cuyo halo no se ve alterado; ni en *mucR1*, que presenta una ligera disminución respecto de halo mostrado por la estirpe parental. En el caso de los mutantes en los polisacáridos superficiales se ha observado una menor movilidad en presencia de genisteína cuando faltan los genes *exoA* y *ndvB*, que contrasta con un aumento estadísticamente significativo en ausencia de este flavonoide. Los ensayos realizados con los mutantes en los genes *rkpA* y *lpsB* mostraron un halo de movilidad grande tanto en presencia como en ausencia de genisteína. Es por tanto en presencia de etanol, donde ocurre un aumento estadísticamente significativo del halo de movilidad en superficie al comparar con HH103Rif^R (Figura 1).

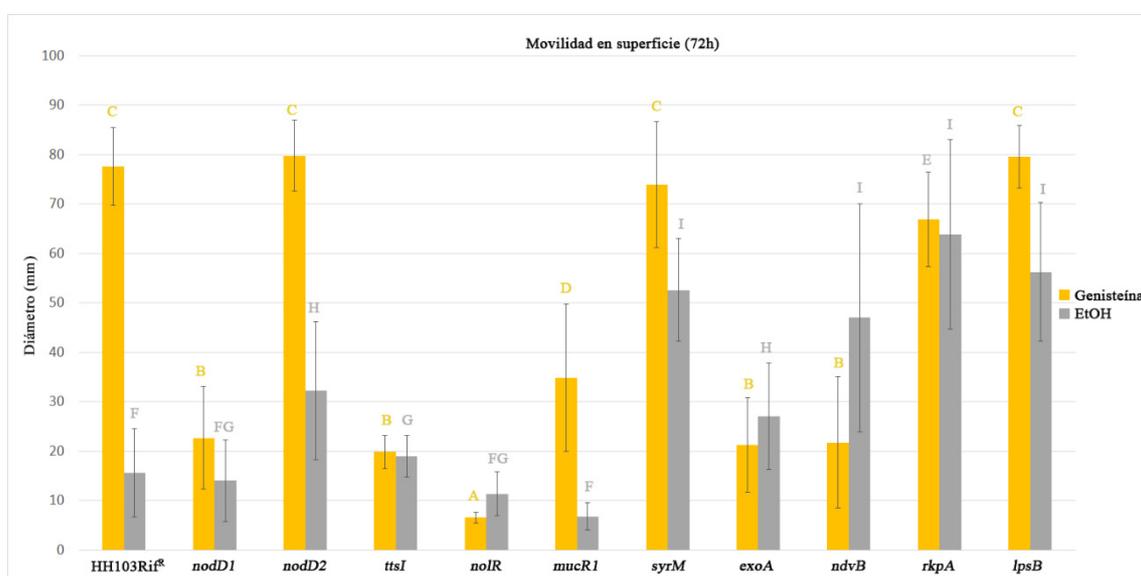


Figura 1. Diámetro, en milímetros, del halo de movilidad en superficie formado por cada estirpe en presencia y ausencia de genisteína.

La visualización en el TEM de células del borde del halo de movilidad en presencia y ausencia de genisteína de HH103Rif^R y de cada uno de los mutantes, no mostró diferencias destacables en la morfología del flagelo de ninguna de las cepas en las dos condiciones estudiadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y las V y VI convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016a) PloS ONE 11:e0160499.
 Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016b) Mol. Plant Microbe Interact. 29:700-712.
 Calatrava-Morales, N., *et al.* (2017) Mol. Plant Microbe Interact. 30:566-577.
 Pérez-Montaño, F., *et al.* (2016) Sci Rep, 6:31592.
 Robertsen, B.K., *et al.* (1981) Plant Physiol. 67:389-400.
 Vinardell, J.M., *et al.* (2015) Mol. Plant Microbe Interact. 28:811-824.

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

Ballesteros, M.^{1*}, Albareda, M.^{1,2}, Duran, D.¹, Palacios, J.M.^{1,2}

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP UPM-INIA), Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid (España); ²Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid (España). *marta.ballesteros@upm.es

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) puede conducir a la reducción del uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en los campos de cultivo, disminuyendo así el impacto medioambiental asociado (Chislock *et al.*, 2013; Erisman *et al.*, 2013; Galloway *et al.*, 2003). Desde el punto de vista agrícola el sistema de FBN más relevante lo constituye la simbiosis rizobio-leguminosa.

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* (*Rlv*) es una alfa-proteobacteria capaz de infectar las raíces de diversas leguminosas (*Pisum*, *Lens*, *Vicia* y *Lathyrus*) e inducir la formación de nódulos radiculares en los que la bacteria, convertida en bacteroide, fija nitrógeno y lo cede a la planta a cambio de compuestos carbonados (Gage, 2004; Hirsch, 1992; Downie, 2010). El funcionamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa supone el ajuste metabólico de ambos componentes simbióticos en un proceso del que muchos detalles aún se desconocen, y que en el caso de estas leguminosas incluye la producción de múltiples péptidos antimicrobianos denominados NCR (Nodule-specific Cystein-Rich) (Vanderlinde *et al.*, 2014) por parte de la planta.

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que un sistema enzimático (la hidrogenasa) se expresaba de forma diferente en bacteroides en función del macrosimbionte (Brito *et al.*, 2008). Esto podría deberse a que cada hospedador crea un ambiente nodular distinto para la misma bacteria, que estaría condicionado por los péptidos arriba mencionados y por otros factores aún desconocidos.

El objetivo de este trabajo es estudiar los caracteres de adaptación al hospedador en la asociación simbiótica entre *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (*Rlv*) y plantas leguminosas. En trabajos preliminares se compararon los perfiles proteómicos de células endosimbióticas de *Rlv* UPM791 inducidas en nódulos de lenteja (*Lens culinaris*) y guisante (*Pisum sativum*). Este análisis ha revelado la existencia de diferencias en la expresión de un número significativo de proteínas codificadas en distintas partes del genoma bacteriano. Además, hemos podido constatar que las dos leguminosas producen conjuntos de péptidos NCR distintos.

Entre las proteínas bacterianas de expresión diferencial se han identificado proteínas de respuesta a estrés del tipo sHSPs (*small Heat Shock Proteins*) y USP (*Universal Stress Protein*) [*Rlvb_00252*(hsp20), *Rlva_00525* (hspD2), *Rlva_00851* (hspD3), *Rlvchr_02011* (uspA)], un regulador transcripcional de tipo GntR, y otras proteínas que podrían tener un papel en el metabolismo de C/N en el bacteroide [una posible diaminobutirato-2-oxoglutarato transaminasa o DABA-AT, y una proteína de unión a ATP que posiblemente forme parte del complejo ACC (AMYDO) codificadas por los genes del plásmido simbiótico (*Rlvc_00189* y *Rlvc_00190*, respectivamente)].

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han construido mutantes defectivos en los genes codificantes de las proteínas de interés mediante inserción de un gen de resistencia a espectinomicina o por interrupción del gen recombinando un fragmento homólogo clonado en pK18mob. Los mutantes se inocularon en plantas de guisante y de lenteja crecidas en invernadero en condiciones

bacteriológicamente controladas en jarros de tipo Leonard. La eficiencia simbiótica se determinó midiendo el peso seco y la cantidad de nitrógeno de la parte aérea y el peso fresco de los nódulos. La expresión de DABA-AT y AMYDO se está estudiando empleando fusiones de sus promotores con β -galactosidasa en el plásmido pMP220. Se midió la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno por las cepas de *Rhizobium*, determinando el crecimiento en medio Rmin (O’Gara y Shanmugam, 1976), sustituyendo el glutamato por diferentes compuestos (homoserina, ácido gamma-aminobutírico, 2,4-diaminobutirato, hidroxietilglutamato y glutamato).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han construido mutantes afectados en proteínas de expresión específicas de huésped, y se está determinando el papel de dichas proteínas en la efectividad simbiótica en sendos hospedadores. Resultados preliminares indican que:

- los mutantes DABA-AT y AMYDO no muestran un decremento de la eficiencia simbiótica de *Rlv* UPM791. El mutante en DABA-AT mantiene su capacidad para utilizar 2,4-diaminobutirato como fuente de nitrógeno.
- las plantas de guisante inoculadas con los mutantes defectivos en las proteínas de estrés muestran un detrimento de la biomasa y de la actividad nitrogenasa; sin embargo, estas mutaciones no parecen afectar a la eficiencia de la simbiosis con lenteja.
- el mutante afectado en GntR muestra una disminución en la cantidad de nitrógeno fijada.

Las regiones promotoras clonadas en pMP220 se están empleando para analizar la expresión génica en cada hospedador. Asimismo, se utilizarán formas clonadas de los genes completos para estudiar el efecto de la sobreexpresión en el comportamiento simbiótico.

En el congreso se presentarán resultados actualizados y su consiguiente discusión.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos del Proyecto SYMBIOSIGNAL (MINECO BIO13-4043-P a J.P.) y de la Universidad Politécnica de Madrid (PINV-18-ADPEFJ-9-4LIMUX; a M.A.). M.B. es beneficiaria de un contrato predoctoral del Programa Propio de la Universidad Politécnica de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- Chislock, *et al.* (2013) Nat. Edu. Know. 4:p10.
Erisman, *et al.* (2013) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 368:1621.
Galloway, *et al.* (2003) BioScience 53:341-356.
Gage, D.J. (2004) Mol. Biol. Rev. 68:280-300.
Hirsch, A.M. (1992) New Phytol. 122:211-300.
Downie JA (2010) FEMS Microbiol Rev 34: 150-170.
Vanderlinde, E.M., *et al.* (2014) Environ. Microbiol. 16:205-217.
Brito, *et al.* (2008) Mol. Plant Microbe Interact. 21:597-604.
O’Gara, F. y Shanmugam, K.T. (1976) Biochim. Biophys. Acta. 437:313-321.

Implicación de la matriz extracelular de *Bacillus subtilis* en la interacción beneficiosa con la planta.

Berlanga-Clavero, M.V.^{1*}, Molina-Santiago, C.¹, Navarro, Y.¹, Sopena-Torres, S.¹, Blasco-Santamaría, M.L.¹, Pérez-García, A.², de Vicente, A.², Romero, D.^{1,2}

¹Departamento de Microbiología, Centro de Supercomputación y Bioinnovación, Universidad de Málaga, Calle Severo Ochoa 34 (Parque Tecnológico de Andalucía), 29590 Málaga. ²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, Bulevar Louis Pasteur, 31, 29071, Málaga. *mvictoriaberlanga@uma.es

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva comúnmente presente en los suelos. Algunos aislados de esta especie son capaces de promover el crecimiento en plantas (actividad PGPR, del inglés *plant growth promoting rhizobacteria*) y de contribuir al control de diferentes enfermedades microbianas mediante la producción de una amplia batería de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y la inducción de los mecanismos de defensa de la planta. Todo ello ocurre en el contexto de una eficiente colonización y persistencia sobre la raíz, la cual se cree estar asociada a la formación de biofilms: comunidades bacterianas donde las células están englobadas en una matriz extracelular de producción propia y compuesta principalmente por proteínas y exopolisacáridos. Estudios previos han demostrado que la surfactina, uno de los metabolitos secundarios producidos por esta bacteria, está involucrada en la cascada de señalización que dispara la formación del biofilm así como en la comunicación con la planta. Esta observación conduce a plantear la hipótesis de que algunos de los metabolitos secundarios u otros componentes estructurales de la matriz extracelular pueden ser mediadores de la comunicación bacteria-semilla y tener relevancia en la actividad PGPR. En este trabajo se evalúa el papel que los distintos componentes estructurales y metabolitos secundarios presentes en la matriz extracelular de *B. subtilis* puedan tener en la promoción de la germinación de semillas. Valiéndonos de una batería de mutantes en dichos elementos, realizamos ensayos de bacterización de semillas para estudiar posteriormente los patrones de colonización y persistencia bacteriana en la rizosfera y el efecto sobre la actividad PGPR. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que la molécula fengicina y la proteína TasA pueden ser claves en esta función de *B. subtilis*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por un programa European Research Council-Starting Grant-2014 (8.06 UE/60.8003) así como de un contrato con la empresa holandesa Koppert B. V., Research and development agreement (8.06/60.4086).

AmrZ regula la síntesis de exopolisacáridos y proteínas relacionadas con la formación de biopelículas y colonización de la rizosfera en *Pseudomonas fluorescens* F113.

Blanco-Romero, E. *, Gómez-Luengo, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Martín, M.
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Calle Darwin, 2.
28049. Madrid (España). *esther.blanco@uam.es

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas fluorescens F113 es una rizobacteria que promueve el crecimiento vegetal. El uso de *P. fluorescens* F113 como inoculante está condicionado por su capacidad para responder al ambiente y competir durante el proceso de colonización de la rizosfera. Recientemente se ha descrito que el nodo AmrZ/FleQ tiene un papel central en las respuestas de F113 en la adaptación al ambiente (Blanco-Romero *et al.*, 2018). AmrZ es un regulador transcripcional implicado en la regulación de la movilidad, formación de biopelículas, homeostasis de hierro y síntesis y degradación del segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP) (Martínez-Granero *et al.*, 2014. Muriel *et al.*, 2018). Los mutantes *amrZ* son hipermóviles, presentan una reducción en la formación de biopelículas, alteraciones en la morfología de la colonia y capacidad de unión a Rojo Congo, y están drásticamente afectados en la colonización competitiva de la rizosfera (Muriel *et al.*, 2018). Los análisis transcriptómicos llevados a cabo con el mutante en *amrZ* han demostrado que este factor de transcripción es necesario para la expresión de distintos genes/operones que codifican exopolisacáridos y proteínas extracelulares. El objetivo de este estudio es conocer la relevancia del c-di-GMP en el fenotipo de *amrZ* y analizar los mutantes en genes regulados por AmrZ para conocer sus implicaciones en la señalización en respuesta al ambiente rizosférico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo el análisis fenotípico de un mutante *amrZ* con niveles artificialmente elevados de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de una diguanilato ciclasa, PleD*, de *Caulobacter crescentus* (Romero-Jiménez *et al.*, 2015) integrada en el cromosoma. Se ha realizado un análisis transcriptómico mediante RNA-Seq para averiguar cuáles son los genes y operones regulados por AmrZ en *P. fluorescens* F113. Finalmente, se han obtenido mutantes en genes regulados por AmrZ para averiguar su papel en la movilidad, formación de biopelículas y colonización competitiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El incremento en los niveles de c-di-GMP en *P. fluorescens* F113 *amrZ* complementa el fenotipo de mayor movilidad y menor capacidad de formación de biopelículas. Sin embargo, la presencia de este segundo mensajero no es suficiente para que el mutante colonice competentemente la rizosfera. El análisis por RNA-Seq del mutante en AmrZ y el estudio genético y fenotípico de mutantes en genes regulados por este factor de transcripción, han revelado que el papel de esta proteína en el proceso de formación de biopelículas y colonización competitiva se lleva a cabo mediante el control de la síntesis de dos clústeres de genes (*pgaABCD* y *papA-P*) que codifican proteínas implicadas en la síntesis de los exopolisacáridos PNAG y Pap, y un operón (*fapABCD*) que codifica proteínas amiloides funcionales en *Pseudomonas* (FAP), entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por BIO2015-64480-R (MINECO/FEDER EU). EBR es beneficiaria de un Ayuda FPU (FPU16/05513) del MECD y ha recibido financiación de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco-Romero, E., *et al.* (2018) *Sci. Rep.* 8:13145.

Martínez-Granero, F., *et al.* (2014) *BMC Genomics* 15:237.

Muriel, C., *et al.* (2018) *Sci. Rep.* 8:1979.

Romero-Jiménez, L., *et al.* (2015) *BMC Microbiol.* 15:190.

Análisis de la mejora nutricional de cultivos de interés agroalimentario tras la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Jiménez-Gómez, A.^{1,2*}, García-Fraile, P.^{1,2}, Rivas, R.^{1,2,3}.

¹Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007. Salamanca. ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones agrarias (CIALE), Salamanca. ³Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC. *alexjg@usal.es

INTRODUCCIÓN

Vivimos en un escenario global donde la población mundial aumenta unos 70 millones de personas cada año, y donde se calcula que se alcanzará la cifra de 9500 millones en el año 2050 (Soby, 2013). Así pues, existe una necesidad alarmante de aumentar la producción de alimentos y el rendimiento de los cultivos sin afectar al medio ambiente (Jiménez-Gómez *et al.*, 2018). Sin embargo, se estima que el 33% de las tierras cultivadas presentan altos niveles de salinidad y que el ritmo anual de salinización aumenta un 1% anualmente (Jamil *et al.*, 2011), de modo que en el año 2050 el 50% de las tierras dedicadas a la agricultura presentarán altas concentraciones salinas.

En este sentido, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) de cultivos de interés agroalimentario permite mejorar las producciones agrícolas y la calidad nutricional de los cultivos en un medio ambiente cada vez más desfavorable para la práctica agrícola. Así, este trabajo se ha centrado en el análisis de la promoción vegetal y mejora nutricional de cultivos de escarola y cilantro crecidos en condiciones de salinidad tras la aplicación de fertilizantes basados en distintos géneros de bacterias como *Rhizobium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa *Rhizobium leguminosarum* PEPV40 y la cepa *Bacillus halotolerans* SCCPVE07 fueron aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris*. En caso de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 fue aislada de raíces de colza. La capacidad de los aislados para solubilizar fosfato fue analizada en medio YED-P. La producción de sideróforos fue evaluada usando el medio M9-CAS-AGAR y la producción de celulosa utilizando el medio de cultivo YMA o 869 suplementados con Rojo Congo (25 mg/l).

Para los ensayos de colonización e interacción de los primeros estadios se marcaron las cepas con el plásmido pHc60, las semillas fueron desinfectadas en superficie, inoculadas con 200 μ L planta⁻¹ de una suspensión bacteriana con una densidad de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL e incubadas en cámara iluminada. Plantas control sin inocular fueron también incluidas en el ensayo.

Las pruebas de invernadero se realizaron utilizando como sustrato de crecimiento una mezcla de turba-vermiculita (3:1). Cada planta fue inoculada con 5mL de suspensión bacteriana, con una densidad de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL. Las plantas se cultivaron con una humedad relativa de entre 45 y 50% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La temperatura oscilaba entre 20 y 25 °C. Todas las plantas fueron regadas con una solución salina de Farhaeus con 100 mM de NaCl. Tras un periodo de cultivo de 39 días, las plantas se recolectaron y se registraron valores de peso seco y peso húmedo.

Además, de todas las muestras se analizó el contenido en C, N, Ca, Mg, Mn, Fe y Na a través del Servicio de Ionómica (CEBAS-CSIC). El contenido en sustancias bioactivas de todas las muestras fue realizado por el Grupo de Investigación en Polifenoles de la Universidad de Salamanca.

RESULTOS Y DISCUSIÓN

Las cepas PEPV40, SCCPVE07 y CDVBN10 presentan mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* (solubilización de fosfato, producción de celulosa y producción de sideróforos. Los ensayos de promoción en los primeros estadios de desarrollo vegetal indican resultados significativamente superiores en peso seco y húmedo respecto a los tratamientos control. Los ensayos de colonización indican una capacidad exitosa de todas las cepas para colonizar la superficie de las raíces en los dos cultivos, aunque con claras diferencias entre tratamientos.

En cuando al análisis de la presencia de compuestos bioactivos, en el cilantro se observó la presencia de ácido vanílico, ácido 5-O-cafeoil-quínico, quercetina y kaempferol, mientras que en la escarola se observaron ácido cicórico, ácido caféico y ácido cafeoil-tartárico. En ambas plantas, la gran mayoría de los compuestos bioactivos detectados aparecen en cantidades significativamente superiores en las plantas inoculadas con las distintas cepas bacterianas respecto a las plantas control.

Todos estos resultados indican que las cepas de este estudio tienen la capacidad de promocionar tanto el desarrollo de las plantas como su contenido nutricional en condiciones de salinidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto AGL2015-70510-R del MINECO y a un contrato predoctoral FPU15/02774 del MECED.

BIBLIOGRAFÍA

- Soby, S.D. (2013) *J. Agric. Environ. Ethics* 26:537-546.
Jiménez-Gómez, A., *et al.* (2018) *Sci. Rep.* 8:295.
Jamil, A., *et al.* (2011) *Crit. Rev. Plant Sci.* 30:435-458.

Exploración genómica de *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 para el análisis de rutas metabólicas potencialmente implicadas en su capacidad de inhibición del fitopatógeno de colza *Phoma lingam*.

Saati-Santamaría, Z.^{1,2*}, Jiménez-Gómez, A.^{1,2}, Rivas, R.^{1,2,3}, García-Fraile, P.^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007. Salamanca. ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones agrarias (CIALE), Campus de Villamayor; C/ del Duero, 12; 37185 Villamayor. Salamanca (España).

³Unidad Asociada de Investigación USAL/IRNASA(CSIC). *zakisaati@usal.es

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas brassicacearum CDV10 es un endófito de *Brassica napus*, el cual hemos aislado de su raíz y caracterizado como un buen PGPR para ésta planta.

Phoma lingam (*Leptosphaeria maculans*) es un hongo fitopatógeno responsable de grandes pérdidas económicas en cultivos de *B. napus* (Plieske *et al.*, 1998). Al igual que este hongo, muchos otros son responsables de la pérdida de producción en cultivos agrícolas, por lo que para su remediación es necesario hacer uso de agentes químicos o de agentes de biocontrol, como pueden ser algunas bacterias (Compant *et al.*, 2005).

Dentro del género *Pseudomonas* existen multitud de ejemplos de cepas utilizadas como agentes de biocontrol (Chaudhari *et al.*, 2017). Entre ellas, se ha visto que la especie *Pseudomonas brassicacearum* puede inhibir otros microorganismos (Andersson *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2018). Además, este género bacteriano es responsable de la producción de muchos metabolitos secundarios de interés en diversas áreas (Gross y Loper, 2009; Saati-Santamaría *et al.* 2018). Este tipo de metabolitos, representan moléculas complejas que comúnmente se han usado como antimicrobianos y antifúngicos, entre otras actividades, por lo que podrían ser responsables del potencial de estas bacterias como agentes de biocontrol.

En esta nueva era en la que la Genómica está en auge, se remarca la utilidad de la información genética de los microorganismos para descubrir las posibles aplicaciones biotecnológicas que puedan tener (Harvey *et al.*, 2015).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de la capacidad de la cepa bacteriana *P. brassicacearum* CDVBN10 para inhibir al hongo fitopatógeno *P. lingam* (*L. maculans*). Se sembró la bacteria en medio de cultivo sólido PDA por triplicado y, tras 7 días de crecimiento a 28°C, se colocó un trozo de micelio del hongo a 2 cm de la bacteria, realizando lo mismo en las correspondientes placas de control (sin bacteria). El hongo se incubó durante 10 días a 25°C observando diariamente su crecimiento.

El ADN total de la cepa de *P. brassicacearum* CDVBN10 se obtuvo mediante el kit *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit* (ZYMO RESEARCH®). El borrador genómico bacteriano se obtuvo mediante la plataforma Illumina MiSeq. El ensamblaje de las secuencias genómicas se realizó con Velvet 1.2.10 y la anotación a través de RAST 4.0 (Aziz *et al.*, 2008). El estudio de la producción de metabolitos secundarios se ha llevado a cabo a través del programa AntiSMASH 4.0 (Blin *et al.*, 2017).

Se realizó un estudio comparativo del genoma de *P. brassicacearum* CDVBN10 frente a genomas completos de otras cepas de la misma especie depositados en GenBank. Las cepas referenciadas fueron *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421 (nº de acceso de GenBank: NC_015379.1), *P. brassicacearum* L13-6-12 (nº de acceso de GenBank: NZ_CP014693.1), *P. brassicacearum* LBUM300 (nº de acceso de GenBank:

NZ_CP012680.1) y *P. brassicacearum* DF41 (nº de acceso de GenBank: NZ_CP007410.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las placas de PDA en las que previamente se había crecido a *P. brassicacearum* CDVBN10 se observó un crecimiento no concéntrico del hongo *P. lingam* (*L. maculans*), el cual no creció en las proximidades de la siembra de *P. brassicacearum* CDVBN10, a diferencia de lo ocurrido en las placas control, en las que el desarrollo del hongo fue mayor y en círculos concéntricos. Esto indica que *P. brassicacearum* CDVBN10 inhibe el crecimiento del hongo fitopatógeno.

La prospección genómica de *P. brassicacearum* CDVBN10 reveló la presencia de diversas rutas metabólicas implicadas en la producción de sustancias que podrían ser responsables de la inhibición observada *in vitro*, entre las que se incluyen 4 NRPS (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*), 2 bacteriocinas, 1 lantipéptido y 1 aminoglucósido. Estas rutas no muestran similitud con otros *clusters* de genes descritos hasta el momento depositados en la base de datos de AntiSMASH, en la que se incluyen 1252 genomas del género *Pseudomonas*.

Tras la comparación de éstas rutas con la de los genomas completos de otras cepas de la misma especie, se observan diversas diferencias, entre las que destacan la presencia en el genoma de la cepa CDVBN10 de 2 bacteriocinas, 1 lantipéptido y 1 aminoglucósido que no se predicen en los genomas de las cepas referenciadas.

Estos resultados indican el gran potencial de *P. brassicacearum* y, en concreto, la cepa CDVBN10, para ser usado como agente de biocontrol e incluso para poder producir nuevas moléculas útiles tanto en agricultura como en la Industria Farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está financiado por la Comisión Europea a través del programa MSCA-IF-EF-ST mediante el proyecto No. 750795. ZSS disfruta de un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León; AJG disfruta de un contrato predoctoral FPU15/02774 del MEC. Agradecemos también al Centro de Diagnóstico Regional (Aldearrubia, Salamanca) su colaboración con los ensayos de inhibición frente a hongos fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Plieske, J., *et al.* (1998) *Appl. Genet.* 97:929-936.
- Compant, S., *et al.*, (2005) *Appl. Env. Microbiol.* 71:4951-4959.
- Chaudhari *et al.*, (2017) *Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production.* 351-390.
- Chung, *et al.* (2018) *Plant Pathol. J.* 24:461-468.
- Andersson, *et al.* (2009) *BioControl* 57:463-469.
- Gross, H. y Loper, J.E. (2009) *Nat. Prod. Rep.* 26:1408-1446.
- Saati-Santamaría, Z., *et al.* (2018) *Front. Microbiol.* 9:913.
- Harvey, A.L., *et al.* (2015) *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:111-129.
- Aziz, R.K., *et al.* (2008) *BMC Genomics* 9:75.
- Blin, K., *et al.* (2017) *Nucleic Acids Res.* 45:W36-W41.

Efecto bioestimulante y bioprotector de diferentes rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (P.G.P.R.): ensayos en *Arabidopsis thaliana*.

Sacristán-Pérez-Minayo, G.^{1*}, López-Robles, D.J.², Pieterse, C.M.J.³, Bakker, P.³

¹Área de Microbiología. ²Área de Edafología y Química Agrícola, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos. Plaza de Misael Bañuelos s/n. 09001. Burgos (España). ³Plant-Microbe Interactions, Department of Biology, Faculty of Biology, Utrecht University. Padualaan 8, 3584 CH. Utrecht (The Netherlands). *gsacristan@ubu.es

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos beneficiosos son bien conocidos por su utilidad en la agricultura. La mayoría de los estudios del empleo de PGPR se centran en el aumento del rendimiento y la producción agrícola de los cultivos. Las PGPR son capaces de desarrollar mecanismos directos e indirectos (Gutiérrez Mañero *et al.*, 2003). De manera directa, algunas cepas bacterianas pueden promover el crecimiento de las plantas al mejorar su nutrición, lo que hace que los nutrientes limitantes, como el fosfato, estén disponibles para las plantas y/o alteren su equilibrio hormonal. De manera indirecta, también pueden proteger a las plantas de patógenos por control biológico (mediante la competencia entre PGPR y los microorganismos patógenos en la rizosfera) o mediante la inducción de resistencia sistémica (ISR) a través de la promoción de ciertas vías metabólicas secundarias (Pieterse *et al.*, 2014).

En experimentos de campo previos, se ha observado que *Pseudomonas fluorescens* Aur6 y *Chryseobacterium balustinum* Aur9 podrían ser útiles como bacterias beneficiosas para mejorar el rendimiento y la producción de remolacha azucarera. Los valores más altos de biomasa, biomasa radicular, perímetro máximo de remolacha, polarización y valores de azúcar se encontraron en aquellas plantas de remolacha azucarera inoculadas con dichas PGPR.

El presente estudio se centra en la mejora de la producción de *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), pero tomando *Arabidopsis thaliana* como planta modelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se inocularon varias cepas PGPR de *Pseudomonas fluorescens* y *Chryseobacterium balustinum*. También se utilizó *Pseudomonas simiae* WCS417, cedida por el Grupo *Plant-Microbe Interactions* de la Universidad de Utrecht (Holanda). Esta última PGPR ha demostrado ejercer efectos beneficiosos en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, ejerciendo una Resistencia Sistémica Inducida. Se inocularon estas cepas PGPR mencionadas anteriormente en *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *Beta vulgaris* para estudiar los efectos que promueven el crecimiento mediante ensayos de placas *in vitro*. El medio de cultivo empleado en el crecimiento vegetal con y sin inóculo bacteriano fue el medio Murashige and Skoog (MS, Oxoid) suplementado con sacarosa al 1%.

Se anotó la “Longitud de la Raíz Primaria” (*Primary Root Length, PRL*) a los 3, 5, 7, 10 y 14 días para *A. thaliana* y 2, 5, 8, 9 para plantas de *B. vulgaris*. El último día de los ensayos de inoculación también se anotó la biomasa total, radicular y aérea, así como el “Número de Raíces Laterales” (*Lateral Root Number, LRN*).

Además, se realizó un experimento para evaluar el posible efecto de posibles compuestos orgánicos volátiles (VOC) producidos por bacterias sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*. Para ello se utilizaron placas Petri compartimentadas para el crecimiento conjunto de cepas PGPR (medio King B) y *Rhizoctonia solani* (medio PDA). Después de 20 días a temperatura ambiente, se midió el crecimiento del micelio a los 2, 5, 7 y 12 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos de *A. thaliana*, se pudo observar que las plantas inoculadas con Aur9 produjeron los valores más altos de biomasa total, aérea y total, en comparación con el control y también frente a otras plantas inoculadas con otras PGPR (Figura 1a). Además, la arquitectura de la raíz (fenotipo) de las plantas tratadas con bacterias mostró una mayor ramificación de la raíz, en relación con las plantas no inoculadas. Estas raíces mostraron los valores más altos del “Número de Raíces Laterales” (LRN), excepto las plantas B N17.35, en comparación con las plantas control. Finalmente, los valores más altos de “Longitud de Raíz Primaria” (PRL) se encontraron en plantas no inoculadas a lo largo del presente experimento (Figura 1b).

Por otro lado, el crecimiento de *R. solani* se inhibió por la presencia de todas las bacterias beneficiosas en los mismos ensayos de placas de Petri de 2 compartimentos (Figura 1c). Las bacterias beneficiosas evaluadas ejercen un efecto beneficioso sobre las plantas, destacando *Chryseobacterium balustinum* Aur9. En siguientes trabajos, se pretende estudiar la posible expresión del gen ISR mediada por la cepa Aur9 en plantas *Beta vulgaris*. La integración de estas bacterias beneficiosas PGPR en los sistemas agrícolas podría reducir los costos económicos, sociales y ambientales y podría mejorar el desarrollo sostenible.

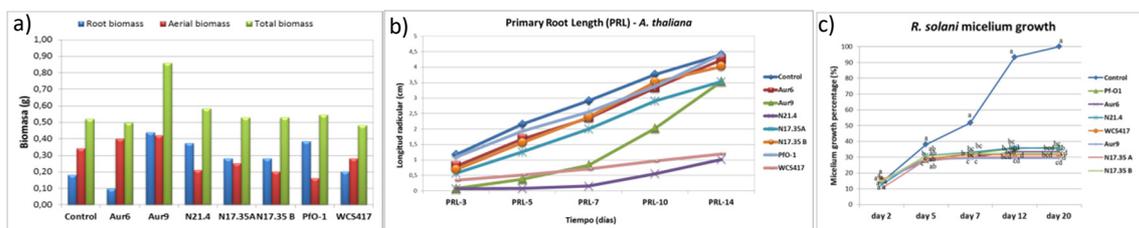


Figura 1. Efectos beneficiosos de la inoculación de diferentes PGPR en *A. thaliana*: a) biomasa total, radicular y aérea; b) Longitud de la Raíz Primaria (PRL) y c) crecimiento de *Rhizoctonia solani* en presencia y ausencia de cepas PGPR (ensayos de dos compartimentos). Los ensayos no tratados con inóculo bacteriano se muestran como “Control”.

BIBLIOGRAFÍA

Gutiérrez-Mañero, F.J., *et al.* (2003) *J. Plant Nutr.* 26:1101-1115.

Pieterse, C.M.J., *et al.* (2014) *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:347-375.

Papel del HPR como molécula señal en las interacciones multitróficas en la bacteria de control biológico *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606.

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

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. *sandrtienda@uma.es

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas chlororaphis PCL1606 es una rizobacteria aislada de arboles sanos de aguacate localizados en fincas afectadas por la podredumbre blanca radicular, enfermedad causada por *Rosellinia necatrix*. PCL1606 muestra capacidad antagonista y de biocontrol frente a *Rosellinia necatrix*, y también frente a otros hongos fitopatógenos de suelo (Cazorla *et al.*, 2006), debido principalmente a la producción de un compuesto antifúngico denominado 2 hexil, 5 propil resorcinol (HPR), el cual es crucial para el antagonismo y el biocontrol característico de esta cepa (Calderón *et al.*, 2013). Además, se ha comprobado que el HPR también influye en los procesos de colonización de PCL1606 en la raíz de aguacate (Calderón *et al.*, 2014).

Estudios recientes han demostrado que los resorcinoles, a los que pertenece el HPR, pueden actuar como molécula señal uniéndose a receptores LuxR y regulando distintos aspectos de la biología del microorganismo (Brameyer *et al.*, 2015).

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que el compuesto HPR, participa activamente en procesos claves de la biología de PCL1606, se analizará a nivel transcriptómico, la expresión/represión de los genes cuando se compara un mutante defectivo en la producción de HPR (mutante en el gen *darB*) frente a la cepa silvestre, identificando los fenotipos dependientes de la producción de HPR durante el proceso de interacción multitrófica, que se produce durante el control biológico de la podredumbre blanca radicular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de las muestras de RNA para el análisis transcriptómico, se extrajo RNA de la rizosfera de plantas de aguacate, previamente bacterizadas con las cepas bacterianas y en interacción con el hongo *Rosellinia necatrix*. La extracción de RNA total de rizosfera se realizó por triplicado usando el kit Qiagen RNeasy PowerSoil Total RNA (Qiagen, Hilden, Germany), con pequeñas modificaciones. Posteriormente, se limpió el RNA total de ribosomales con sondas Ribo-Zero Bacteria (Gram positivas y Gram negativas).

La secuenciación masiva de RNA total se realizó con el equipo NextSeq550 de Illumina y una vez secuenciado se sometieron a una rigurosa etapa de control de calidad utilizando SeqTrimNext (STN), un sistema para pre-procesar y limpiar lecturas procedentes de múltiples plataformas de ultrasecuenciación. Estas lecturas se alinearon con el genoma de PCL1606, y una vez contadas las lecturas mapeadas a cada gen y normalizados los datos, se obtuvieron los genes con expresión diferencial, que serán aquellos que muestren un p-value inferior a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de un análisis en profundidad de los datos de expresión diferencial, detectamos algunos genes que se encuentran reprimidos en el mutante no productor de HPR (mutante $\Delta darB$), es decir, genes que estarían regulados positivamente por el compuesto HPR.

En estos momentos nos encontramos validando hipótesis sobre la implicación de estos genes en la interacción multitrófica, y como intervienen en procesos biológicos implicados en formación de biofilm, colonización, biocontrol e inducción de sistema de resistencia en plantas, procesos fundamentales de la interacción de la bacteria con la planta y el hongo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía (AGL2014-52518-C2-1-R y AGL2017-83368-C2-1-R; MINECO, España) y cofinanciado con fondos FEDER (EU). S. Tienda está siendo financiada con una ayuda del programa FPI del MINECO.

BIBLIOGRAFÍA

- Brameyer, S., *et al.* (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112:572-577
Calderón, C.E., *et al.* (2013) Mol. Plant-Microbe Interact. 26:554-565.
Calderón, C.E., *et al.* (2014) FEMS Microbiol. Ecol. 86:20-31.
Cazorla, F.M., *et al.* (2006) Mol. Plant Microbe Interact. 19:418-428.

**Sesión VI: Interacciones microorganismos patógenos-plantas
(Microorganismos Beneficiosos 3)**

Moderadora: Marta Martín Basanta.

Estudio de las interacciones beneficiosas de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T con diferentes leguminosas.

Díez-Méndez, A.^{1,2,3*}, Menéndez, E.^{1,2,3}, Rivas, R.^{1,2,3}, Mateos, P.F.^{1,2,3}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007. Salamanca. ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones agrarias (CIALE), Salamanca. ³Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC. *alexandradm@usal.es

INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones simbióticas *Rhizobium*-leguminosas son de gran interés, no sólo por su importancia económica y medio ambiental, sino también por constituir un modelo para el estudio y la comprensión de las interacciones planta-microorganismo (Okazaki *et al.*, 2015). Durante el desarrollo simbiótico, existe un diálogo molecular altamente regulado entre el macro y el microsimbionte (Marczak *et al.*, 2017). No obstante, los pelos radiculares desempeñan un papel crucial, ya que constituyen la principal vía de entrada de los rhizobia (Gage, 2004). Estos responden a las señales emitidas por los rhizobios con diferentes tipos de redirecciones radiculares (RHD) influenciadas en primera estancia por los factores de nodulación (NF) (Esseling *et al.*, 2004). No obstante, se ha descrito el papel crucial de otras moléculas simbióticas como es el caso de la celulasa bacteriana CelC2 dentro del modelo simbiótico *Trifolium repens*-*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (Robledo *et al.*, 2011). En este trabajo, mostramos la capacidad de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T, una cepa super-productora de celulosa y celulasas (Robledo *et al.*, 2012), en colonización, infección y promoción del crecimiento vegetal en diferentes leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* y *Trifolium repens*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias empleadas. Las cepas bacterianas empleadas en este estudio fueron: *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T wt aislada de la corteza en descomposición de *Populus alba* (García-Fraile *et al.*, 2007), el transconjugante ALA10B2^T_RFP derivada de ALA10B2^T wt, y la cepa TPV08 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, aislada de nódulos efectivos de *Phaseolus vulgaris* (García-Fraile *et al.*, 2012).

Plantas empleadas. Para evaluar el comportamiento simbiótico de ALA10B2^T se diseñaron diferentes experimentos con diferentes leguminosas tales como *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris* y *Trifolium repens*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados indicaron que la cepa ALA10B2^T wt mostraba un mismo patrón de comportamiento en todas las leguminosas analizadas. Observándose una gran colonización tanto en la superficie radicular, como en los pelos radiculares, y una gran formación de biofilms. Asimismo, se observaron diferentes fenotipos radiculares como Rat (redirections at the tip), Had (Root hair deformation), formación de “caps”, Has (Root Hair Sewlling) indicando la existencia de una interacción entre ambos simbioses. Sin embargo, en ninguna de las leguminosas, se observaron el fenotipo Hac (marked curling)

of root hairs, the so-called “sherpel’s cook”), el fenotipo Hot (Hole on the tip), canales de infección (IT) ni nódulos. Al realizar estudios de co-inoculación con la cepa TPV08, se observó un incremento estadísticamente significativo de la producción de *Phaseolus vulgaris* (Diez-Mendez *et al.*, 2015). Al estudiar de un modo más detallado las co-inoculaciones, se observó que la cepa ALA10B2^T es capaz tanto de colonizar la superficie radicular y los pelos radicales, así como de alojarse en el interior de los nódulos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto AGL2015-70510-R del MINECO.

BIBLIORAFÍA.

- Diez-Mendez, A., *et al.* (2015) *Symbiosis* 67:135-141.
Esseling, J.J., *et al.* (2004) *Plant Cell* 16:933-944.
Gage, D.J. (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 280-300.
García-Fraile, P., *et al.* (2012) *PLoS One* 7:e38122.
García-Fraile, P., *et al.* (2007) *Int J Syst Evol Microbiol* 57:844-848.
Marczak, M., *et al.* (2017) *Genes* 8(12):360.
Okazaki, S., *et al.* (2015) *ISME J.* 10:64-74.
Robledo, M., *et al.* (2011) *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:798-807.
Robledo, M., *et al.* (2012) *Microb. Cell Fact.* 11:125.

***Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 is a plant growth promoting rapeseed endophyte with the capability to colonize and infect *Brassica napus* roots.**

Jiménez-Gómez, A.^{1,2}, Saati-Santamaría, Z.^{1,2}, Rivas, R.^{1,2,3}, Mateos, P.F.^{1,2,3}, García-Fraile, P.^{1,2*}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina, SN. 37007. Salamanca (España). ²Instituto Hispanoluso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor; C/ del Duero, 12; 37185 Villamayor. Salamanca (España). ³Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC. *paulagf81@usal.es

INTRODUCTION

One of the main challenges for humanity during next decades will be to increase food production while using scarce resources and protecting the environment, being therefore one of the priorities of the European Program “Horizon 2020”. Plant’s productivity can be enhanced by the activity of Plant Growth-Promoting (PGP) bacteria, applied in agricultural fields as biofertilizers or plant probiotics, constituting an environmental friendly manner to increase crop yields. Biofertilizers have been applied in Agriculture during decades, but in many cases bacteria which showed great PGP potential in lab conditions, fail when applied in natural soils, probably because they are out-competed by the soil native microbial populations or they are unable to adapt to the new environmental conditions (Bromfield *et al.*, 1986). This fact arises the interest of the PGP potential of bacterial endophytes -those bacteria with the ability to enter the endorhiza (root inside) – since, once inside the plant, they do not need to compete with the dense population of bacteria in the rhizosphere and they are protected from extreme abiotic conditions.

Rapeseed (*Brassica napus*) is an important crop in Spain and in the EU, cultivated not only as food resource (human and animal), but also as bioenergy crop. Therefore, the aim of this work was to isolate a rapeseed bacterial endophyte with the capability to promote rapeseed plants growth and effectively colonize the internal tissues of the rapeseed roots, which could be a potential good candidate for the development of an efficient biofertilizer for *B. napus* crops.

MATERIAL AND METHODS

Rapeseed plants were collected from different fields with established crops in the stage of rosettes. Plants were transported to the lab and repeatedly washed in aseptic conditions with sterile water. Then, roots were excised and outer sterilized with a 2% sodium hypochlorite solution for 2 min followed by several rinses with sterile water. Then, they were smashed with a sterile mortar, serially diluted in MgSO₄ saline solution (10mM) and the suspensions were plated in Petri dishes containing different growth media. Bacterial colonies appearing in those plates were isolated in order to obtain pure cultures for further studies.

First, all the strains were *in vitro* screened for PGP traits -potassium solubilization and siderophores production- as well as for mechanisms potentially involved in root colonization and infection processes -production of cellulose, cellulases, pectinases and xylanases-. For P-solubilization and siderophores and cellulose production assays, we followed the methodologies described in Jiménez-Gómez *et al.* (2018). For the enzymatic assays, we used the double-layer method described by Mateos *et al.* (1992).

To test the capability of the strains to promote rapeseed seedlings, seed were surface sterilized and germinated in water-agar Petri dishes place at RT in darkness. Afterwards, germinated seeds were transferred to 12 cm squared plates containing Hoagland medium

and each plant was inoculated with 200 μ L of a bacterial suspension of $1 \cdot 10^6$ cfu/mL. Control plants inoculated with 200 μ L of water also included. Plates were placed inside a growth chamber and different sets of plants collected and evaluated (aerial part length, root length and number of secondary roots) at 5, 7 and 10 dpi.

For root surface colonization and root infection studies, plants were inoculated and grown as explained above. Root colonization analysis was performed with a contrast phase microscope and, for some selected candidates, using SEM. To study plant infection capability, roots from plants inoculated with GFP-labelled strains obtained as detailed by Jiménez-Gómez *et al.* (2018) and were observed with a confocal microscope.

Genome sequence of the best PGP candidate was obtained in an Illumina Mi-Seq platform following the protocol described in Saati-Santamaría *et al.* (2018) and genom mining of genes related to PGP was performed after automatic annotation using RAST (Aziz *et al.*, 2018).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 110 bacterial endophytes were isolated from outer sterilised rapeseed roots.

The 10 best bacterial strains according to the *in vitro* tests were selected to assay plant growth promotion in rapeseed seedlings. Some strains showed a good capability to promote rapeseed plants in their first stages, while others proved to be pathogenic.

Moreover, these strains were identified based on their 16S rRNA sequence, which showed their relatedness to the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Massilia*, *Acidovorax* and *Staphylococcus*.

One of the best non-pathogenic bacteria in the promotion of rapeseed seedlings development was the strain CDVBN10, which was identified as *Pseudomonas brassicacearum*. This strain showed a very good capability to colonize rapeseed roots surface and colonize the inner tissues of the roots, appearing mainly in the intercellular spaces, but also inside some cortical cells.

Analysis of *P. brassicacearum* CDVBN10 genome sequence showed the presence of several genes related to PGP capabilities.

Therefore, the results obtained in these study show how the PGP strain *P. brassicacearum* CDVBN10 has the capability to colonize and infect rapeseed roots, improving the performance of the plants in their first stages of development. Greenhouse and field experiments are being performed in order to determine if strain CDVBN10 could be used as an efficient bacterial biofertilizer which could be applied in rapeseed crops after further convenient tests to guarantee its safety for human health and the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by European Commission through the MSCA-IF-EF-ST Grant No. 750795.

BIBLIOGRAFÍA

- Aziz, R.K., *et al.* (2018) BMC Genomics 9:75
Bromfield, E.S.P., *et al.* (1986) Appl. Environ. Microbiol. 51:1077
Jiménez-Gómez, A., *et al.* (2018) Sci. Rep. 8:295
Mateos, P.F., *et al.* (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:1816
Saati-Santamaría, Z., *et al.* (2018) Front. Microbiol. 9:913.

Mejora del contenido en antocianos en cultivo intensivo en fresa con microorganismos beneficiosos.

Gutiérrez-Albanchez, E.^{1,2*}, García-Villaraco, A.¹, Bernal-Govaerts, A.¹, Lucas, J.A.¹, Varó, A.², Ramos-Solano, B.¹

¹Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU Universities. PO Box 67. 28668. Boadilla del Monte (España). ²BIOBAB R&D, C/Bajada de Vargas 1, 35260 Agüimes, Las Palmas. *enrique.gutierrezalbanchez@ceu.es

INTRODUCCIÓN

La fresa es un cultivo con un alto impacto socioeconómico, dado que ocupa una gran superficie de producción en España especialmente importante porque es contraestación, cuando más valor tienen las frutas. Las fresas son un producto con gran valor nutricional por su alto contenido en polifenoles, que han evidenciado tener efectos positivos sobre la salud. Concretamente los antocianos, responsables del color rojo de los frutos, son responsables de prevenir la aparición de algunos síntomas relacionados con el síndrome metabólico, como obesidad, inflamación y diabetes tipo II (Gutiérrez-Albanchez *et al.*, 2018). Al cultivarse en condiciones adversas, con días cortos y bajas temperaturas, la coloración de la fruta se ve comprometida en los meses más fríos y encontrar alternativas para mejorar esta característica es importante desde el punto de vista económico y sobre la salud humana. La aplicación de microorganismos beneficiosos a las plantas es una herramienta útil para modificar el contenido en antocianos de los frutos, ya que estos compuestos pertenecen al metabolismo secundario, que está diseñado para mejorar la adaptación al medio de la planta (Ramos-Solano *et al.*, 2014). Existen diferentes moléculas que comunican la planta y los microorganismos que componen su microbioma, los elicitores, (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2015) por lo tanto, no se puede descartar que la combinación de microorganismos eficientes pueda tener efectos diferentes de cada microorganismo por separado.

Por tanto, en este trabajo nos hemos planteado evaluar la capacidad de dos cepas estimulantes del metabolismo de compuestos fenólicos cuando se aplican de forma individual o combinadas en fresa, concretamente para mejorar los parámetros nutricionales (pH, brix, ácido cítrico) y bioactivos (fenoles, flavonoles y antocianos) durante la campaña 2017-2018.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas de fresa (var. Fortuna) se llevaron a campo a invernaderos de producción en la provincia de Huelva en el mes de octubre y se mantuvieron con el manejo habitual hasta finales de mayo.

El diseño experimental incluye 4 tratamientos, un control, la cepa de *Pseudomonas* (P), la de *Bacillus* (B) y una combinación de las dos; todos los tratamientos incluyen la misma concentración de algas como soporte orgánico. Se realizaron 5 aplicaciones en el riego desde noviembre hasta marzo, tomando muestras de fruta en enero (1), febrero (2), marzo (1), abril (1), mayo (1). Se analizaron parámetros nutricionales (pH, grados Brix, ácido cítrico) y bioactivos (fenoles, flavonoles, antocianos). Se analizó la fotosíntesis en el mes de enero.

En primer lugar, se realizó un análisis multivariante con todos los datos para identificar los factores que más peso tenían en la calidad de la fresa. A continuación, para valorar el efecto de los tratamientos sobre la calidad de la fresa se realizaron ANOVAs bidireccionales para poder valorar el efecto del tratamiento y el tiempo, y la interacción de ambos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis multivariante indicó que el factor más influyente en la separación de las muestras era el momento de muestreo, ya que las muestras de un mismo tiempo se agrupan entre sí, separándose las muestras de enero, de las de febrero y ambas del resto. La hipótesis de trabajo parte de la estimulación del metabolismo de la planta por las bacterias aplicadas, y dentro de ella se contempla la fotosíntesis como primer punto de estimulación por ser la forma de incorporar energía y C al sistema. Ninguna de las bacterias modifica los parámetros correspondientes a la fase luminosa del proceso de forma significativa, y, sin embargo, la fijación de carbono se ve aumentada por la combinación de ambas cepas de forma significativa con respecto al control, y a las cepas individuales.

Los parámetros nutricionales apenas se ven afectados por los tratamientos y, sin embargo, sí se ven afectados por el momento de muestreo, y en la interacción, como indica el ANOVA bidireccional. El factor que menor respuesta presenta es el pH, que oscila entre 3.2 y 3.8 según el momento de muestreo. Los valores de grado brix oscilan entre 4 en el mes de marzo y 10 en el mes de enero, y no existen diferencias significativas debido al tratamiento salvo en el mes de enero, en el que el *Bacillus* provoca un incremento significativo en los grados brix, que no se debe a ácido cítrico; este parámetro varía ligeramente por el efecto del tratamiento combinado de las dos cepas en algunos momentos de muestreo.

Por el contrario, los bioactivos sí se ven afectados de forma significativa tanto por los tratamientos como por el tiempo de muestreo, y en la interacción, según el ANOVA bidireccional. Los fenoles totales oscilan entre los 110 y los 170 meq. Ácido gálico/100 g PF, en los meses de marzo y enero, respectivamente; en enero y marzo, todos los tratamientos aumentan el contenido en fenoles de forma significativa. Con respecto a los flavonoles, los valores oscilan entre los 4 meq. catequina/100 g PF de enero y los 15 meq. catequinas/100 g PF de abril en los controles; el tratamiento combinado destaca en enero, febrero (26) y mayo, mientras que el tratamiento con *Bacillus* destaca en febrero (8), marzo y mayo con respecto al control. Por último, los antocianos son los más afectados por las inoculaciones bacterianas, oscilando los valores en los controles entre los 2 meq. cianidina/100 g PF de enero y el máximo de 7 meq. cianidina/100 g PF que alcanza en abril y mayo; las cepas individuales siempre son mejores que la combinación, salvo en los meses de abril y mayo. El efecto de las cepas mejorando el contenido en antocianos es parecido, duplicando el contenido del control en los meses de enero y febrero, y con un aumento de un 30% aproximadamente en los meses de marzo, abril y mayo (Gutiérrez-Albanchez *et al.*, 2018). Por tanto, la aplicación de las dos cepas combinadas no supone un efecto sinérgico. Este efecto supone un potencial éxito comercial de estos productos ya que un aumento en la coloración de antocianos especialmente en los momentos iniciales de producción supone un enorme valor comercial con respecto a otros competidores cuyos frutos están menos coloreados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a BIOBAB R&D. Se agradece la ayuda técnica de Angela Budia.

BIBLIOGRAFÍA

- Gutiérrez-Albánchez, E., *et al.* (2018) J. Sci. Food Agric. doi: 10.1002/jsfa.9507
Gutiérrez-Mañero, F.J., *et al.* (2015). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 4:224-241.
Ramos-Solano, B. *et al.* (2014) Plant Physiol. Biochem. 74C:1-8.

El uso de rizobacterias para mejorar la capacidad defensiva de las plantas contra patógenos a través de la elicitación de los mecanismos de resistencia sistémica y sus interacciones con las rutas de transducción de señal mediadas por ácido salicílico y ácido jasmónico/etileno

Martín-Rivilla, H. *, García-Villaraco, A., Ramos-Solano, B., Gutiérrez-Mañero, F.J., Lucas, J.A.

Grupo Interacción Planta-Microbioma. Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU Universities, Boadilla del Monte, Madrid, España. *helenamartin92@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se están utilizando cada vez más en el control de plagas, como alternativa biotecnológica a los agroquímicos, dentro del marco de una agricultura sostenible. Algunas cepas son capaces de inducir o estimular el metabolismo defensivo de la planta, proceso conocido como inducción de resistencia sistémica (ISR). Si el metabolismo defensivo está activado, la planta se encuentra en un estado fisiológico, llamado *priming* (Conrath *et al.*, 2002), en el cual es capaz de desencadenar sus defensas de manera más rápida, más fuerte o ambas cosas a la vez cuando se produce el ataque de un patógeno.

El estudio de las rutas de transducción de señal que se activan tras la detección de una PGPR o de alguno de sus elicitores es fundamental para poder entender el sistema inmunitario vegetal y su interacción con los patógenos. Estas rutas de señalización son aquellas mediadas por ácido salicílico (SA) o ácido jasmónico/etileno (JA/ET).

En este trabajo se llevó a cabo un *screening* de 175 bacterias aisladas de la rizosfera de *Nicotiana glauca* con el objetivo de seleccionar las cepas con mayor capacidad de inducción de resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana* frente al patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000. Además, para conocer cuáles eran las rutas de transducción de señal elicidadas, se estudió la expresión diferencial de genes marcadores de las rutas del SA y del JA/ET.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las bacterias empleadas en dicho trabajo fueron aisladas de la rizosfera de plantas silvestres de *N. glauca* en tres suelos diferentes (Ramos Solano *et al.*, 2010a). Se secuenciaron e identificaron mediante técnicas de 16S ADNr y se agruparon en un árbol filogenético mediante el programa MEGA v4.0.2. A cada bacteria se le realizaron distintos test de actividad PGPR, como solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético, quitinasas y sideróforos.

Con los resultados obtenidos del árbol filogenético y de las pruebas PGPR se seleccionaron 25 cepas para la realización de un clásico experimento de inducción de resistencia sistémica frente al patógeno modelo DC 3000. Las bacterias se inocularon a nivel radicular y el patógeno a nivel foliar en *A. thaliana*. El porcentaje de protección de las cepas se calculó en base al número de hojas con síntomas de infección frente al total y se relativizó con respecto a un control negativo considerado como el 0% de protección. Con las 6 bacterias con mejores índices de protección se realizó un segundo experimento de ISR para el análisis de la expresión diferencial por *qPCR* de genes marcadores de rutas de transducción de señal: *NPR1*, *ISC*, *PR1* y *PR2* como genes marcadores de la ruta del SA y *PDF1*, *LOX2*, *MYC2* y *PR3* como marcadores de la del JA/ET.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 25 cepas seleccionadas para el experimento de ISR, 6 mostraron los valores más altos de protección: N 5.12, N 8.17, N 12.34, N 21.24, N 4.1 y N 5.20. Con estas cepas se realizaron análisis de expresión diferencial por *q*PCR de genes marcadores de rutas de transducción de señal a las 6, 12 y 24 horas tras la inoculación del patógeno. El efecto producido por dichas bacterias en los genes marcadores estudiados se resume en tres comportamientos: altos valores de expresión diferencial a las 6 horas (N 5.12 y N 21.24), a las 12 horas (N 12.34) y a las 24 horas (N 8.17 y N 4.1) tras la inoculación del patógeno. N 5.20 mostró un efecto variable en función de los distintos genes estudiados.

Los valores más altos de expresión se vieron con N 12.34 (Figura 1), donde se observan genes marcadores de ambas vías altamente expresados 12 horas tras la inoculación del patógeno. Estos resultados indican que estas rutas no siempre actúan de manera antagonista como se pensaba hasta entonces (Caarls *et al.*, 2015).

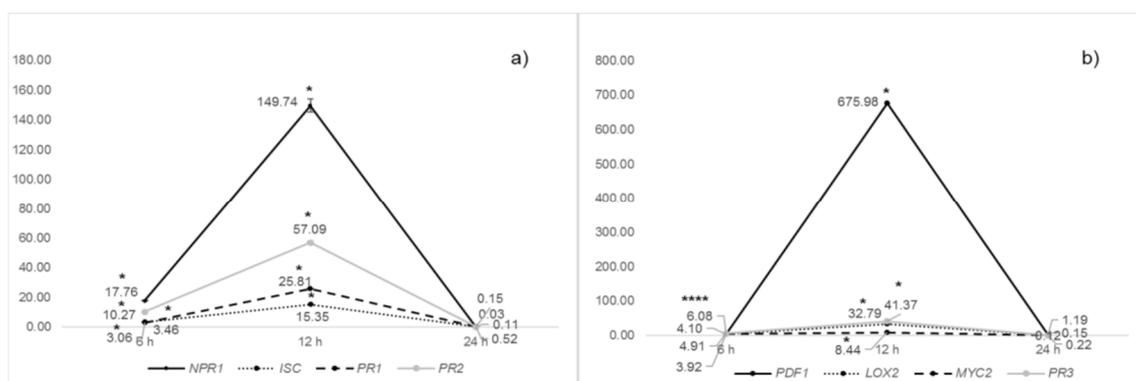


Figura 1. Expresión diferencial 6, 12 y 24 horas tras la inoculación del patógeno en plántulas de *A. thaliana* inoculadas con la cepa N 12.34 de los genes: a) *NPR1*, *ISC*, *PR1* y *PR2*, como genes marcadores de la ruta del SA y b) *PDF1*, *LOX2*, *MYC2* y *PR3*, como marcadores de JA-ET. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto del control.

Con este experimento, queda patente que, a pesar de tratarse de rizobacterias filogenéticamente cercanas, cada una se comporta de una manera distinta cuando se está elicitando el metabolismo defensivo de las plantas. Esto es muy interesante puesto que abre una multitud de alternativas biotecnológicas y de elicitación del metabolismo defensivo en distintas situaciones y ambientes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al Ministerio de Economía y Competitividad a través de la financiación obtenida del proyecto AGL-2013-45189-R.

BIBLIOGRAFÍA

- Caarls, L., *et al.* (2015). *Front. Plant Sci.* 6:170.
Conrath, U., *et al.* (2002). *Trends Plant Sci.* 7: 210-216.
Ramos Solano, B., *et al.* (2010a). *Trends Plant Sci.* 7:210-216.

Respuestas de plantas crucíferas (*Brassicaceae*) a la aplicación combinada de *Trichoderma* y hongos micorrícicos arbúsculares.

Poveda, J.^{1,2*}, Hermosa, R.^{2,3}, Monte, E.^{2,3}, Nicolás, C.^{1,2}

¹Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca. Salamanca (España).

²Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca. C/ Del Duero, 12, 37185, Villamayor, Salamanca (España). ³Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Salamanca (España). *jorgepoveda@usal.es

INTRODUCCIÓN

Trichoderma es un género de hongos filamentosos que incluye diversas especies ampliamente estudiadas y utilizadas como agentes de control biológico en agricultura, debido a mecanismos de acción como el micoparasitismo, la antibiosis, la competición, 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 (Lorito *et al.*, 2010).

Por otro lado, los hongos micorrícicos arbúsculares (AMF) son capaces de establecer relaciones simbióticas con la mayoría de plantas terrestres, incluyendo especies con un elevado interés agronómico (Baum *et al.*, 2015). A través de esta simbiosis mutualista, la planta recibe un mayor aporte de agua y nutrientes, además de una mejora en su tolerancia frente a estreses abióticos y resistencia frente a bióticos, mientras que los hongos reciben azúcares producidos en la fotosíntesis vegetal (Lenoir *et al.*, 2016; Roth y Paszkowski, 2017). Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de plantas que han perdido evolutivamente la capacidad de relacionarse simbióticamente con los AMF, este es el caso de la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*) (Delaux, 2017). En este grupo destacan por su gran importancia económica las plantas del género *Brassica*, que incluyen especies de interés agronómico como *B. oleraceae* (brócoli, coliflor, repollo), *B. rapa* (nabo) y *B. napus* (colza), además de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Huang *et al.*, 2015).

El objetivo del presente estudio ha sido determinar los posibles mecanismos implicados en la interacción de *Trichoderma* con crucíferas, en presencia y ausencia de AMF, y analizar qué efectos produce la aplicación combinada de ambos hongos sobre la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo silvestre Col-0, junto con dos mutantes deficientes en las rutas señaladas por ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), además de dos variedades comerciales de tomate y colza. Los hongos utilizados fueron la cepa T34 de *Trichoderma harzianum* y un formulado comercial con 5 especies diferentes de AMF, que se aplicaron de forma individual o combinada a las tres especies vegetales. Los niveles de colonización fúngica se determinaron mediante PCR cuantitativa (*qPCR*), como previamente se describe en Alonso-Ramírez *et al.* (2014), sobre plantas procedentes de los diferentes tratamientos. Los niveles de expresión de genes marcadores de defensa en planta se determinaron mediante *qPCR* como previamente se describe en Montero-Barrientos *et al.* (2011). Además, se determinaron las posibles diferencias en productividad observadas en cada una de los diferentes tratamientos ensayados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo que se refiere a la productividad de *A. thaliana* y colza, la inoculación de T34 causó un significativo aumento en su capacidad de formación de silicuas, mientras que la presencia de los AMF redujo significativamente esta capacidad. Estos resultados están de acuerdo con trabajos publicados por otros autores (Veiga *et al.*, 2012). Por otro lado, la aplicación de T34 y AMF a las plantas produjo un significativo aumento en su

productividad, probablemente debido al incremento en los niveles de colonización radicular detectados para T34 y a la colonización por AMF. En plantas de tomate se observó un perfil de colonización muy diferente. Por lo tanto, la aplicación combinada de T34 y AMF propició la colonización radicular de *A. thaliana* y colza por parte de AMF, posiblemente gracias a la modificación de las condiciones radiculares causadas por T34. Los cambios en los perfiles de expresión de genes de defensa en plantas de *A. thaliana* y tomate, en respuesta a la aplicación de AMF fueron muy diferentes en ambas especies vegetales. El aumento en la expresión de los genes relacionados con SA en *A. thaliana*, no ocurrió en las plantas de tomate. Estos datos abrirían la puerta a una posible relación entre una respuesta defensiva mediada por SA en crucíferas y la ausencia de micorrización de sus raíces. Para confirmar esta hipótesis, se analizaron las respuestas a T34 y AMF en mutantes de *A. thaliana* incapaces de sintetizar SA o JA, observando colonización radicular únicamente en las plantas mutadas en la ruta de SA.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto MINECO AGL2015-70671-C2-1-R y Proyecto de la Diputación de Salamanca “Selección de bioestimulantes microbianos para su aplicación en cultivos herbáceos extensivos”.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Ramírez, A., *et al.* (2014) *Mol. Plant Pathol.* 15:823-831.
Baum, C., *et al.* (2015) *Sci. Hortic.* 187:131-141.
Delaux, P.M. (2017) *New Phytol.* 213:89-94.
Huang, C.H., *et al.* (2016) *Mol. Biol. Evol.* 33:394-412.
Lenoir, I., *et al.* (2016) *Phytochemistry* 123:4-15.
Lorito, M., *et al.* (2010) *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:395-418.
Montero-Barrientos, M., *et al.* (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3009-3016.
Roth, R. y Paszkowski, U. (2017) *Curr. Opin. Plant Biol.* 39:50-56.
Veiga, R.S.L., *et al.* (2012) *Plant Soil* 360:319-331.

Evaluación de la capacidad nematocida de los agentes de biocontrol UMAF6614 y UMAF6639.

Vela-Corcía, D.* , de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D.

Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071 Málaga, España. *dvela@uma.es

Los nematodos fitoparásitos son uno de los grupos de patógenos de cultivos más destructivos causando graves pérdidas anuales a nivel mundial. La mayoría de los nematodos fitoparásitos se localizan en el suelo siendo patógenos de la raíz, lo que implica una gran dificultad en cuanto a su control y erradicación. Hoy en día, la aplicación de agentes químicos sigue siendo el método más común para la gestión y control de estos patógenos. Sin embargo, debido a las crecientes preocupaciones sobre los problemas de seguridad del medio ambiente y salud pública, muchos nematocidas químicos con alto grado de toxicidad se han retirado o se ha restringido su uso. Por tanto, urge desarrollar alternativas ecológicas para el control de estos patógenos.

El empleo de bacterias beneficiosas para combatir plagas o enfermedades de plantas ha cobrado gran importancia en las últimas décadas. Entre las diferentes especies microbianas estudiadas, los miembros del género *Bacillus* se han demostrado eficaces para su uso como agentes de control biológico. En estudios previos, se demostró que las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, UMAF6614 y UMAF6639, son excelentes candidatas como agentes de biocontrol contra enfermedades fúngicas y bacterianas de las cucurbitáceas.

Tras realizar los ensayos de mortalidad se ha visto que estas cepas tienen actividad nematocida pero se desconoce cuáles son los factores que median esta actividad y el modo de acción de dichos factores. Por tanto, en este trabajo se integran técnicas de química analítica y aproximaciones genómicas para identificar los compuestos responsables de dicha actividad y regiones en el genoma que codifiquen compuestos con actividad nematocida.

**Sesión VII: Interacciones microorganismos patógenos-plantas
(Microorganismos Beneficiosos 4)**

Moderador: Pedro F. Mateos González.

Uso de rizobacterias halófitas en la adaptación de cultivos al cambio climático.

Bernabeu-Meana, M.^{1*}, Mesa-Marín, J.¹, Mateos-Naranjo, E.¹, Pérez-Romero, J.A.¹, Pajuelo, E.², Rodríguez-Llorente, I.D.², Redondo-Gómez, S.¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España. ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España. *mbernabeu1@us.es

INTRODUCCIÓN

La salinización de los suelos es un problema creciente en la agricultura a nivel mundial. Las plantas cultivadas se ven cada vez más afectadas por los efectos negativos que esto conlleva. En este escenario aparecen las halófitas como posible fuente de nuevos cultivos y como herramientas biológicas para el diseño de estrategias de fitorremediación. Existe una gran diversidad de plantas halófitas, las cuales se caracterizan por acumular altas concentraciones de sal en sus tejidos, así como presentar buen crecimiento cuando son irrigadas con agua de mar. Las bacterias de su rizosfera, mediante diferentes mecanismos, ayudan a la planta a crecer y adaptarse a varios tipos de estrés. Esto cobra especial importancia teniendo en cuenta que el Cambio Climático conllevará variaciones medioambientales a las cuales los cultivos actuales tendrán que adaptarse. A pesar de su potencial, existen pocos estudios que utilicen las plantas halófitas o las bacterias de su rizosfera en la adaptación de los cultivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un experimento de germinación en placa con semillas de la halófito *Salicornia ramossissima*, las cuales fueron inoculadas con 5 consorcios de rizobacterias aisladas de diferentes especies de halófitas. Colocadas en diferentes cámaras de cultivo, se usaron distintas concentraciones de CO₂, salinidad y temperatura para simular un escenario futuro de Cambio Climático.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siendo la ratio de germinación, la biomasa y la fluorescencia los parámetros analizados, no se apreció un patrón general ligado a la inoculación de las plantas, pero sí con varios inóculos concretos, en condiciones de alto CO₂ y alta temperatura, se mejoró la germinación y el crecimiento de las plántulas.

Estamos ante el nacimiento de una fuente natural de recursos para la adaptación de los cultivos y ecosistemas actuales mientras el Cambio Climático se hace cada vez más patente.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2016-75550-R, AEI/FEDER, UE). Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (ref. FPU014/03987). Junta de Andalucía y Fondo Social Europeo (ESF) (Sistema Nacional de Garantía Juvenil y Programa Operativo de Empleo Juvenil 2014-2020, ref. J-323). Servicio General de Invernadero de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

Selección de cepas de *Trichoderma* para su uso como bioestimulante de plantas de tomate bajo condiciones de estrés abiótico.

Bovolini, M.P.* , Hermosa, R., Martínez-Fernández, J., Monte, E.
Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca. Rfo Duero, 12, Campus de Villamayor, 37185. Salamanca. *marcielibovolini@usal.es

INTRODUCCIÓN

Trichoderma es un género de hongos de gran importancia en los ecosistemas que habita, por ser un eficaz descomponedor de la materia orgánica necesaria para la recirculación de nutrientes en el medio ambiente. Este hongo coloniza inicialmente la superficie de las raíces de la planta para penetrar luego en las primeras capas de células de la epidermis (Carrero-Carrón *et al.*, 2018), donde permanece como un microorganismo simbiote no patogénico (Harman *et al.*, 2004), induciendo cambios en la arquitectura de la raíz (Samolski *et al.*, 2012) y provocando respuestas sistémicas que influyen sobre la capacidad de defensa de las plantas contra patógenos y estreses abióticos (Hermosa *et al.*, 2012). Además de ser un excelente agente de biocontrol (Lorito *et al.*, 2010), *Trichoderma* promueve el crecimiento de las plantas por lo que es susceptible de ser utilizado como biofertilizante para incrementar el rendimiento de los cultivos (Brotman *et al.*, 2010). También se sabe que algunas cepas de *Trichoderma* tienen capacidad para aumentar la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos, como la sequía y la salinidad (Shoresh *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2014), por medio de distintos mecanismos entre los que destacan el aumento de crecimiento radicular y la absorción por nutrientes, y la protección contra daños oxidativos. *Trichoderma* produce fitohormonas como auxinas y ácido salicílico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2015), y enzimas que limitan la producción de etileno, como ACC desaminasa (Viterbo *et al.*, 2010), que favorecen el desarrollo de las raíces y de la parte aérea de las plantas, así como metabolitos volátiles entre los que destacan las 6-pentil pironas que promueven el desarrollo de las raíces (Vinale *et al.*, 2008). En este contexto, buscando minimizar los efectos que la salinidad y la sequía de los suelos tienen sobre los cultivos, nuestro objetivo ha sido seleccionar cepas de *Trichoderma* con potencial bioestimulante sobre plantas de tomate en condiciones adversas bajo estos dos estreses abióticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el CIALE de la Universidad de Salamanca. Se usaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Marmande raf. Las semillas se esterilizaron superficialmente mediante un lavado de 10 minutos en etanol 70% en agitación. A continuación, se realizó un lavado de 10 minutos con hipoclorito sódico, también en agitación. Finalmente, las semillas se lavaron exhaustivamente con agua destilada estéril, repitiendo el proceso tres veces. La siembra de las semillas se llevó a cabo en placas de Petri contiendo medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), como condición sin estrés, y medio MS con polietilén glicol (PEG) o NaCl a distintas concentraciones, como condiciones de estrés hídrico y salino, respectivamente. Se ensayaron un mínimo de 100 semillas por condición, a razón de 20 semillas de tomate por placa, y sobrenadantes de cultivo en PDB (Potato Dextrose Broth) de 11 cepas de nuestra colección de *Trichoderma*, además de los correspondientes controles. Las placas con las semillas se incubaron en una cámara fitotrón durante 8 días. Se registró diariamente el número de semillas germinadas. Los datos recogidos se sometieron a tratamiento estadístico por comparación de medias con el test de Tukey (5% de probabilidad), utilizando el programa Sisvar 5.6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de la tasa de germinación de las semillas de tomate hubo diferencia significativa entre las cepas de *Trichoderma* cuando estuvieron sometidas a condiciones de estrés salino respecto a la condición sin estrés (MS). Con los datos de germinación se observó que con 4 de las 11 cepas utilizadas para el ensayo (*T. parareesei*, *T. spirale*, *T. koningii* y *T. harzianum*) se obtuvieron las mejores tasas de germinación de semillas (39 a 48%) en condiciones sin estrés, en condiciones de estrés salino (19 a 26%) y en condiciones de estrés hídrico (24 a 27%), mientras que para esta última condición no hubo diferencias estadísticamente significativas entre cepas. También fue posible identificar una cepa (*T. hamatum*) con bajos porcentajes 7, 4 y 11% de germinación de semillas de tomate, para los ensayos sin estrés, estrés salino y estrés hídrico, respectivamente. Con esos datos ponemos concluir que sobrenadantes de determinadas especies de *Trichoderma* tienen capacidad de elevar el potencial germinativo de las semillas de tomate en condiciones de estrés salino e hídrico. Estudios previos han descrito que *Trichoderma* spp. tienen capacidad para aliviar a las plantas de los efectos adversos causados por estrés salino (Rubio *et al.*, 2017) y que el tratamiento de semillas de tomate con *T. harzianum* acelera su germinación, incrementa el vigor de las plántulas y aminora el efecto negativo provocado por estreses térmico, osmótico, salino e hídrico, al inducir cambios fisiológicos en la planta (Mastouri *et al.*, 2010).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a los fondos del proyecto MINECO AGL2015-70671-C2-1-R, proyecto de la Diputación de Salamanca “Selección de bioestimulantes microbianos para su aplicación en cultivos herbáceos extensivos” y la beca predoctoral de M.P. Bovolini de la Unidad de Excelencia CIALE de la Universidad de Salamanca.

BIBLIOGRAFÍA

- Brotman, Y., *et al.* (2010) *Curr. Biol.* 20:R390-R391.
Carrero-Carrón, I., *et al.* (2018) *Plant Pathol.* 67:1758-1767.
Contreras-Cornejo, H.A., *et al.* (2009) *Plant Physiol.* 149:1579-1592.
Harman, G.E., *et al.* (2004) *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
Hermosa, R., *et al.* (2012) *Microbiology* 158:17-25.
Lorito, M., *et al.* (2010) *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:395-417.
Mastouri, F., *et al.* (2010) *Phytopathology* 100:1213-1221.
Pérez, E., *et al.* (2015) *Front. Microbiol.* 6:1186.
Rubio, M.B., *et al.* (2014) *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1864-1873.
Rubio, M.B., *et al.* (2017) *Front. Plant Sci.* 8:294.
Samolski, I., *et al.* (2012) *Microbiology* 158:129-138.
Shoresh, M., *et al.* (2010) *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21-43.
Vinale, F., *et al.* (2008) *Soil Biol. Biochem.* 40:1-10.
Viterbo, A., *et al.* (2010) *FEMS Microbiol. Lett.* 305:42-48.

Tolerancia a la salinidad de las plantas en asociación con el endófito *Serendipita indica*: caracterización molecular de las ATPasas tipo ENA del hongo y su regulación.

Lanza, M.^{1*}, Haro, R.^{1,2}, Blázquez, L.¹, Jaén, L.¹, Benito, B.^{1,2}

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Campus Montegancedo UPM. 28223-Pozuelo de Alarcón (Madrid), España. ²Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB), Universidad Politécnica de Madrid (UPM). 28040, Madrid, España. *monica.lanza@upm.es

INTRODUCCIÓN

Serendipita indica, (anteriormente llamado *Piriformospora indica*), es un hongo endófito que coloniza las raíces de diversas especies de plantas, mostrando una acción beneficiosa sobre su crecimiento y desarrollo cuando éstas crecen en condiciones óptimas o subóptimas provocadas por cualquier estrés biótico o abiótico. Un ejemplo del efecto positivo del hongo se ha observado en plantas expuestas a condiciones salinas, fundamentalmente a NaCl (Jogawat *et al.*, 2016). Sin embargo, el mecanismo por el cual *Serendipita* mejora el crecimiento de las plantas está todavía pendiente de averiguar. La salinidad puede inducir desequilibrios osmóticos e iónicos en las plantas, alterando principalmente los contenidos de Na⁺ y K⁺. Anteriormente se ha demostrado que *Serendipita* mejora el estado osmótico de la planta, pero no se sabe si participa en el reajuste del desequilibrio iónico en las plantas.

En este trabajo hemos comprobado que el co-cultivo de arroz o *Arabidopsis* con *Serendipita* en condiciones salinas reduce el contenido de Na⁺ de la planta. Además, se ha realizado la caracterización funcional de las ATPasas PiENA1 y PiENA5, que son los principales genes implicados en la tolerancia a la sal de otros hongos. La expresión heteróloga en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensibles a la salinidad, mostró que PiENA1 está involucrado en el flujo de salida de Na⁺ y K⁺, mientras que PiENA5 parece estar involucrado solo en la desintoxicación de Na⁺ y que ambos se inducen y parecen desempeñar una función relevante a pH alcalino, condición que induce cambios morfológicos del hongo de clamidosporas a micelio.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se ha utilizado la cepa DSM 11827 del hongo *Serendipita indica*, la accesión Col-0 de *Arabidopsis thaliana* y la variedad Nipponbare de arroz. El hongo se crecía y propagaba en el medio mínimo Fosfato de Arginina (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984) o CM (Pham *et al.*, 2004) y los ensayos de simbiosis se realizaban en el medio mínimo PNM sin fuente de carbono (Lahrmann *et al.*, 2003) en placas con agar y en cultivo hidropónico. Los contenidos de cationes se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica. La caracterización funcional se realizaba mediante expresión heteróloga en los mutantes AXT3K (*Mat a ade2 ura3 trp1 ena1-4::HIS3 nha1::LEU2 nhx1::KanMX4*) (Quintero *et al.*, 2002). La extracción de ARN total se realizaba con reactivo TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el ARN se purificaba mediante las columnas comercializadas por Mackerey-Nagel. La expresión génica se determinaba mediante qRT-PCR utilizando el equipo de ROCHE LightCycler 480 y el kit de One-step TB Green Primescript (Perfect Real Time, TAKARA) siguiendo las recomendaciones del kit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la tolerancia a la salinidad del hongo en vida libre y durante la infección de raíces de arroz y *Arabidopsis*. Los resultados mostraron que *Serendipita* tiene una tolerancia intermedia a la salinidad respecto a otros hongos y que el co-cultivo con las plantas disminuye el contenido de Na⁺ de estas, sugiriendo una participación del hongo en el reajuste iónico de la planta. En el estudio del crecimiento del hongo a distintos pH también pudimos observar que el pH alcalino induce un mayor desarrollo de hifas frente a clamidosporas así como que al inicio de la infección se produce una alcalinización transitoria de la rizosfera. Ambos efectos que se han descrito previamente en algunos hongos fitopatógenos.

En la búsqueda bioinformática en el genoma de *Serendipita* (<https://genome.jgi.doe.gov/Pirin1/Pirin1.home.html>) para la identificación de transportadores implicados en el transporte de Na⁺, se han identificado dos genes que codifican P-ATPasas tipo ENA, PiENA1 y PiENA5, que en otros hongos han demostrado ser sistemas muy eficientes en la destoxicación del Na⁺ intracelular. La caracterización funcional de estas ATPasas se realizó en el mutante de levadura AXT3K, que es muy sensible a la salinidad. Los ensayos en gota (Drop test) mostraron que PiENA1 complementaba el crecimiento del mutante a altas concentraciones de NaCl y también a altas concentraciones de KCl en el medio, mientras que PiENA5 suprimía únicamente el crecimiento del mutante a altas concentraciones de NaCl. El análisis cinético de salida de cationes en estas levaduras demostró que ambos transportadores transportan Na⁺ y que están implicados en la salida de Na⁺ al exterior celular. Estudios preliminares de expresión génica de estos transportadores indican que dichos genes se inducen en respuesta a la salinidad y a alto pH. Además, pudimos comprobar que dichos genes se expresan durante la infección de las raíces de plantas lo que abre la posibilidad de que estos transportadores tengan un papel relevante en simbiosis durante el crecimiento de las plantas en condiciones de salinidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a los proyectos AGL2016-80593R y BIO2016-80593-REDT del MINECO.

BIBLIOGRAFÍA

- Jogawat, A., *et al.* (2016) *Sci. Rep.* 6:36765.
Rodríguez-Navarro, A., Ramos, J. (1984) *J. Bacteriol.* 159:940-945.
Pham, G.H., *et al.* (2004) En: *Plant Surface Microbiology*, A. Varma, L. Abbott, D. Werner y R. Hampp (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 593-613.
Lahrman, U., *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 13965-13970.
Quintero, F.J., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9061-9066.

Descifrando el papel de los flavonoides y las estrigolactonas en la simbiosis beneficiosa planta-hongo micorrízico arbúscular (AM).

Lidoy-Logroño, J.¹, Montalbán, C.¹, Rial, C.², Pozo, M.J.¹, Macías, F.A.², López-Ráez, J.A.^{1*}

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Profesor Albareda 1. 18008. Granada (España). ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, República Saharaui 7. 11510. Puerto Real, Cádiz (España).

*juan.lopezraez@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

El uso masivo de fertilizantes químicos y pesticidas en agricultura genera un enorme impacto medioambiental, contaminando suelos y acuíferos. Una alternativa sostenible para reducir su utilización es el uso de microorganismos beneficiosos presentes en la rizosfera, entre los que se encuentran los hongos micorrízicos arbúsculares (AM). Estos hongos establecen simbiosis con las plantas y pueden utilizarse como biofertilizantes y agentes de bioprotección frente a estreses ambientales (bióticos y abióticos). El establecimiento y funcionamiento de estas simbiosis beneficiosas requiere de un alto grado de coordinación/comunicación entre los ‘socios’ involucrados. En el caso de la simbiosis AM, el diálogo molecular planta-hongo AM comienza con la producción y exudación a la rizosfera de moléculas señal por parte de la planta hospedadora, entre las que se encuentran las estrigolactonas (SLs) (López-Ráez *et al.*, 2017). Además de moléculas señal, las SLs son también las últimas hormonas vegetales descritas, modulando la fisiología de la planta en respuesta a estrés nutricional (Waters *et al.*, 2017). Otras moléculas señal importantes en la rizosfera son los flavonoides. Éstos constituyen una clase de metabolitos secundarios con funciones importantes tanto en la biología como en la fisiología de la planta (Weston y Mathesius, 2013). En la rizosfera, los flavonoides son esenciales en la formación de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* (Oldroyd, 2013), donde las SLs parecen ser también importantes (McAdam *et al.*, 2017; Peláez-Vico *et al.*, 2016). Sorprendentemente, se conoce muy poco sobre el posible papel de los flavonoides en la simbiosis AM, así como de su interacción con las SLs. En este trabajo se pretende entender cómo se regula la interacción temprana planta-hongo AM con el objeto de mejorar y extender el uso de los inoculantes comerciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plantas de tomate deficientes en flavonoides (mutante *anthocyanin free, af*) (Kang *et al.*, 2014), así como su correspondiente tipo silvestre (cv. Red Cherry) fueron inoculadas con el hongo AM *R. irregularis*, utilizando esporas o inóculo completo conteniendo micelio, raíces colonizadas y esporas. Los niveles de colonización fueron analizados a las 4 y 6 semanas después de la inoculación. También se llevaron a cabo ensayos de complementación tanto con flavonoides como con SLs, y se cuantificaron los niveles de estos metabolitos en los dos genotipos mediante LC-MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los niveles de micorrización reveló resultados inesperados e interesantes, dependiendo del tipo de inoculación, cuando se comparó el mutante *af* y el tipo silvestre. Además, el mutante mostró niveles reducidos de sólo ciertos flavonoides en los exudados radiculares. Curiosamente, los niveles de SLs también se encontraban claramente reducidos en el mutante. Los resultados sugieren que los flavonoides también podrían jugar un papel importante como moléculas señal durante los estadios iniciales de la

interacción planta-hongo AM, y que, de alguna manera, los niveles endógenos de flavonoides afectan a la biosíntesis de SLs.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto AGL2015-64990-C2-1-R del Plan Nacional de I+D del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

BIBLIOGRAFÍA

- López-Ráez, J.A., *et al.* (2017) *Trends Plant Sci.* 22:527-537.
Waters, M.T., *et al.* (2017) *Annu. Rev. Plant Biol.* 68:291-322.
Weston, L.A., Mathesius, U. (2013) *J. Chem. Ecol.* 39:283-297.
Oldroyd, G.E. (2013) *Nat. Rev. Microbiol.* 11:252-263.
McAdam, E.L., *et al.* (2017) *Plant Physiol.* 175:529-542.
Peláez-Vico, M.A., *et al.* (2016) *Plant Sci.* 245:119-127.
Kang, J.-H., *et al.* (2014) *Plant Physiol.* 164:1161-1174.

La inoculación con endofitos incrementa el poder fitorremediador de *Spartina densiflora* frente a contaminantes orgánicos.

Mesa-Marín, J.^{1*}, Barcia-Piedras, J.M.³, Mateos-Naranjo, E.¹, Cox, L.⁴, Real, M.⁴, Navarro-Torre, S.², Rodríguez-Llorente, I.D.², Pajuelo, E.², Parra, R.¹, Redondo-Gómez, S.¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España;

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España;

³Centro IFAPA Las Torres-Tomejil, Ctra. Sevilla - Cazalla Km. 12,2, 41200 Alcalá del Río - Sevilla, España; ⁴Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC), Reina Mercedes 10, 41012 -Sevilla,

España. *jmesam@us.es

INTRODUCCIÓN

Las bacterias endofíticas, que habitan en el interior de los tejidos vegetales, pueden no sólo mejorar el crecimiento vegetal, sino también potenciar cualidades particulares de algunas plantas. Es el caso de la halófito *Spartina densiflora* que crece en las marismas occidentales de Andalucía. Se ha visto que esta especie tiene un elevado potencial fitorremediador de contaminantes, que podría ser incrementado mediante la bioaumentación con bacterias autóctonas tolerantes. Si bien ya hay estudios que han demostrado esta hipótesis con metales pesados, aún no se sabe nada de contaminantes orgánicos como el fenantreno, del que se han encontrado niveles elevados en las marismas andaluzas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aislaron endofitos de hojas y raíces de *S. densiflora* y se llevó a cabo un *screening* para detectar aquellos capaces de degradar fenantreno. Se diseñó un consorcio bacteriano, que se empleó para inocular semillas de *S. densiflora*. Tras germinar en placa, plántulas inoculadas y control se sembraron en suelos con concentraciones de fenantreno de 0, 100 y 1000 ppm. Tras un período experimental de un mes, se midieron los parámetros fisiológicos de las plantas y el fenantreno remanente en suelo para cada uno de los tratamientos.

RESULTOS Y DISCUSIÓN

Los datos recogidos mostraron que, si bien la inoculación no conllevó diferencia alguna frente al control durante la germinación de las semillas, sí lo hizo en la planta adulta. Los parámetros fisiológicos vegetales, como crecimiento y fotosíntesis, se vieron incrementados con el uso del consorcio bacteriano. Por último, la cantidad de fenantreno analizada en suelo al final del período experimental delató que la inoculación bacteriana promovió el poder fitoestabilizador de *S. densiflora* frente a este contaminante.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Junta de Andalucía, Servicios de Invernadero CITIUS Universidad de Sevilla.

Los componentes de la matriz extracelular de *Bacillus subtilis* son necesarios para proteger la colonia de la invasión de *Pseudomonas* y para la co-colonización en plantas.

Molina-Santiago, C.^{1*}, Pearson, J.R.², Navarro, Y.¹, Berlanga-Clavero, M.V.¹, Petras, D.³, Caraballo-Rodríguez, A.M.³, de Vicente, A.¹, Dorrestein, P.C.³, Romero, D.^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071 Málaga, Spain; ²Nano-imaging Unit, Andalusian Centre for Nanomedicine and Biotechnology, BIONAND, 29590 Málaga, Spain; ³University of California San Diego, Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center, La Jolla, USA. *camolsan@uma.es / diego_romero@uma.es

Las plantas son colonizadas por una gran variedad de microorganismos, y entre ellas las bacterias son las más predominantes dada su capacidad para adaptarse a cambios ambientales, así como su versatilidad a la hora de interactuar y comunicarse con otros organismos. Además, la formación de comunidades de células de una misma especie en estructuras conocidas como biofilms les permite un mayor éxito en este escenario competitivo. La matriz extracelular que recubre a las bacterias es una estructura que confiere mayor protección frente a agentes externos, modula el flujo de señales y controla la diferenciación celular, por lo que es importante conocer no solo su composición sino además la funcionalidad de los componentes de la matriz extracelular bacteriana.

En este trabajo estudiamos la interacción de dos bacterias beneficiosas para plantas, *Bacillus subtilis* 3610 y *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. Mediante un abordaje experimental pluridisciplinar, demostramos el importante papel de la matriz extracelular, y específicamente del EPS en la protección de colonias de *B. subtilis* frente a la colonización por *Pseudomonas*. Además, la utilización de microscopía confocal para el análisis de las interacciones bacterianas nos ha permitido realizar un estudio completo del comportamiento de las bacterias y nos ha permitido medir velocidades de expansión de las colonias en distintas situaciones. El estudio transcriptómico de la interacción nos ha permitido destacar al sistema de secreción tipo VI (T6SS) de *Pseudomonas* como uno de los elementos clave en el contacto directo célula-célula frente a células de *Bacillus* desprovistas de su matriz extracelular. En respuesta a la infiltración por *Pseudomonas*, demostramos que *B. subtilis* activa la esporulación como un mecanismo de defensa secundario. Finalmente, análisis microbiológicos y microscopía confocal de las interacciones en distintos órganos de plantas de melón demuestran la importancia funcional de las distintas estrategias para la co-existencia estable de estas bacterias en comunidades bacterianas. Nuestros descubrimientos amplían la comprensión del papel funcional jugado por los biofilms durante las interacciones bacterianas.

Root responses of mycorrhizal plants upon *Botrytis cinerea* infection in shoots.

Sanmartín, N.^{1*}, Mateu, D.¹, Pastor-Fernández, J.¹, Sánchez-Bel, P.¹, Pastor, V.¹, Pozo, M.J.², Flors, V.¹

¹Associated Unit to Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC)-Department of Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universitat Jaume I, Castellón. ²Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín (EEZ), Granada. *nsanmart@uji.es

INTRODUCTION

Arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) are obligate biotrophs which establish a symbiosis with plant roots in order to exchange nutrients and water. AMF improve plant mineral and water uptake, and in return, plants deliver carbohydrates to the fungus. In addition, AMF enhance plant defences upon pathogen attack, so called Mycorrhiza Induced Resistance (MIR). This protection is mostly dependent of JA pathway (Mauch-Mani *et al.*, 2017; Pozo and Azcon-Aguilar, 2007).

Plants have to keep a balance between growth and defence, thus when a stress is present they are able to readjust their metabolism to deal with it. Mycorrhizal plants also change their metabolism and hormone levels, not only in roots (Rivero *et al.*, 2015), where the symbiosis takes place, but also in the shoots. This rearrangement prepares mycorrhizal plants to defend themselves better against pathogens (Sánchez-Bel *et al.*, 2016).

We aim to study the metabolic changes in mycorrhizal roots during a shoot pathogen infection and to identify those metabolites transported from roots to shoots.

MATERIAL AND METHODS

Tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Better Boy) were inoculated with the AMF *Rhizophagus irregularis*. Four weeks after, when the symbiosis was established, plants were infected with *Botrytis cinerea*. 48 hpi samples of roots and leaves were collected.

Metabolites were extracted from roots and identified by liquid chromatography. Metabolite identification was performed using internal libraries (Gamir *et al.*, 2014). To see the global behaviour of the different treatments, a PCA and a Heatmap were performed using the Metaboanalyst software. Also, the oxilipin pathway was studied by analysing some JA-defence related genes gene expression in roots by qPCR.

A Scholander pressure chamber was used to collect the root efflux from both NM and AM non-infected plants to determine with metabolites were transported from roots to shoots. Antifungal activity of the identified metabolites was tested *in vitro*.

RESULTS AND DISCUSSION

Mycorrhizal (AM) plants were more resistant to *B. cinerea* infection than non-mycorrhizal (NM) plants. Previous studies revealed that the infection had a higher impact in the metabolomic fingerprint in shoots than the symbiosis (Rivero *et al.*, 2015). However, we found that in roots the strongest impact was caused by the symbiosis. The study of the metabolome revealed some pathways of secondary metabolism in which there were some compounds that do not differed in their accumulation in NM and AM plants without infection showing a rising profile only in AM plants after a *B. cinerea* infection, this is with a priming profile.

Regarding to the oxylipin pathway, JA-related biosynthesis genes were induced in the presence of mycorrhizal fungus in roots. Only the JA-marker gene *PIN-II* had a priming profile in its expression. Accordingly, some compounds of the fatty-acid and oxylipin pathway were found also with a priming profile in the metabolomic analysis.

Mycorrhizal infected plants showed an enhanced accumulation of both precursors and complex lignans. Later, they were identified using standards or the fragmentation spectrum of mass spectrum databases. Lignans may have relevance in MIR due to their priming profile.

As mycorrhizal fungus is in root and can enhance the protection of plants from airborne pathogens, some compounds could be transported from roots to shoots. The efflux from roots was analysed and some compounds were identified. Some of them were induced more than 400-fold in AM plants.

Identified metabolites in root efflux of AM plants and the efflux of these plants were tested in antifungal assays against *B. cinerea*, however no growth inhibition was observed. This suggests that transported molecules have a signalling role instead of an antibiotic effect.

In conclusion, mycorrhizal roots change their metabolism and manipulate the plant shoot defence mobilizing some compounds such as lignans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by the Spanish Ministry MINECO (AGL2012-39923 and AGL2015-64990) and by the Plan de Promoció de la Investigació-Universitat Jaume I (I P1-1B2013-and P1.1B2015-33). We also thank the Serveis Centrals of Universitat Jaume I for the technical support.

REFERENCES

- Gamir, J., *et al.* (2014) *Plant J.* 78:227-240.
Mauch-Mani, B., *et al.* (2017) *Annu. Rev. Plant Biol.* 68:485-512.
Pozo, M.J., Azcon-Aguilar, C. (2007) *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:393-398.
Rivero, J., *et al.* (2015) *Front. Microbiol.* 6:598.
Sánchez-Bel, P., *et al.* (2016) *Front. Microbiol.* 7:1598.

Sesión VIII: Miscelánea 1

Moderador: Matilde Barón Ayala.

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

Antequera-Gómez, M.L.^{1*}, de Vicente, A.², Romero, D.^{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). *marialan@uma.es

Una preocupación importante dentro de la seguridad alimentaria es la contaminación de alimentos por bacterias que son capaces de infectar al ser humano. *Bacillus cereus* es un patógeno humano bastante común que se transmite por alimentos y es responsable de importantes brotes de intoxicación alimentaria. Esta intoxicación causada por *B. cereus* se clasifica en dos grandes categorías según la enfermedad que cause: emética y diarreica. El desarrollo de la enfermedad emética está directamente relacionado con la producción de una toxina conocida como cereulide, una toxina capaz de resistir a las altas temperaturas y que normalmente se produce en los alimentos previamente contaminados por células de *B. cereus*. Por otro lado, la enfermedad diarreica es provocada por una batería de enterotoxinas, entre las que destacan la hemolisina BL (Hbl), la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K (CytK).

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. El objetivo de este estudio es conocer cómo *B. cereus* es capaz de sobrevivir sobre las diferentes superficies.

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. Sin embargo, se pudo observar dos comportamientos destacables por la persistencia y no persistencia de diferentes aislados de *B. cereus* sobre las superficies. Se eligió un grupo de 8 aislados (seis de los cuales eran capaces de persistir en hoja y fruto y los otros dos no) que se secuenciaron y se compararon mediante análisis bioinformático los grupos de genes que eran compartidos por los diferentes aislados capaces de persistir sobre las superficies y que sin embargo no están presentes en los aislados que no son capaces de persistir.

Para el posterior estudio de la relevancia de estos grupos de genes en la persistencia en hoja y fruto, se seleccionó una cepa emética del estudio 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 o fruto inoculado de los que al menos un 40% apareció en la forma de esporas y iii) es una cepa manipulable genéticamente.

Con todos estos datos, nos encontramos posicionados para comprender que herramientas, conocidas o aún por conocer utiliza esta cepa para interactuar con la planta y frutos, 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).

TagX1 is required for the full killing capability of the *P. putida* Type VI secretion system.

Bernal, P.^{*}, Spiga, L., Lee, S., Fetch, S., Furniss, C., Mavridou, D., Filloux, A.

¹MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, Imperial College London, London, UK. *p.bernal@imperial.ac.uk

INTRODUCTION

The T6SS is a bacterial nanomachine used to inject effectors (toxins) into target cells. The structure resembles an inverted bacteriophage with a tube (Hcp proteins) surrounded by a contractile sheath (TssB and TssC proteins) and capped with a puncturing tip (VgrG trimer) (Figure 1). The cytosolic part of the T6SS docks onto a membrane complex (TssLMJ) by interacting with a phage baseplate-like structure (TssAEFGK). Effectors are commonly linked to the apparatus tip for secretion prior to injection into the target cells. The T6SS frequently targets prokaryotic cells and it is considered a potent antimicrobial weapon (Cianfanelli *et al.*, 2016). *P. putida* encodes three T6SS systems (K1, K2 and K3); each one containing the complete set of genes to encode the core components necessary to assemble a functional machinery (Tss components), accessory components (Tag proteins) and over eleven effectors including nucleases and pore-forming colicins together with their cognate immunity pairs (Tke1-Tki1, Tke2-Tki2, Tke3-Tki3, ...) (Bernal *et al.*, 2017).

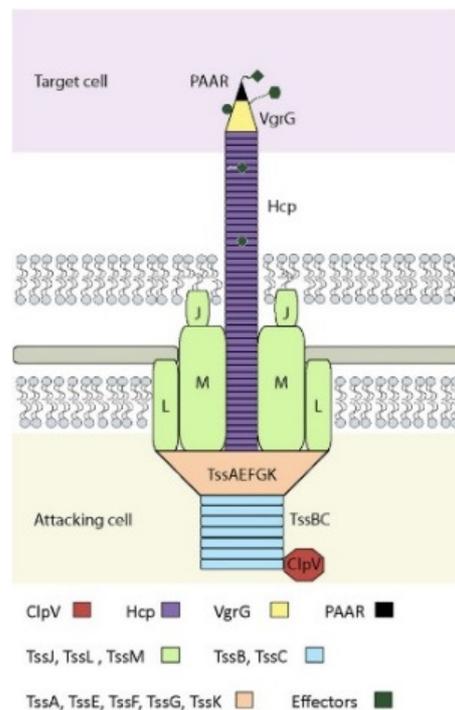


Figure 1. General model of type VI secretion system assembly.

The K1-T6SS is a potent antibacterial device used by *P. putida* to kill a broad range of bacteria, including resilient phytopathogens such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium caratovorum* and *Xanthomonas campestris* (Bernal *et al.* 2017).

The genetic architecture of the K1 cluster show two putative operons. The first operon contains 15 genes, 12 of which encode T6SS core components (i.e *tssA*, *tssB*, *tssC*, ...) and it is called the structural operon. There is a gene encoding a core component, *vgrG*,

located within the second operon that has been named as the VgrG1 operon (Bernal *et al.*, 2017).

MATERIAL AND METHODS

Protein-protein interactions were assessed by Bacterial Two Hybrids experiments as described in (Battesti & Bouveret 2012). Competition assays between *P. putida* and *E. coli* and Hcp secretion assays to test T6SS functionality were performed as previously described in Bernal *et al.* (2017).

RESULTS AND DISCUSSION

Within the structural operon we have identified a novel T6SS feature represented by the first gene in the K1-T6SS structural operon, *tagX1*. The protein encoded by this gene has no homologs or recognizable features and the protein is only conserved in a specific T6SS phylogenetic group (4B).

Bacterial Two Hybrids assays show that TagX1 interacts with other T6SS components including TssK1 and TssA1. In *E. coli*, TssK has been described as a baseplate component whereas TssA is initially at the baseplate but moved down with the sheath when the system is being assembled to close the loaded system by its terminal end (Zoued *et al.*, 2016). *P. putida tagX1* mutant is able to kill prey cells but it is not as efficient as the wild type strain as seen in competition and secretion assays. These preliminary results suggest that TagX1 is important for the machinery to reach full power and it seems to be involved in the proper conformation of T6SS components before firing. We suspect that the role of this protein could be dispensable *in vitro* but might be essential *in vivo* which will help designing T6SS-equipped biocontrol agents.

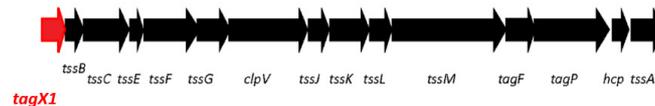


Figure 2. *P. putida* K1-T6SS structural operon.

ACKNOWLEDGEMENTS

PB is supported by a Marie Curie Fellowship (654135) and AF is supported by a MRC grant (P60209).

REFERENCES

- Battesti, A., Bouveret, E. (2012) *Methods* 58:325-334.
- Bernal, P., *et al.* (2017) *ISME J.* 11:972-987.
- Cianfanelli, F.R., *et al.* (2016) *Trends Microbiol.* 24:51-62.
- Zoued, A., *et al.* (2016) *Nature* 531:59-63.

El papel dual del amiloide funcional TasA del biofilm de *Bacillus subtilis* en la fisiología bacteriana y la persistencia sobre la superficie de la planta.

Cámara-Almirón, J.^{1*}, Navarro, Y.¹, Magno-Pérez-Bryan, M.C.¹, Molina-Santiago, C.¹, de Vicente, A.², Pérez-García, A.², Romero, D.²

¹Departamento de Microbiología, Centro de Supercomputación y Bioinnovación, Universidad de Málaga, Calle Severo Ochoa 34, Parque Tecnológico de Andalucía, 29590 Málaga, España; ²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, Bulevar Louis Pasteur, 31, 29071, Málaga, España. *jesus_camara@uma.es

Los biofilms son comunidades bacterianas complejas formadas en cualquier superficie y compuestas de células embebidas en una matriz extracelular. Estudios en *Bacillus subtilis* han demostrado que esta estructura bacteriana similar a un tejido está compuesta de diversas sustancias exopoliméricas: incluidos los exopolisacáridos (eps), la hidrofobina BslA y TasA y TapA, que son las dos proteínas que forman las fibras amiloides que confieren robustez a la arquitectura del biofilm. Se ha demostrado que las rutas de señalización involucradas en la formación de biofilm están activas en la interacción de *B. subtilis* con la superficie de plantas. De hecho, trabajos previos han demostrado que la surfactina actúa como un autoinductor de la formación de biofilm en la fitosfera de plantas de melón, lo cual está relacionado con la actividad supresora de *B. subtilis* frente a determinados hongos fitopatógenos¹. Teniendo en cuenta esto, el principal objetivo de este trabajo se centró en estudiar la contribución de los distintos componentes de la matriz extracelular en la ecología de *B. subtilis* sobre la superficie de la planta. Los resultados muestran que la proteína amiloide TasA tiene un papel importante y significativo en la adhesión y la formación de biofilm sobre hojas de melón; sin embargo, a pesar de la incapacidad del mutante en *tasA* ($\Delta tasA$) para ensamblar un biofilm, presenta una actividad antagonista similar a la de la cepa silvestre (WT). El análisis transcriptómico del mutante reveló diferencias en los niveles de expresión de más de 800 genes. Estos resultados sugieren un cambio regulatorio global, que se traduce en que TasA, además de su papel estructural en el biofilm, podría tener una función reguladora del estado fisiológico de las células. Para demostrar esto, construimos un alelo de TasA incapaz de restaurar la formación de biofilm pero activo en la función fisiológica, devolviendo a las células al estado WT. Esto nos permitió separar ambas funciones, lo que respalda la importancia de este amiloide funcional en la regulación de la fisiología bacteriana y la supervivencia de la bacteria sobre la planta.

REFERENCIAS

Zeriouh, H., *et al.* (2014) Environ. Microbiol. 16:2196-2211.

Caracterización de la hipotética proteína de defensa codificada por el gen At5G38850 en *Arabidopsis thaliana*.

López-Márquez, D., Del Espino, A. *, López-Pagán, N., Ruiz-Albert, J., Bejarano, E.R., Beuzón, C.

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, España. *adep@uma.es.

La interacción planta-patógeno a lo largo del tiempo ha dado lugar al desarrollo y evolución de mecanismos de defensa, en las plantas, así como de virulencia, en los patógenos. Siendo uno de los ejemplos más representativos la defensa tipo PTI en plantas (*Pattern triggered immunity*), la cual evita la infección por parte de un gran número de patógenos. Esta se basa en unos receptores (PRRs) que son capaces de reconocer moléculas muy conservadas presentes en los patógenos denominadas *Patrones Moleculares Asociados a Patógenos* (PAMPs). Este reconocimiento desencadena la puesta en marcha de la respuesta de defensa incluyendo la deposición de callosa, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de MAPK, etc. Frente a esto, algunas bacterias patógenas, como *P. syringae* han desarrollado mecanismos que le permiten suprimir dicha respuesta PTI. El factor de virulencia más importante de *P. syringae* es el sistema de secreción tipo III (T3SS), que le permite suprimir la PTI, al introducir en la célula vegetal proteínas denominadas efectores, que interactúan con los elementos de la cascada de señalización de la misma, inhibiéndola. Las plantas no obstante presentan un segundo nivel de defensa, la ETI (*Effector triggered immunity*), capaz de detectar la actividad de los efectores del T3SS, mediante proteínas “R” que actúan como receptores intracelulares, codificadas por genes de resistencia. El reconocimiento directo o indirecto de los efectores tiene como consecuencia la activación de rutas de señalización que inducen una respuesta más rápida e intensa, que generalmente conlleva la puesta en marcha de mecanismos de defensa similares a los activados durante la PTI, pero con una mayor amplitud. Además, la ETI va frecuentemente asociada al disparo de muerte celular programada del tejido vegetal infectado, conocida como HR (Hypersensitive Response), con el fin de frenar el avance del patógeno. Las proteínas R se caracterizan por presentar dominios de tipo NBS-LRR, y se clasifican en dos subfamilias en función del tipo de dominio amino-terminal que presenten, pudiendo ser TIR (Toll/interleucina receptor-like domain) o un motivo CC (Coiled-Coil). Estos dominios intervienen en la transducción de la señal, que induce la interacción del efector con los dominios NBS y LRR.

Los niveles de expresión de genes R, deben estar finamente regulados, ya que altos niveles de estos, pueden desencadenar efectos deletéreos. Dentro de dichos procesos de regulación destaca el papel del silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs. En plantas, los pequeños RNAs, son producidos por la acción de RNAsas del tipo III conocidas como “Dicer-Like proteins” (DCLs). Existen 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) por un mecanismo dependiente de secuencia. Esta regulación es englobada dentro del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). El PTGS mediado por miRNAs ha demostrado ser de vital importancia en las respuestas de defensa frente a

multitud de patógenos, al permitir la rápida modulación de una gran batería de genes. Debido a su papel en defensa, han surgido proteínas efectoras que presentan por diana algunos componentes de la maquinaria involucrada en la producción y funcionamiento de los miRNAs. En nuestro laboratorio, trabajamos con un miRNA de *A. thaliana* denominado miR825*. Este miRNA825* presenta como dianas genes “R” del tipo TIR-NBS-LRR, aún por caracterizar. Hemos mostrado que dicho miRNA regula la expresión de algunos genes R y desencadena la generación de pequeños RNAs en fase (phasiRNAs) a partir de una de estas dianas. Asimismo, hemos visto que tras la activación de PTI por *P. syringae*, los niveles del precursor de miRNA825* (pri-miRNA825) disminuyen activándose así la expresión de estos genes R. Hemos demostrado que plantas con niveles alterados de miRNA825* muestran una PTI alterada lo cual sugiere un papel del miRNA825* en la regulación de este mecanismo de defensa frente a la bacteria.

Con el fin de relacionar de forma directa el papel del miRNA con la modulación de defensas observada, hemos seleccionado una de las dianas reguladas por este miRNA, el gen AT5G38850, para su caracterización. Mediante microscopia confocal, hemos determinado la localización tanto nuclear como citoplasmática de esta proteína R fusionada a GFP. También hemos caracterizado el patrón de expresión del gen y del miRNA, demostrando que este último regula los niveles del primero en diferentes tejidos de la planta. Por último, hemos generado un sistema de expresión inducible mediante el cual expresar la proteína R para su purificación, de cara a ensayos de detección de posibles interactores. Todo ello se ha realizado en dos fondos distintos de *Arabidopsis thaliana*, Col-0 (silvestre) y DCL234 (mutante afectado en la biogénesis de siRNAs). Un análisis más exhaustivo nos ha permitido observar, que dicha proteína se acumula en el fondo mutante DCL234 y no en la planta silvestre Col-0. Este resultado, sugiere un mecanismo de autorregulación de los niveles del transcrito, mediante la generación de phasiRNAs.

BIBLIOGRAFÍA

- Bonardi, V., *et al.* (2012) *Curr. Opin. Immunol.* 24:41-50.
Jones, J.D. y Dangl, J.L. (2006) *Nature* 444:323-329.
Liu, J. y Coaker, G. (2008) *Mol. Plant* 1:411-422.
Manavella, P.A., *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7:2461-2466.
Peart, J.R. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10865-10869.
Takken, F.L. *et al.* (2006) *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:383-390.

Peptide-induced resistance against a necrotrophic fungus in intercrop species.

Pastor-Fernández, J. *, Sánchez-Bel, P., Pastor, V., Mateu, D., Sanmartín, N., Flors, V. Metabolic Integration and Cell Signaling Laboratory, Plant Physiology Section, Department of Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universitat Jaume I, Castellón. *jupastor@uji.es

INTRODUCTION

Recently an increasing number of plant peptides were described as defence elicitors that act as damage associated molecular patterns (DAMPs). They are released upon pest or pathogen attack and trigger a cascade of plant defenses (Yamaguchi and Huffaker, 2011; Albert, 2013). In *Arabidopsis* some Peps function as endogenous amplifiers of innate immunity as they induce the transcription of defense-related genes such as defensin PDF1.2 and PR1, and trigger the synthesis of reactive oxygen species (H₂O₂) (Huffaker *et al.*, 2006). The 18 aa peptide Systemin found in Solanaceous species (Pearce *et al.*, 1991) or the hydroxyproline rich Systemins (HypSys) peptides of tobacco and tomato (Pearce *et al.*, 2001) induce the accumulation of Protease Inhibitors (PIs) in response to herbivory that interact with the proteases in the insect gut displaying an insect-deterrent effect or inducing volatile signalling that attract pest natural enemies (Corrado *et al.*, 2007). More recently, a plant pentapeptide, phyto-sulfokine (PSK) was found to enhance auxin-dependent immune responses through cytosolic Ca²⁺ signalling in tomato (Zang *et al.*, 2018).

In this work our goal is to find peptides with plant resistance inducing activity against fungal pathogens. We will test whether exogenous treatments with peptides can protect those plant species that produce the peptide but also in intercrop species. Moreover, an analytical method to identify and quantify peptides will be implemented for subsequent quantitative studies of the peptide production and detection.

MATERIAL AND METHODS

Screening of peptides inducing resistance. Seeds of wild type *Arabidopsis* Col-0 ecotype were sown in *in vitro* multiwell plates in MS medium. The plants were treated with a range of peptide concentration from 0.1 to 20 nM (as final concentration). Treated plants were challenged with spores of *Plectospharella cucumerina* using 10⁴ spores/ml by drop inoculation 24 h after peptide treatment. Resistance to the pathogen is assessed by staining of cell death and calculating the leaf damage rate.

Implementation of an analytical method for peptides identification and quantification. High-performance liquid chromatography (HPLC) is performed by using a UPLC-QTOF Premier. A protocol adapted from Pastor *et al.* (2018) is being followed.

RESULTS AND DISCUSSION

Peptides from tomato induce resistance to a necrotrophic fungus in *Arabidopsis*.

We found that peptides from tomato (Systemin and HypSys) are perceived and protect taxonomically distant specie such as *Arabidopsis thaliana*. Bioassays showed that HypSys at concentrations above 10 nM reduced the infection symptoms of *Plectospharella cucumerina* (Figure 1).

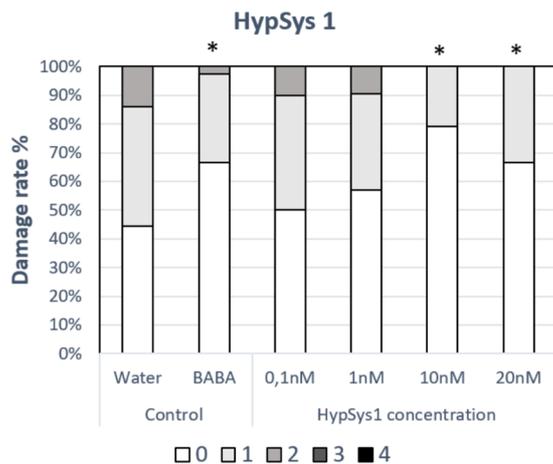


Figure 1. Damage rate % of Arabidopsis Col-0 plants infected with *Plectosphaerella cucumerina* after 24h treatment with HypSys1 peptide from tomato. 0: no symptoms; 1: 0-25% of leaf cell death; 2: 25-50% of leaf cell death; 3:50-75% of leaf cell death and 4: 75-100% of leaf cell death. BABA was used as a positive control at a concentration of 1 ppm (Pastor *et al.*, 2013).

Method to identify and quantify peptides - used as standards (STDS) for identification.

By using LC coupled to MS we were able to determine retention times and m/z ratios of parental and daughter ions of tomato, potato, pepper and nightshade Systemins and HypSys peptides.

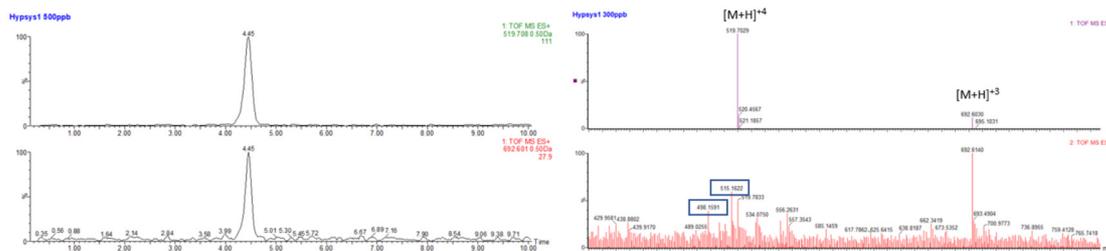


Figure 2. UPLC-QTOF chromatograms of HypSys standard after filtrating m/z ratios corresponding to 3⁺ and 4⁺ ions and m/z spectra of parental and daughter ions.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank the Services Centrals of Universitat Jaume I for the technical support. This work is financially supported by the Plan de Promoci3n de la Investigaci3n-Universitat Jaume I P1.-1B2013 and P1.1B2015-33, and the GVA/2018/110 of the Generalitat Valenciana.

LITERATURE CITED

- Albert, M. (2013) *J. Exp. Bot.* 64:5269-5279.
 Huffaker, A., *et al.*, (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10098-10103.
 Pastor, V., *et al.* (2013) *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:1334-1344.
 Pastor, V., *et al.* (2018) *Plant Methods* 14:33.
 Pearce, G., *et al.* (1991) *Science* 253:895-897.
 Pearce, G., *et al.* (2001) *Nature* 411:817-820.
 Yamaguchi, Y., Huffaker, A. (2011) *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:351-357.
 Zhang, H., *et al.* (2018) *Plant Cell* 30:652-667.

Un locus ampliamente distribuido en el grupo *B. cereus* se encuentra implicado en la formación de biofilms.

Álvarez-Mena, A.* , Caro-Astorga, J., de Vicente, A., Romero, D.

Departamento de Microbiología, Centro de Supercomputación y Bioinnovación, Universidad de Málaga, Calle Severo Ochoa 34, Parque Tecnológico de Andalucía, 29590 Málaga, España. *alvarezmena@uma.es

Bacillus cereus es un patógeno humano implicado en una serie de intoxicaciones alimentarias debido al consumo de verdura o comida procesada contaminada. La producción de esporas y la formación de comunidades denominadas biopelículas, son dos factores claves en la contaminación de los alimentos, la transmisión y la producción de toxinas perjudiciales para el consumidor. Durante su ciclo de vida, *B. cereus* es capaz de sobrevivir como saprófito, así como en asociación con una gran variedad de hospedadores: humanos, plantas e insectos.

Se piensa que la formación de comunidades bacterias posee un importante papel en la supervivencia bacteriana y adhesión a superficies. En estudios previos se han identificado dos componentes proteicos de la matriz extracelular, TasA y CalY, implicados en la formación de biopelículas en *B. cereus*. La región cromosómica localizada entre estas dos proteínas contiene el locus *bc_1280*, que se encuentra ampliamente distribuido en el grupo de *B. cereus* y especies relacionadas. Estudios transcriptómicos y proteómicos han demostrado que *bc_1280* se encuentra sobreexpresado en células de biofilm en comparación con células platónicas. La delección del gen *bc_1280* en las cepas *B. cereus* ATCC14579 y AH187 presenta un fenotipo deficiente en la formación de comunidades bacterianas. El posible papel de esta proteína en la formación de biopelículas, y su amplia distribución a lo largo del grupo *B. cereus*, nos ha llevado a realizar un estudio en mayor detalle para determinar la funcionalidad de este locus en la multicelularidad y la interacción con hospedadores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto AGL2016-78662-R del Gobierno de España. Ana Álvarez posee un contrato predoctoral (BES-2017-081275) del programa FPI del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

Sesión IX: Miscelánea 2

Moderador: Paula García Fraile.

Análisis funcional de la maduración de la hidrogenasa [FeNi] de *Rhizobium leguminosarum*: una metaloenzima de expresión simbiótica en nódulos de leguminosas.

Albareda, M. *, Pacios, L.F., Palacios, J.M.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (C.B.G.P.) UPM-INIA, Campus de Montegancedo, 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España y Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrónoma, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. *marta.albareda@upm.es

INTRODUCCIÓN

Algunos rizobios sintetizan hidrogenasas [FeNi] que catalizan la oxidación del H₂ liberado durante el proceso de fijación biológica de nitrógeno. El reciclado del H₂ es importante en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa porque recupera parte la energía gastada en la fijación de nitrógeno, incrementándose la eficiencia energética del proceso. Las hidrogenasas [FeNi] son enzimas unidas a la membrana que contienen dos subunidades: una subunidad mayor (HupL) con el centro activo de la enzima [cofactor NiFe(CN⁻)₂CO], y una subunidad menor (HupS), con tres agrupaciones Fe-S implicadas en la transferencia de electrones. En la síntesis de la hidrogenasa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* intervienen 18 proteínas codificadas en la agrupación génica *hup/hyp* (*hupSLCDEFGHIJKhypABFCDEX*) localizada en el plásmido simbiótico (Ruiz-Argüeso *et al.*, 2001). Las proteínas HypCDEF participan coordinadamente en la síntesis de la forma intermedia del cofactor [Fe(CN)₂CO], y HypC participa además en su transferencia al precursor de la subunidad mayor (pre-HupL) vía HupK. Esta última proteína, solo presente en los sistemas aeróbicos, está implicada en el ensamblaje del precursor del cofactor previa a su transferencia a pre-HupL (Albareda *et al.*, 2014). Otras proteínas auxiliares (HypA y HypB) incorporan el níquel al cofactor una vez que éste se ha insertado en la subunidad mayor. Finalmente, pre-HupL es proteolíticamente procesada por una proteasa dependiente de níquel (HupD) que corta un péptido de 15 aminoácidos del extremo C-terminal de HupL. En la forma procesada de HupL el níquel del cofactor está coordinado a la proteína a través de cuatro cisteínas muy conservadas en las hidrogenasas [FeNi]. Dos de estas cisteínas, además, coordinan el átomo de hierro, el cual a su vez está unido a dos grupos ciano (CN) y un grupo carbonilo (CO).

Estudios de modelado computacional y dinámica molecular han permitido elaborar por primera vez un modelo para la forma no procesada de HupL. En dicho modelo el níquel estaría alejado de las cisteínas y unido a dos glutamatos (E27 y E589) localizados en la región N-terminal y en el péptido del extremo C-terminal de HupL, respectivamente. En este trabajo se ha estudiado el papel funcional de estos dos residuos de HupL en la incorporación de níquel a la enzima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las deleciones en los genes de interés se generaron en el plásmido pALPF1 (Manyani *et al.*, 2005; Albareda *et al.*, 2012). En este plásmido la expresión del cluster completo de los genes de la hidrogenasa está controlada por el promotor de *fixN* (Brito *et al.*, 2002) que induce la expresión de la enzima en vida libre bajo condiciones de microaerobiosis. Los plásmidos obtenidos se transfirieron por conjugación a la cepa UPM1155 (Δ *hup/hyp*) de *R. leguminosarum*. La hidrogenasa se expresó en cultivos bacterianos crecidos en una atmósfera del 1% O₂, y la actividad de la enzima se determinó mediante un método amperométrico empleando oxígeno como aceptor de electrones (Albareda *et al.*, 2012). La variante StrepTag-HupL (HupL_{ST}) se expresó a partir de un plásmido derivado de

pBBR1MCS (Albareda *et al.*, 2012). Las alteraciones en los residuos aminoacídicos de interés se generaron mediante mutagénesis dirigida del gen *hupL_{ST}* en dicho plásmido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que la proteína mutante HupL-E589Q complementó la mutación $\Delta hupL$ hasta niveles de sólo el 60% de los observados con HupL silvestre. La inmunodetección de HupL en extractos crudos reveló la presencia de la forma procesada y no procesada de HupL aunque a niveles inferiores a los presentes con la forma silvestre de la proteína. La suplementación con níquel (5 μ M) en el medio de inducción disminuyó los valores de actividad detectados, lo que se correlacionó con un aumento de la forma no procesada de HupL. Esta situación contrastó con lo observado en el caso de la proteína silvestre, con la que se obtuvieron incrementos de un 40% en la actividad hidrogenasa en respuesta a la suplementación con níquel. La cepa con la mutación E27Q en HupL exhibió niveles de actividad muy bajos en medios de inducción sin suplemento de níquel (6% en relación a la cepa silvestre) y prácticamente nulos con níquel, detectándose en ambos casos las formas procesada y no procesada de HupL. El doble mutante E27Q/E589Q exhibió un fenotipo defectivo para la actividad hidrogenasa similar al observado en la cepa $\Delta hupL$. Trabajos previos han indicado que el residuo E27 estaría implicado en la translocación de protones procedentes de la oxidación del H₂ (Dementin *et al.*, 2004) y en la protección del cofactor [FeNi] frente a la presencia de oxígeno (De Lacey *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo junto con los estudios de modelado estructural de la interacción HupL-HupD sugieren que los residuos E27 y E589 podrían estar implicados en una adecuada incorporación del níquel a la enzima, permitiendo una interacción eficiente de pre-HupL con la proteasa HupD. Trabajos realizados con la hidrogenasa-3 de *Escherichia coli* mostraron la relevancia de residuos del extremo N- y C-terminal de la subunidad mayor en mantener una conformación accesible para la interacción con componentes del sistema implicados en la biosíntesis del cofactor de la subunidad mayor (Magalon y Böck, 2000). Por otro lado, estudios recientes con la hidrogenasa citosólica [FeNi] de *Thermococcus kodakarensis* han puesto de manifiesto que HypA interacciona con ambos dominios de la subunidad mayor para la incorporación del níquel a la enzima (Kwon *et al.*, 2018).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al Programa Propio de I+D+I de la Universidad Politécnica de Madrid PINV-18-ADPEFJ-9-4LIMUX (a M.A.), proyecto MINECO BIO2013-43040-P (a J.P.) y BIO2017-84548-R (a L.F.P.)

BIBLIOGRAFÍA

- Albareda, M., *et al.* (2012) BMC Microbiol. 12:256
Albareda, M., *et al.* (2014) J. Biol. Chem. 289:21217-21229.
Brito, B., *et al.* (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:2461-2467.
De Lacey, A., *et al.* (2004) J. Biol. Inorg. Chem. 9:636-642.
Dementin, S., *et al.* (2004) J. Biol. Chem. 279:10508-10513.
Kwon, S., *et al.* (2018) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115:7045-7050.
Ludwig, M., *et al.* (2009) J. Biol. Chem. 284:2159-2168.
Manyani, H., *et al.* (2005) J. Bacteriol. 187:7018-7026
Ruiz-Argüeso, T., *et al.* (2001) Plant Soil 230:49-57.

Comparative analyses of exoproteomes of non-rhizobial bacterial endophytes when exposed to chickpea root exudates by next-generation proteomics.

Paço, A.¹, Steinmetz, G.², Armengaud, J.², Brígido, C.^{1*}

¹Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal. ²CEA, DRF, Lab technological Innovations for Detection and Diagnostics, F-3020.7. *ccb@uevora.pt

INTRODUCTION

Legumes interact intimately with several heterotrophic microorganisms during their life cycle. Besides the well-known symbiotic nitrogen-fixing bacteria, other beneficial bacteria also have the ability to colonize legumes tissues, commonly designed as endophytes (Bulgarelli *et al.*, 2013). These bacteria play an important role on plant health and development (Kandel *et al.*, 2017). Despite the importance of these bacteria-legume interactions for plant growth, the molecular basis of legume-bacteria interactions remains poorly understood (Lu *et al.*, 2017), being the symbiotic rhizobia-legume relationship the exception. Up to date, it is not known whether there is some sort of communication between the endophytic bacteria and legumes that are behind the colonization of internal tissues of plants (Kaul *et al.*, 2016), comparable to mechanisms used by several *Rhizobia* spp. (Spaink, 2000). In order to better understand the mechanisms behind the endophytic non-rhizobial bacteria lifestyle, comparison of the differential exoproteome of a nitrogen-fixing (*Kosakonia sp.* strain MH5) and non-fixing (*Pseudomonas sp.* strain Q1) non-rhizobial bacterial endophytes when exposed to chickpea root exudates, through high-throughput proteomic analyses was performed.

MATERIAL AND METHODS

The chickpea root exudates were obtained as described by Srivastava *et al.* (1999) in distilled water filtered with a 0.2 µm filter and stored at -20 °C. Inoculum containing non-rhizobial bacterial endophytes cells were subjected to chickpea root exudates for 4 hours at 30°C in an orbital shaker. Cells exposed to liquid medium without root exudates were used as control. Three biological independent replicates per treatment were performed. Exoproteome from each treatment was obtained according to the procedure described by Hartmann *et al.*, (2014).

The peptide fractions obtained by trypsin proteolysis were subjected to tandem mass spectrometry with a Q-Exactive HF tandem mass spectrometer (Thermo) incorporating an ultra-high field Orbitrap analyzer and coupled on line to an Ultimate 3000 chromatography system (Thermo). The high resolution instrument was operated in data-dependent mode as previously described (Klein *et al.*, 2016). MS/MS mass spectra were acquired and then were assigned with the Mascot software version 2.5.1 (Matrix Science) to the *Pseudomonas sp.* Q1 or *Kosakonia sp.* MH5 annotated genomes. Peptide matches with a MASCOT peptide score below a *p* value of 0.05 were considered and proteins were validated when at least two different peptides were identified. The normalized spectral abundance factor (NSAF) was performed as previously reported (Christie-Oleza *et al.*, 2012) and spectral counts were compared between conditions using the T-Fold method of the PatternLab software (Carvalho *et al.*, 2012). The Go term of the differently expressed proteins was predicted by using the InterPro Protein sequence analysis & classification tool (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>).

RESULTS AND DISCUSSION

The analyses of these exoproteomes at an unprecedented depth by a shotgun-strategy allowed identifying 10 and 149 upregulated proteins in the MH5 and Q1 strains, respectively. Both bacteria presented differently expressed proteins involved in bacterial growth and cell division, carbohydrate metabolism, stress response, nitrogen metabolism and transmembrane transport in their exoproteomes, suggesting that are shared overarching metabolic strategies on legume-plant interaction such as plant root colonization. On the other hand, proteins involved in siderophore transport and vitamin K2 biosynthesis were exclusively found in MH5 exoproteome whereas proteins involved in molecular mechanisms for energy production, antifungal activity, biofilm formation, vitamins B and cell envelope biosynthesis were found in the Q1 exoproteome. These results indicate that these differences can be seen as signature metabolisms, metabolisms specific for lineages that may be responsible for specific plant-bacteria interactions. Overall, this comparative high-throughput proteomics analysis, which allows identifying thousands of proteins, contributes to unveil genetic factors involved in the endophytic lifestyle as well as a better understanding of the functioning of bacterial endophytes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by FEDER funds through the COMPETE 2020 (POCI), and FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia in the framework of the project POCI-01-0145-FEDER-016810 (PTDC/AGR-PRO/2978/2014) and the Strategic Project UID/AGR/00115/2013. CB acknowledges a Post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/94751/2013) from FCT.

REFERENCES

- Bulgarelli, D., *et al.* (2013) *Annu. Rev. Plant. Biol.* 64:807-838.
- Carvalho, P.C., *et al.* (2012) *Bioinformatics.* 28:1652-1654.
- Christie-Oleza, J.A., *et al.* (2012) *BMC Genomics* 13:73.
- Hartmann, E.M., *et al.* (2014) In: *Host-Bacteria Interactions. Methods and Protocols.* Annette C. VergunstDavid O'Callaghan (eds.). Springer NY, pp, 275-285.
- Kandel, S.L., *et al.* (2017) *Microorganisms* 5:77.
- Kaul, S., *et al.* (2016) *Front. Plant Sci.* 7:955.
- Klein, G., *et al.* (2016) *Nanotoxicology.*10:1555-1564.
- Lu, J., *et al.* (2017) *Front. Microbiol.* 8:2255.
- Spaink, H.P. (2000) *Annu. Rev. Microbiol.* 54:257- 288.
- Srivastava, P., *et al.* (1999) *Microbiol. Res.* 154:49-55.

Estudio de la biopelícula formada por dos especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas.

Heredia-Ponce, Z.M.^{1*}, Gutiérrez-Barranquero, J.A.¹, Purtschert, G.², Eberl, L.², Cazorla, F.M.¹, de Vicente, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos, Málaga (España). ²Department of Plant and Microbial Biology, Universidad de Zúrich, Zúrich (Suiza). *zahiraheredia@uma.es

INTRODUCCIÓN

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* constituyen un modelo de estudio de la interacción microorganismo-planta. *Pseudomonas syringae* es una especie que produce enfermedades en la parte aérea de algunas plantas. Por otro lado, *Pseudomonas chlororaphis* interacciona con la raíz y ha demostrado ser un agente de control biológico. Ambas especies forman biopelículas y, a pesar de su diferente estilo de vida, análisis *in silico* han puesto de manifiesto la existencia de regiones genómicas tanto comunes como diferenciales que parecen estar implicadas en la biosíntesis de matriz extracelular. Se han construido mutantes de estas regiones y analizado su implicación en la formación de biopelícula y aspectos relacionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis *in silico*: los análisis *in silico* se han llevado a cabo utilizando la plataforma online NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y la base de datos de pseudomonas (www.pseudomonas.com).

Construcción de mutantes: los mutantes se han construido por delección utilizando el protocolo descrito por Matas *et al.* (2014).

Análisis de la formación de biopelícula en placas multipocillo: las condiciones de cultivo han sido medio Triptona-Peptona-Glicerol (TPG) a 25 °C. Los cultivos se han ajustado a 0,08 u.a a 600 nm y se ha analizado la formación de biopelícula desde las 24 horas hasta varios días.

Análisis de la formación de biopelículas en “*Flow-cell chambers*”: El medio utilizado ha sido medio mínimo ABC. En *P. syringae*, se ha suplementado con glucosa 1 mM y extracto de levadura al 0,005%. En *P. chlororaphis*, se ha suplementado con citrato sódico 1 mM. El flujo se ha mantenido constante a 0,7 rpm. Se ha analizado el progreso de la formación de biopelícula a 25 °C durante 24, 48 y 72 h.

Análisis de la movilidad tipo swimming y swarming: en *P. syringae*, la movilidad tipo swimming y swarming se ha analizado en medio KB diluido 20 veces con 0,3% y 0,5% de agar, respectivamente. En *P. chlororaphis*, en medio TPG.

Unión de Rojo Congo en placa: se ha analizado en medio TPG suplementado con rojo Congo a una concentración de 20 µg/ml y a 25 °C de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 (PssUMAF0158) y *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 (PcPCL1606), las cepas utilizadas en este estudio, se han localizado regiones genómicas ortólogas a las regiones codificantes para los polisacáridos alginato y Psl de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Como regiones diferenciales, en PssUMAF0158 se ha elegido la región codificante del polisacárido celulosa y en PcPCL1606 se ha localizado la región codificante de la proteína amiloide Fap (Dueholm *et al.*, 2010). De cada región ortóloga, se ha delecionado un gen que, según bibliografía.

codifica para una proteína esencial para la producción de cada componente extracelular mencionado (Arrebola *et al.*, 2015; Dueholm *et al.*, 2010; Franklin *et al.*, 2011). De entre la batería de mutantes simples, dobles y triples de PssUMAF0158 hasta el momento se han encontrado alteraciones en la formación de biopelícula, movilidad y unión de Rojo Congo en placa. En PcPCL1606, sólo el mutante en la producción del polisacárido Psl presenta alteraciones en la formación de la biopelícula. Los resultados conseguidos hasta el momento sugieren seguir profundizando en el papel del polisacárido Psl en la arquitectura de la biopelícula y por ello en ambas cepas en estudio se hipotetiza sobre su posible rol en la interacción con la planta huésped.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia de la CICE, Junta de Andalucía (P12-AGR-1473) y el Proyecto del Plan Nacional I+D+I MINECO (AGL2017-83368-C2-1-R), cofinanciados ambos con fondos FEDER. Zaira María Heredia está financiada por un contrato del programa FPU del Ministerio de Educación (referencia FPU15/03644).

BIBLIOGRAFÍA

- Arrebola, E., *et al.* (2015) FEMS Microbiol. Ecol. 91:fiv071.
Dueholm, M.S., *et al.* (2010) Mol. Microbiol. 77:1009-1020.
Franklin, M.J., *et al.* (2011) Front. Microbiol. 2:167.
Matas, I.M., *et al.* (2014) Mol. Plant Microbe Interact. 27:424-436.

Regulación de la síntesis del exopolisacárido ML β -glucano por un sistema de “*partner-switching*” en *Sinorhizobium meliloti*.

Baena, I.¹, Pérez-Mendoza, D.², Bonilla, I.¹, Sanjuán, J.², Lloret, J.^{1*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid (España). ²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18160 Granada. *javier.lloret@uam.es

Además de los dos exopolisacáridos de relevancia simbiótica, el succinoglicano (EPS I) y el galactoglucano (EPS II), *Sinorhizobium meliloti* es capaz de sintetizar otros exopolisacáridos, entre los que se encuentra un β -D-glucano lineal de enlaces mixtos 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4 alternantes (ML β -glucano). Aunque no es necesario para la correcta formación del nódulo simbiótico, el ML β -glucano participa en la formación de biopelículas y en la correcta adhesión de las bacterias a las raíces de sus plantas hospedadoras. Los genes implicados en la síntesis del polisacárido, que codifican la sintasa del glucano y una proteína posiblemente relacionada con su secreción, están regulados transcripcionalmente por el sistema de “*quorum sensing*”. Además, la actividad de la sintasa está regulada positivamente por altos niveles del segundo mensajero c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015).

En este trabajo hemos caracterizado un operón que regula la síntesis del ML β -glucano. El operón codifica seis proteínas, tres de las cuales presentan similitud con los sistemas tipo “*partner switching*” que regulan la respuesta a estrés o el desarrollo de la espora en *Bacillus subtilis*. Estos sistemas se caracterizan por secuestrar o liberar un factor sigma de la ARN polimerasa, responsable de la transcripción de los genes específicos involucrados en dicha respuesta, mediante cambios en el estado de fosforilación de una proteína que ejerce de “conmutador” del sistema (Sharma *et al.*, 2011)). Sin embargo, en *S. meliloti* el sistema no parece interactuar con ningún factor sigma, sino con una diguanilato ciclasa codificada por un gen del mismo operón. Así, el sistema regula los niveles de c-di-GMP, que a su vez controlan la producción del ML β -glucano.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a los proyectos MINECO/FEDER EU BIO2014-55075-P y BIO2017-83533-P.

BIBLIOGRAFÍA

Pérez-Mendoza, D. *et al.* (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112:E757-765.
Sharma, A.K., *et al.* (2011) Cell. Physiol. Biochem. 28:407-422.

Impacto de la matriz extracelular de *Bacillus subtilis* en la respuesta fisiológica de cucurbitáceas.

Sopeña-Torres, S.^{1*}, de Vicente, A.², Romero, D.^{1,2*}

¹Departamento de Microbiología, Centro de Supercomputación y Bioinnovación, Universidad de Málaga, Calle Severo Ochoa 34, Parque Tecnológico de Andalucía, 29590 Málaga, España. ²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071 Málaga, España. *sara.storres@uma.es / diego_romero@uma.es

Las plantas viven en asociación con una gran variedad de microorganismos, y han desarrollado estrategias para discriminar entre microorganismos beneficiosos y patógenos. *Bacillus subtilis*, descrito como agente de biocontrol en cucurbitáceas frente a patógenos como el oídio, es capaz de colonizar distintas superficies de las plantas, como las raíces o las hojas, mediante el establecimiento de comunidades bacterianas denominadas biopelículas o biofilms. Para establecerse en la parte aérea de las plantas, *B. subtilis* debe enfrentarse a condiciones ambientales adversas, como son los cambios de temperatura, el viento, la radiación solar y la reducida disponibilidad de nutrientes impuesta por la cutícula vegetal, lo que limita su colonización y crecimiento en dicha superficie. Por otro lado, *Bacillus* es capaz de influenciar el estado fisiológico de las plantas, promover su crecimiento o inducir una resistencia sistémica frente a patógenos. Para formar biofilms, *Bacillus* secreta una serie de compuestos, entre los que destaca la surfactina, que promueve el ensamblaje de una matriz extracelular en la que se embeben las células, cuyos componentes mayoritarios son proteínas (por ejemplo, las proteínas TasA y TapA, que forman fibras amiloides) y exopolisacáridos.

Nuestro principal objetivo es determinar cómo el establecimiento de las comunidades de *Bacillus* afecta al estado fisiológico de las plantas, principalmente melón y pepino, y qué papel juegan los componentes de la matriz extracelular en la interacción con las plantas, así como los mecanismos por los cuales las plantas modulan la formación de dichas comunidades en la superficie de las hojas. El análisis de la respuesta de *Arabidopsis* y melón a distintos componentes de la matriz extracelular de *B. subtilis* sugiere que tanto la surfactina como los elementos mayoritarios de la matriz (las proteínas TasA y TapA, exopolisacáridos) activan mecanismos de señalización en ambas especies, que pueden promover el crecimiento de la planta o anticipar la defensa frente a patógenos.

COMUNICACIONES

Estudio del operón like-TetR reprimido en presencia de flavonoides en *Sinorhizobium fredii* HH103.

Almozara, A.*, Navarro-Gómez, P., Acosta-Jurado, S., Alías-Villegas, C., Pérez-Montaño, F., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M.
Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). *andres.almozara@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Para el establecimiento de la simbiosis entre las bacterias conocidas como rizobios y las leguminosas, sus hospedadores específicos, es necesario que la bacteria sintetice unas moléculas conocidas como Factores de Nodulación (NF) para los que la planta tiene receptores específicos en el córtex de la raíz (Oldroyd, 2013). Los rizobios producen NF en presencia de flavonoides, compuestos fenólicos presentes en los exudados radicales. Los flavonoides son capaces de modificar la expresión de ciertos genes dando pie a que comience la interacción simbiótica (Oldroyd, 2013). Este proceso es altamente selectivo por lo que la familia de factores Nod producidos por cada rizobio determina que leguminosa podrá hospedar (López-Baena *et al.*, 2016). Para el establecimiento de la estrecha relación simbiótica rizobio-leguminosa existe un complejo diálogo molecular. A raíz de estudios transcriptómicos llevados a cabo en *Sinorhizobium fredii* HH103, pudo comprobarse que, entre los genes cuya expresión se afecta en estas condiciones, se encuentra un operón reprimible por flavonoides (Pérez-Montaño *et al.*, 2016). Tras estudios comparativos, se estableció una hipótesis de partida, en la que dicho operón codificaba para un regulador transcripcional de tipo TetR y una bomba de eflujo multidroga.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de los dos genes reprimibles por flavonoides se hicieron dos mutantes en los genes *tetR* y *mdtE* por inserción de del plásmido PVO155npt2GFP y se sobreexpresó el gen *tetR* usando un vector multicopia PBBR1MCS5. Una vez obtenidos los mutantes se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa en el fondo de los dos mutantes y del sobreexpresado, portando el plásmido pMP240 (promotor del gen *nodA* fusionado transcripcionalmente al gen informador *lacZ*) en ausencia de flavonoides y en presencia de distintas concentraciones del mismo. Los flavonoides se disolvieron a 1 μ g/ml en etanol puro, 1/64 μ g/ml, 1/128 μ g/ml y 1/256 μ g/ml. Tras estos análisis se han realizado qPCR de los mismos en presencia y ausencia de flavonoides para determinar de manera fina como varía la expresión de estos genes en los distintos fondos mutantes. El ARN fue extraído usando el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Suiza). Por último, se han llevado a cabo test de nodulación utilizando como leguminosa hospedadora soja Williams para determinar si estos mutantes poseen un fenotipo simbiótico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primera instancia se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa para arrojar luz sobre la hipótesis de partida. En el ensayo transcriptómico que se hizo sobre el genoma de HH103, se mostró una represión de la bomba eflujo multidroga y del regulador transcripcional like-TetR (Pérez-Montaño *et al.*, 2016). Los flavonoides son para muchas bacterias una droga con efectos tóxicos, en este caso, la hipótesis plantea que dicha bomba deba reprimirse para que los flavonoides comiencen a acumularse en el interior celular dando lugar a la expresión diferencial necesaria para simbiosis. En este momento estamos estudiando mediante ensayos de actividad β -galactosidasa cómo se afecta la expresión

del gen *nodA* en concentraciones decrecientes de flavonoide. Los resultados preliminares muestran que, en la estirpe silvestre, la expresión de *nodA* baja conforme lo hace la concentración de flavonoides. Sin embargo, eso no ocurre en el mutante *mdtE*. Además de repetir estos experimentos, se van a realizar ensayos de qPCR en los que se cuantificará la expresión de los genes *nodA*, *tetR* y *mdtE* en los fondos *tetR⁻*, *mdtE⁻* y *tetR* sobreexpresado (obviando el gen de cada propio mutante) en dos condiciones, en ausencia y presencia de flavonoides a 1 µg/ml. Si estos resultados fueran interesantes quizás tendría sentido explorar la expresión de estos genes en condiciones de no saturación de flavonoides, pues según su hipotética función biológica, podrían tener un comportamiento más interesante. En la actualidad se están iniciando los ensayos de nodulación en soja Williams de los distintos mutantes y el sobreexpresado el gen *tetR*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad referencia BIO2016-78409-R. Pilar Navarro-Gómez disfruta de una beca predoctoral del VI Plan Propio de la Universidad de Sevilla. Andrés Almozara disfruta de un contrato de empleo joven (PEJUS2) de la Junta de Andalucía.

BIBLIOGRAFÍA

- Oldroyd, G.E. (2013) Nat. Rev. Microbiol. 11:252.
López-Baena, F.J., *et al.* (2016) Int. J. Mol. Sci. 17:755.
Pérez-Montaña, F. *et al.* (2016). Sci. Rep. 6:31592.

Estudio de la función de las tres copias del gen *nodA* presentes en *Rhizobium tropici* CIAT 899 en la simbiosis con leguminosas.

Ayala-García, P.^{1*}, del Cerro, P.¹, Buzón, P.¹, Jiménez-Guerrero, I.¹, Pérez-Montaña, F.¹, López-Baena, F.J.¹, Gil-Serrano, A.M.², Megías, M.¹, Ollero, F.J.¹

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla (España). ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 1. 41012 Sevilla (España). *paulayalagarcia@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La simbiosis rizobio-leguminosa comienza con un diálogo molecular entre ambos organismos. Es la leguminosa quien inicia este diálogo, secretando por las raíces diferentes compuestos entre los que se encuentran los flavonoides activadores de la proteína NodD, que lleva a cabo la activación de la expresión de los genes *nod* en la bacteria. Estos genes *nod* son los encargados de la síntesis y secreción de factores de nodulación (NF), originando la formación de estructuras especializadas en la planta conocidas como nódulos, donde tiene lugar la fijación de nitrógeno. El esqueleto de estos NF es sintetizado por las proteínas codificadas por el operón *nodABC*, mientras que el resto de los genes *nod* están involucrados en la decoración y secreción de estos NF. *Rhizobium tropici* CIAT 899, establece simbiosis con la judía (*Phaseolus vulgaris*) y se caracteriza por la tolerancia a distintas condiciones de estrés, así como por la síntesis de NF bajo estrés osmótico (Estévez *et al.*, 2009). CIAT 899 presenta hasta tres copias del gen *nodA* localizadas en el plásmido simbiótico. *nodA1* se encuentra bajo la regulación de una caja de nodulación (NB1) y cerca del gen *nodD1*, del mismo modo *nodA2* se encuentra regulado aguas abajo de la caja de nodulación 2 (NB2) y en las cercanías del gen *nodD2*. Sin embargo, la expresión del gen *nodA3* no está regulada por ninguna caja de nodulación, siguiendo una regulación independiente de la proteína NodD. A partir de estos antecedentes se decidió estudiar la función de las tres copias del gen *nodA* de CIAT 899.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los distintos genes *nodA*, se deleccionaron mediante el método de solapamiento por PCR descrito en Griffiths y Long (2008), obteniendo mutantes simples ($\Delta nodA1$, $\Delta nodA2$ y $\Delta nodA3$), dobles ($\Delta nodA1\Delta nodA2$, $\Delta nodA1\Delta nodA3$ y $\Delta nodA2\Delta nodA3$) y el triple mutante ($\Delta nodA1\Delta nodA2\Delta nodA3$). Para los ensayos de *qRT-PCR*, el ARN total fue extraído usando un kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche). La síntesis de ADNc se realizó usando el kit PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Takara). Para el ensayo de *qPCR* se utilizó el kit de SYBR® Green (Bio-rad). Los ensayos de cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron marcando los NF con 0.2 μ Ci of N-acetil-D-[1-¹⁴C]-glucosamina (actividad 0.05 mCi). Los NF fueron extraídos con butanol y aplicados en placas de TLC utilizando acetónitrilo/agua (1:1) como fase móvil. Las placas de TLC fueron expuestas en películas Fuji BAS-III durante 10 días. Los NF purificados se utilizaron también para ensayos de actividad biológica de acuerdo al protocolo descrito en del Cerro *et al.* (2017). Finalmente, se hicieron ensayos de nodulación en las *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* y *Lotus burtii* tal y como se describe en del Cerro *et al.* (2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sorprendentemente, todos los mutantes seguían nodulando en las leguminosas ensayadas, excepto el doble mutante $\Delta nodA1\Delta nodA3$ en *P. vulgaris* y *L. burtii*, y el triple mutante

que no noduló en ninguna de las leguminosas ensayadas. Con respecto al gen *nodA3*, estudios transcriptómicos (Pérez-Montaña *et al.*, 2016) mostraron que no se induce en presencia de apigenina. Estos resultados ya se podían prever ya que el gen *nodA3* no se encuentra bajo la regulación de ninguna caja de nodulación, lo que nos hace pensar que se expresa de forma constitutiva. Además, el doble mutante $\Delta nodA1 \Delta nodA2$ es capaz de nodular en todas las leguminosas de estudio lo que indica que la proteína NodA3 juega un papel importante en el proceso de nodulación.

Los estudios de RP-TLC detectaron la producción de NF de todas las estirpes en presencia de apigenina, salvo los mutantes $\Delta nodA1 \Delta nodA3$ y $\Delta nodA1 \Delta nodA2 \Delta nodA3$. Por lo tanto, ¿Cómo establece el doble mutante $\Delta nodA1 \Delta nodA3$ simbiosis con *P. vulgaris* y *L. burttii*? Se comprobó en ensayos de RP-TLC que en presencia de estrés osmótico (NaCl 300 mM) el mutante $\Delta nodA1 \Delta nodA3$ sí producía NF a diferencia del triple mutante que no lo hizo. produjo una mayor cantidad de NF con respecto al triple mutante que no produjo. A continuación, los estudios realizados mediante espectrometría de masas revelaron la presencia de un mayor número de NF en ambas condiciones en el mutante $\Delta nodA1 \Delta nodA3$ en comparación con el triple mutante. Finalmente se llevaron a cabo ensayos de actividad biológica de los NF purificados de la estirpe silvestre, doble mutante $\Delta nodA1 \Delta nodA3$ y el triple mutante en *P. vulgaris*. Los resultados mostraron que el triple mutante no indujo la formación de primordios nodulares, mientras que el doble mutante $\Delta nodA1 \Delta nodA3$ indujo más primordios nodulares en presencia de estrés osmótico que en presencia de apigenina.

Todos estos resultados nos hacen plantear la hipótesis de que la inducción de los factores de nodulación bajo estrés osmótico podría tener un papel importante en la simbiosis de CIAT 899 con algunas leguminosas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a un Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad referencia AGL2016-77163-R. Pablo del Cerro disfruta de una beca FPU (FPU14-00160) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

BIBLIOGRAFÍA

- del Cerro, P., *et al.* (2017) *Sci. Rep.* 7:46712.
Estévez, J., *et al.* (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* 293:220-231.
Griffitts, J.S., Long, S.R. (2008) *Mol. Microbiol.* 67:1292-1306.
Pérez-Montaña, F., *et al.* (2016) *BMC Genomics* 17:198.

Inoculantes bacterianos aplicados al cultivo de fresa como agentes promotores de crecimiento y biocontrol, en ensayo de campo.

Viejobueno, J.^{1,2}, De los Santos, B.², Camacho, M.^{2*}

¹INTA EEA Famaillá. Ruta Prov. 301 km 32, (4132) Famaillá, Tucumán. (Argentina). ²IFAPA Centro Las Torres. Ctra Sevilla-Cazalla Km 12,200. 41200 Alcalá del Río, Sevilla.

*mariag.camachomartinez@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Huelva, el cultivo de frutos rojos constituye uno de los sistemas agrícolas más productivos, pero altamente dependiente de insumos agrícolas y, en particular, de productos fitosanitarios de síntesis química. Tanto las actuales demandas de consumidores y mercados como el marco normativo, fomentan el cambio desde estos sistemas intensivos basados en el control y la fertilización química hacia sistemas más sostenibles, basados en alternativas físicas y biológicas. En este contexto, es especialmente importante buscar nuevos métodos de producción agronómica y ecológicamente sostenibles. La potenciación del sistema radical de la planta puede ser de gran importancia para minimizar el aporte de fertilizantes nitrogenados que actualmente se utiliza en la agricultura. La utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR (del inglés, plant growth-promoting rhizobacteria), biofertilizadoras y bioprotectoras podría disminuir considerablemente la cantidad de fertilizantes y de pesticidas utilizados en los cultivos en la actualidad. La aplicación excesiva de estos productos crea, además del aumento de los costes de producción, graves problemas de contaminación y eutrofización de las aguas subterráneas y superficiales. También contribuyen al aumento del efecto invernadero debido a la generación, por desnitrificación, de compuestos nitrogenados intermediarios (como el óxido nitroso entre otros).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo en campo durante la campaña 2017/2018 en la Finca experimental “El Cebollar” situada en Moguer (Huelva), perteneciente al Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria (IFAPA).

Se utilizó la variedad de fresa ‘Rociera’ cultivada en un macro-túnel de propileno y suelo biosolarizado, en que se disminuyó la fertilización a un 70%. Se aplicaron tres tratamientos bacterianos, denominados Hv16, Hvs8 y Rec3, constituidos por bacterias seleccionadas en ensayos previos por su capacidad de promoción de crecimiento, biocontrol o ambas, respectivamente. Las bacterias se crecieron en los medios de cultivos apropiados y, una vez crecidas, se centrifugaron y resuspendieron en sales minerales. Las raíces de las plantas de fresa se embebieron durante 60 min en una suspensión bacteriana (10^8 células·mL⁻¹) antes de la siembra. Se inocularon 25 plantas por tratamiento, incluyendo un control no inoculado. Las bacterias se re-inocularon cada mes, a razón de 20 mL de suspensión bacteriana por planta durante los 7 meses de duración del ensayo.

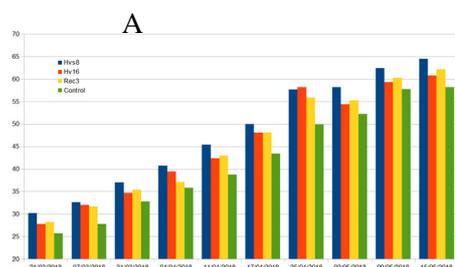
Los parámetros de calidad de fruta se determinaron a principio y final de campaña, en 3 pseudoréplicas, consistiendo cada una de ellas en un homogenizado de 6 frutos.

Los parámetros analizados fueron: contenido en azúcares, pH, acidez, índice de madurez, y contenido en macro y microelementos del fruto.

Los parámetros analizados en producción fueron: vigor (periódicamente hasta final de ensayo), número y peso de fruta acumulados a mitad (temprano) y final del ensayo (total) y número de plantas muertas acumuladas al final del ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción: En la Figura 1 podemos observar como todos los tratamientos bacterianos tuvieron mayor vigor a lo largo del ensayo, así como un mayor número y peso de fruta temprana y total, siendo éstos últimos significativos para las cepas Hv16 y Hvs8.



	B			
	NFTemp	NFTotal	PFTemp	PFTotal
Hv16	15 a	56 a	480 a	1506 a
Hvs8	13 ab	58 a	422 ab	1544 a
Rec 3	13 ab	53 ab	396 ab	1407 ab
Control	12 b	47 b	345 b	1238 b

Figura 1: A) Vigor de las plantas de fresa a lo largo del ensayo. B) N° y peso de frutos temprano y total

Por último, en biocontrol (Figura 2) destacó el tratamiento Hvs8 que fue el que menor número de plantas muertas mostró, y de las cuales no se aisló *Macrophomina phaseolina* de ninguna.

Calidad: los datos de contenido en azúcares (Brix), pH, acidez e índice de madurez (cociente entre contenido en azúcares y acidez) se muestran en la Tabla 1. Como podemos observar todos los tratamientos bacterianos obtuvieron un mayor contenido en azúcares, tanto a mediados de campaña (1), como al finalizar la misma (2). En este punto, además, los tratamientos inoculados muestran tanto una menor acidez, como valores de pH superiores respecto al tratamiento control. Igualmente, todos los tratamientos bacterianos obtuvieron un mayor índice de madurez, llegando a alcanzar alguno de ellos (Hv16) un incremento del 40%. Valores más altos en este parámetro, indicarían una mayor calidad de fruta.

En la Tabla 2 se muestra el contenido en macro y micronutrientes de la fruta a final de campaña. En ella, podemos observar cómo la cepa Rec3 produce un aumento significativo en el contenido de la mayoría de los nutrientes analizados. Destacar el aumento producido en la concentración de algunos microelementos esenciales en la dieta, como son el Zinc o el Magnesio.

	Brix (1)	Brix (2)	pH (2)	Acidez (2)	Índice de Madurez (2)
Hvs8	10,2 A	9,0 A	3,78	0.67	13.31
Hv16	9,5 B	9,3 A	3,88	0.59	15.58
Rec 3	9,4 B	8,9 A	3,87	0.63	14.1
Control	8,7 C	8,4 B	3,72	0.76	11.15

Tabla 1: Datos de calidad de frutas de plantas de fresa a mediados (1) y final de campaña (2).

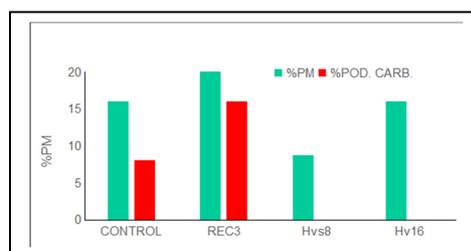


Figura 2: Mortalidad acumulada en los distintos tratamientos a final de campaña.

Trto	N*	Mg*	Fe*	B	Cu	Cr	Mn	P	S	Si	Zn
Hvs8	0.99 b	0.12b	48	7 c	4	0.54	34	0.20 b	0.07 ab	196 ab	10 b
Hv16	1.11 a	0.13 ab	46	10 ab	5	0.45	40	0.22 ab	0.07 ab	202 ab	12 b
Rec 3	1.13 a	0.14 a	51	11 a	5	0.53	41	0.24 a	0.08 a	232 a	15 a
Control	1.00 b	0.11 b	48	8 bc	4	0.36	35	0.19 b	0.06 b	181 b	11 b

Tabla 2: Contenido en macro y micronutrientes de las frutas de fresa a final de campaña. *Macroelementos: g/100g; Microelementos: ppm.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido cofinanciado al 80% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, dentro del Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014-2020.

Impacto del “quorum sensing” sobre la simbiosis de *Rhizobium tropici* CIAT899.

Aunión, A., Alías-Villegas, C., Cubo, T., Ollero, F.J., del Cerro, P., Espuny, M.R.*

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). *espuny@us.es

INTRODUCCIÓN

Las bacterias Gram-negativas mayoritariamente usan moléculas del tipo N-acil homoserina lactonas (AHL) para comunicarse entre ellas mediante el proceso denominado “quorum sensing” (QS). Un sistema típico de QS mediante AHL implica la actuación de una proteína de la familia LuxI que sintetiza la AHL, que interacciona a concentraciones de quórum con la correspondiente proteína de la familia de reguladores LuxR afectando la expresión de genes. En las bacterias Gram-negativas asociadas con plantas, el sistema QS-AHL es usado no sólo por las bacterias patógenas, sino también por las simbióticas y las que ejercen control biológico para regular un amplio espectro de fenotipos desde la virulencia, la competencia en la rizosfera, la conjugación, la secreción de enzimas hidrolíticas y la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos.

R. tropici CIAT899 es una bacteria que nodula y fija nitrógeno atmosférico (N₂) en asociación simbiótica con importantes leguminosas de interés como *Phaseolus vulgaris* y *Leucena leucocephala*. La interacción simbiótica ocurre a través de un diálogo molecular en el que los flavonoides secretados por las raíces de las plantas activan la proteína reguladora NodD que induce la producción y secreción de los factores de nodulación (NF) por la bacteria. El genoma de CIAT899 presenta cinco copias de genes nodD (*nodD1* a *nodD5*) localizados en el plásmido simbiótico y dos genes de síntesis de AHL (*traIA* y *traIB*) uno de ellos localizado en el plásmido a y otro en el b (el simbiótico) (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Estudios *in vitro* han demostrado que CIAT899 produce NF no sólo cuando es inducida por el flavonoide apigenina sino también cuando crece en presencia de NaCl (300 mM) (Guasch-Vidal *et al.*, 2013). En CIAT899, NodD1 es la responsable de la producción de los NF con apigenina y NodD2 de los producidos bajo estrés salino (del Cerro *et al.*, 2017).

En este trabajo se usó una estirpe derivada de CIAT899 que porta un plásmido con el gen de síntesis de una lactonasa (pME6863) que se ha demostrado carecer de AHL para conocer cómo la ausencia de estas moléculas afecta a la simbiosis. Además, se ha analizado la producción global de AHL por los distintos mutantes en los genes *nodD* en distintas condiciones como la inducción por la apigenina y la sal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las bacterias empleadas fueron *R. tropici* CIAT 899 y sus mutantes NodD1, NodD2, NodD3, NodD4, NodD5, el doble mutante NodD1NodD2 y el triple NodD1NodD2NodD3. Además, RSP 900, carente del plásmido b (pSym) y SVQ587, carente de los plásmidos a y b. Los medios de cultivo empleados fueron TY, YM, suplementados cuando se requirió con el flavonoide inductor de los genes de nodulación de CIAT 899, apigenina, o con NaCl a una concentración final de 300 mM.

Las propiedades simbióticas (número de nódulos, peso seco de la parte aérea) con la judía y la leucena se estudiaron mediante ensayos en jarros Leonard con vermiculita y solución nutritiva de Fahraeus, un mes después de la inoculación de la judía y dos meses en el caso de la leucena.

La producción global de AHL por las bacterias se realizó mediante ensayo de la β -galactosidasa usando sobrenadantes de las bacterias crecidas 5 días en distintas

condiciones (YM, YM3, YM3 suplementado con apigenina, o con NaCl a una concentración final de 300 mM) como inductores del biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4) (Cha *et al.*, 1998) . El análisis de las distintas moléculas producidas se hizo mediante cromatografía líquida de ultra alta presión/espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS) de sobrenadantes de cultivos de 5 días en YM3 (3 g/L de manitol) extraídos con diclorometano acidificado con ácido fórmico (0,1 %).

RESULTOS Y DISCUSIÓN

La producción de AHL por CIAT 899 no sufrió cambios cuando se cultivó en YM con distintas concentraciones de manitol (3 o 10 g/L); sin embargo, se observó un incremento de producción no significativo bajo estrés salino (NaCl 300 mM) y una disminución significativa cuando es inducida por el flavonoide apigenina. La presencia del gen de la lactonasa en CIAT 899 provoca que no se detecte producción de AHL. En cuanto a la producción de AHL por los distintos mutantes lo más llamativo se encontró en el mutante NodD1⁻ puesto que se observó una disminución significativa de producción en todas las condiciones frente al silvestre, excepto en presencia de apigenina donde ya la producción del silvestre era menor. Estos resultados indicarían que la producción de AHL en CIAT 899 es dependiente de NodD1 y que la apigenina provoca una disminución de la producción quizás debido a que NodD1 activado por este flavonoide deriva su función a la activación de otros genes.

Mediante PCR se comprobó que la estirpe RSP 900 curada del plásmido b (pSym) carecía efectivamente del gen *traIB*, mientras que la curada de los plásmidos a y b (SVQ587) carecía de *traIA* y de *traIB*. Tras determinar la producción de AHL con el biosensor NT1 (pZLR4) y mediante espectrometría de masas se observó que ambas bacterias producen cantidades insignificantes de AHL comparadas con CIAT 899, lo que podría indicar que el gen *traIA* no es funcional.

Los ensayos de nodulación con judía determinaron que la producción de AHL es importante para una correcta simbiosis con esta planta, puesto que las plantas inoculadas con CIAT 899 (pME6863) sufrieron disminución significativa tanto en el número de nódulos como en el peso seco de la parte aérea. Sin embargo, en plantas de leucena sólo se observó una disminución no significativa en el peso seco de la parte aérea. Posiblemente, al ser leucena una especie arbustiva sería necesario mantener más tiempo el ensayo para que las diferencias alcancen valores significativos.

En la actualidad se están construyendo mutantes en los genes *traIA* y *traIB*, así como el doble mutante para determinar el papel exacto de cada uno de ellos tanto en la simbiosis como en la producción de AHL.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con fondos del proyecto AGL2016-77163-R del Ministerio de Economía y Competitividad y por el VIPPIT-2017-I.5 of Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Cha, C., *et al.* (1998) Mol. Plant Microbe Interact. 11:1119-1129.
del Cerro, P., *et al.* (2017). Sci. Rep. 7:46712.
Guasch-Vidal, B., *et al.* (2013) Mol. Plant Microbe Interact. 26:451-460.
Ormeño-Orrillo, E., *et al.* (2012) BMC Genomics 13:735.

La proteína caseína quinasa CK2 de *Nicotiana benthamiana* fosforila al efector NopP de *Sinorhizobium fredii* HH103 que interacciona con la ciclofilina CYP40.

Jiménez-Guerrero, I.^{1,4}, Pérez-Montaña, F.¹, Medina, C.^{1,2}, Santero, E.², Monreal, J.A.³, Burdman, S.⁴, Ollero, F.J.¹, López-Baena, F.J.^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla, España. ²Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Junta de Andalucía y Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla, España. ³Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla, España. ⁴Department of Plant Pathology and Microbiology, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel. *jlopez@us.es

INTRODUCCIÓN

El Sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) es comúnmente utilizado por bacterias patógenas para inyectar unas proteínas, denominadas efectores, directamente al interior de la célula hospedadora. Estas proteínas promueven la infección mediante la supresión de las respuestas de defensa o la alteración del metabolismo del hospedador.

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de establecer una simbiosis con plantas leguminosas. Como resultado de esta íntima interacción, se forma unas estructuras, denominadas nódulos, en las raíces de las plantas. Dentro de estos nódulos los rizobios se diferencian en bacteroides, capaces de fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en formas asimilables por la planta.

Algunos rizobios, como la estirpe de amplio rango de hospedador *Sinorhizobium fredii* HH103, posee un T3SS simbiótico involucrado en la determinación del rango de hospedador, eficiencia de la simbiosis y supresión de las respuestas de defensa. Las proteínas secretadas a través del T3SS simbiótico se denominan Nop (del inglés Nodulation outer protein) y algunas de ellas son específicas de rizobios.

En este trabajo se pretende determinar la función de la proteína efectora NopP, específica de rizobios, mediante la búsqueda de dianas de la planta que interaccionen con ella una vez secretada al interior de la célula hospedadora. Conociendo estas dianas, podremos conocer las rutas y procesos en los que potencialmente puede estar implicada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para determinar la fosforilación de NopP se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* y de actividad quinasa *in gel* usando extractos de raíces de soja e inhibidores específicos de la fosforilación para determinar la naturaleza de la proteína quinasa involucrada. La capacidad de la subunidad alfa de CK2 para fosforilar NopP se ensayó mediante fosforilación *in vitro* usando proteínas purificadas.

Para la localización de NopP en la célula vegetal, se realizó una expresión transitoria de NopP fusionada a YFP en hojas de tabaco y posterior estudio mediante microscopía confocal. Para determinar los orgánulos en los que se localiza este efector, se realizó una co-expresión transitoria en hojas de tabaco de NopP-YFP con marcadores específicos fusionados a fluoróforos.

Para determinar las dianas de NopP se realizó una expresión transitoria de NopP-YFP-HA en hojas de tabaco, co-inmunoprecipitación y análisis de proteínas mediante espectrometría de masas. La interacción con CYP40 se confirmó mediante BiFC. La expresión de los genes *SPL* (Squamosa promoter-binding like protein 6) y *AP2* (Apetalla-2) de tabaco se realizó mediante qPCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que NopP se fosforila *in vitro* por quinasas procedentes de extractos de raíces de soja. La ruta de transducción de señales que culmina en la fosforilación de NopP debe incluir Ser/Thr quinasas y Tyr quinasas.

NopP se localiza mayoritariamente en el núcleo de la célula hospedadora, donde se acumula en unos cuerpos nucleares denominados *photobodies*. Estos cuerpos nucleares están involucrados en el marcaje para la degradación de factores de transcripción y otras proteínas. Actualmente se están realizando ensayos para determinar si NopP se degrada en estas estructuras. Además del núcleo, NopP se puede encontrar en el RE donde colocaliza con filamentos de actina, posiblemente para dirigir su camino hacia el núcleo. Los ensayos de co-inmunoprecipitación indican que NopP podría interactuar con proteínas asociadas a la regulación de la transcripción, regulación del ciclo celular, proteínas de resistencia, actina y tubulina. De todas ellas seleccionamos una proteína Ser/Thr quinasa, CK2 y una posible proteína diana, CYP40. Hemos comprobado que la subunidad alfa de CK2 (con actividad quinasa) es capaz de fosforilar *in vitro* a NopP y co-localiza con ella en el núcleo. Además, CYP40 interactúa con NopP en el nucleolo. CYP40 es una chaperona del complejo RISC. Este complejo está implicado en la maduración de microARN entre ellos miR156, involucrado en la regulación de la expresión de los genes que codifican las proteínas SPL que, a su vez, regulan la expresión de genes *AP2*. La sobreexpresión de NopP provocó un aumento significativo de la expresión de los genes *SPL4*, *SPL6* y *SPL9* y del gen *TOE3* (*AP2*-like ethylene responsive).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto P11-CVI-7050 de la Junta de Andalucía y BIO2016-78409-R y AGL2016-77163-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a las convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

Estudio de las interacciones beneficiosas de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T con diferentes cereales.

Díez-Méndez, A.^{1,2,3}, Celador-Lera, L.^{1,2,3}, Mateos, P.F.^{1,2,3*}, Rivas, R.^{1,2,3}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007. Salamanca. ²Instituto Hispano Luso de Investigaciones agrarias (CIALE), Salamanca. ³Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC. *pfmng@usal.es

INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones beneficiosas planta-microorganismo se ha estudiado desde hace décadas (García-Fraile *et al.*, 2017). En este sentido, las bacterias PGPB (Plant growth-promoting bacteria) se encuentran en el foco de las investigaciones, debido a sus habilidades para incrementar las defensas de las plantas y el desarrollo vegetal (Olanrewaju *et al.*, 2017). En este tipo de interacciones mutualista, las bacterias PGPB son capaces de colonizar tanto la superficie radicular como el interior de los tejidos vegetales sin causar daños (Hallman *et al.*, 1997). Por otro lado, la bioseguridad para el medio ambiente y la salud humana es un parámetro importante a la hora de seleccionar un bioinoculante, es por ello, que las bacterias del género *Rhizobium* son una buena alternativa (García-Fraile *et al.*, 2012). Existen numerosos estudios que avalan la capacidad de los rizobia como promotores de plantas no leguminosas tales como la fresa (Flores-Félix *et al.*, 2016), el pimiento y el tomate (García-Fraile *et al.*, 2012) o cereales como el maíz (Yanni *et al.*, 2001). En este trabajo mostramos los efectos tanto en la colonización como en la promoción del crecimiento vegetal por parte de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T, una cepa super-productora de celulosa y celulasas (Robledo *et al.*, 2011) en distintos cereales como *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *Trisetum flavescens*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias empleadas. Las cepas bacterianas empleadas en este estudio fueron: *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2^T wt aislada de la corteza en descomposición de *Populus alba* (García-Fraile *et al.* 2007), el transconjugante ALA10B2^T_RFP derivada de ALA10B2^T wt.

Plantas empleadas. Para evaluar el comportamiento de ALA10B2^T se diseñaron diferentes experimentos con diferentes cereales como *Zea Mays*, *Triticum aestivum* y *Trisetum flavescens*.

RESULTADOS

En los estudios realizados, se observaron cambios morfológicos en los pelos radiculares como redirecciones (RHD), formación de “caps” y fenotipo Hot (Hole on the tip), indicando la existencia de una interacción entre ambos. También se observó que, la cepa ALA10B2^T es una gran colonizadora de la superficie radicular y los pelos radicales. Mediante microscopía confocal, se observó que esta cepa bacteriana actúa como endófito ocupando los espacios intercelulares de los cereales analizados en este estudio. Por otro lado, los estudios llevados a cabo en invernadero y en campo, nos indicaron su capacidad para promover el desarrollo vegetativo e incrementar de manera estadísticamente significativa la producción de *Zea mays*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto AGL2015-70510-R del MINECO. Alexandra Díez Méndez beneficiaria de un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León junto con el Fondo Social Europeo.

BIBLIOGRAFÍA

- Flores-Félix, J.D., *et al.* (2016) *Symbiosis* 67:25-32.
- García-Fraile, P., *et al.* (2007) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:844-848.
- García-Fraile, P., *et al.* (2012) *PLoS One* 7:e38122.
- García-Fraile, P., *et al.* (2017) En: *Probiotics and Plant Health*. V, Kumar, M. Kumar, S. Sharma, R. Prasad (eds). Springer, Singapore. pp 131-162.
- Hallmann, J, *et al.* (1997). *Can J: Microbiol.* 43:895-914.
- Olanrewaju, O.S., *et al.* (2017) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33:197.
- Robledo, M., *et al.* (2011) *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:798-807.
- Yanni, Y.G., *et al.* (2001) *Funct. Plant Biol.* 28:845-870.

Análisis de las propiedades simbióticas de mutantes en proteínas efectoras del sistema de secreción de tipo 3 de *Sinorhizobium fredii* HH103 en su interacción con *Lotus japonicus*.

Acosta-Jurado, S., Jiménez-Guerrero, I., Almozara, A., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Medina, C.*

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). *cmedina1@us.es

INTRODUCCIÓN

Sinorhizobium (Ensifer) fredii HH103, es una estirpe rizobiana de amplio rango de nodulación en leguminosas. Aunque entre sus características más prominentes destaca su capacidad de nodular en sojas comerciales americanas, se está estudiando en los últimos tiempos su interacción simbiótica con otras plantas que ofrecen fácil manipulación a nivel genético. Entre ellas, cobra especial importancia la leguminosa modelo *Lotus japonicus* que se utiliza comúnmente para estudiar el intercambio de señales y la morfogénesis de los nódulos en la interacción simbiótica rhizobium-leguminosa. *S. fredii* es incapaz de inducir la formación de nódulos en esta planta, aunque, curiosamente, varios mutantes relacionados con el sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) lo hacen eficientemente, lo que sugiere una posible respuesta de defensa de la planta frente a este sistema de secreción en esta bacteria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las bacterias empleadas en este trabajo se han probado en ensayos de nodulación con semillas *L. japonicus* cv. Gifu en placas de Petri conteniendo medio Fahraeus con agar. Las semillas germinadas se asentaron sobre papel de filtro humedecido en contacto con el medio y aproximadamente seis días después de su colocación en placa fueron inóculadas con 700 µL de los distintos cultivos a una densidad óptica de 0,02. Todas las bacterias mutantes y silvestres empleadas se marcaron con la proteína roja fluorescente DsRed para poder monitorizar el desarrollo de la infección durante la duración del experimento. La visualización de la infección se hizo mediante microscopía de fluorescencia tanto confocal como de epifluorescencia. La expresión de genes tanto de nodulación como de defensa de la planta se ha cuantificado mediante *q*PCR.

RESULTOS Y DISCUSIÓN

En el Departamento disponemos de una colección de mutantes tanto en la maquinaria de secreción del T3SS como en cada uno de los efectores identificados hasta la fecha en el genoma de HH103. Esta colección se ha usado para analizar la capacidad de nodulación en *L. japonicus*. Algunos de estos mutantes ganaron la capacidad de nodular *L. japonicus*. El papel de los genes mutados y su fenotipo simbiótico se detalla en la Tabla 1. Como controles del experimento, se utilizaron las estirpes silvestres HH103 de *S. fredii* y R7A de *Mesorhizobium loti*, cuyos fenotipos simbióticos son Nod⁻ y Nod⁺/Fix⁺, respectivamente.

Tabla 1. Resumen del fenotipo simbiótico de los diversos mutantes.

Nombre del gen	Función propuesta del mutante	Fenotipo simbiótico
<i>ttsI</i>	Regulador transcripcional de genes del T3SS	Nod ⁺ /Fix ⁺
<i>rhcJ</i>	Lipoproteína de la membrana externa componente del T3SS	Nod ⁺ /Fix ⁺
<i>nopI</i>	Proteína efectora secretada por T3SS	Nod ⁻
<i>nopC</i>	Proteína efectora secretada por T3SS	Nod ⁺ /Fix ⁺
<i>nolR</i>	Proteína reguladora implicada en el proceso de nodulación	Nod ⁺ /Fix ⁺

La ausencia de la maquinaria del T3SS (mutantes en *ttsI* y *rhcJ*) permite la invasión de la bacteria por lo que podría existir una reacción de defensa de la planta ante el reconocimiento de algún componente de la maquinaria de secreción o de algún efector secretado a través de este sistema. Curiosamente, el mutante en *nopC* sí es capaz de nodular y fijar eficazmente, de manera que es posible que esta proteína sea objeto de reconocimiento por parte de la planta y su presencia impida la invasión de la bacteria. En futuras etapas de este trabajo, se analizarán los mecanismos de infección de los distintos mutantes que han ganado la capacidad de nodular. Queremos comprobar si existe algún mutante que infecte la planta por mecanismos diferentes a tubos de infección, como la invasión intercelular.

Paralelamente, se ha analizado mediante *qPCR* la expresión de los genes de nodulación *LjNSP1/LjNSP2*, *LjNIN*, *LjENOD40*, *LjlegHb* y *Ljccs52A*, que participan en el reconocimiento de la bacteria por parte de la planta y en el desarrollo del nódulo, para determinar el momento en el que se detiene la cascada de transducción de señales que culmina en la formación del nódulo. Además, se ha estudiado también la expresión de genes de defensa como *LjPRI* para determinar si se está disparando una respuesta de defensa de la planta.

Estos estudios se complementarán con ensayos de transcriptómica dual (dual-RNAseq) para tratar de localizar genes diferencialmente expresados, tanto por la bacteria como por las plantas hospedadoras, para cada uno de los mutantes capaces de invadir esta planta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto del Plan Estatal de I+D+i BIO2016-78409-R “El regulón simbiótico de *Sinorhizobium fredii*: identificación de genes clave en la interacción simbiótica con soja y en la leguminosa modelo *Lotus*”

BIBLIOGRAFÍA

- Jiménez-Guerrero, I., *et al.* (2017) Appl. Environ. Microbiol. 83:e02770-16.
Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016) Mol. Plant Microbe Interact. 29:925-937.
Jiménez-Guerrero, I., *et al.* (2015) PLoS ONE e0142866.

Un regulador transcripcional de la familia AraC es esencial para la síntesis de factores de nodulación en condiciones de estrés osmótico en *Rhizobium tropici* CIAT 899.

del Cerro, P.¹, Ayala-García, P.¹, Buzón, P.¹, Jiménez-Guerrero, I.¹, Pérez-Montaña, F.¹, López-Baena, F.J.¹, Gil-Serrano, A.M.², Megías, M.¹, Ollero, F.J.^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 1. 41012 Sevilla, España. *fjom@us.es

INTRODUCCIÓN

La familia de plantas leguminosa establece interacciones simbióticas con unas bacterias conocidas como rizobios. Esta simbiosis comienza con un intercambio de señales, donde los flavonoides exudados por las raíces activan a un regulador transcripcional NodD, que a su vez activa la transcripción de los genes de nodulación de la bacteria, dando lugar a la síntesis de unas moléculas lipoquitooligoscarídicas conocidas como factores de nodulación (FN). Estas moléculas activan en la planta una cascada de señalización que culmina con la formación de los nódulos donde el rizobio se establecerá y fijará el nitrógeno atmosférico. *Rhizobium tropici* CIAT 899 establece simbiosis con diferentes leguminosas, entre las que destaca la judía (*Phaseolus vulgaris*) y la leguminosa modelo *Lotus japonicus*. Además, este rizobio es capaz de tolerar diferentes tipos de estreses abióticos, entre el que se incluye el estrés osmótico por medio de acumulación de moléculas compatibles como la trehalosa, el manitol y el glutamato (Fernández-Aunión *et al.*, 2010). Sorprendentemente, CIAT 899 puede producir FN en respuesta a un estrés osmótico ya sea iónico (NaCl 300 mM) o no-iónico (400 mM manitol) a través de la activación de la proteína NodD2, independientemente del flavonoide inductor (del Cerro *et al.*, 2017; del Cerro, manuscrito en preparación). Hasta ahora se desconoce cómo el estrés osmótico puede activar a NodD2. Una posibilidad es la implicación de otras proteínas que podrían regular la síntesis de FN en presencia de estrés osmótico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio transcriptómico, el ARN total se extrajo usando el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Suiza). Dos muestras independientes de ARN total se aislaron para cada condición y estirpe. El ARNm se purificó utilizando el kit MICROB Express Bacterial mRNA Purification kit (Ambion, USA). La secuenciación del ARNm y los análisis informáticos los realizó la empresa Sistemas Genómicos. Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron utilizando las distintas estirpes a las que se les introdujo el plásmido pMP240 por conjugación. Este plásmido porta el promotor del gen *nodA* fusionado transcripcionalmente al gen informador *lacZ*. Los ensayos de cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron marcando los FN con 0.2 μ Ci of N-acetil-D-[1-¹⁴C]-glucosamina (actividad 0.05 mCi). Los FN se extrajeron con butanol y se cargaron en placas de TLC utilizando acetónitrilo/agua (1:1) como fase móvil. Las placas de TLC se revelaron utilizando películas Fuji BAS-IIIIs durante 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una mutagénesis dirigida de genes que por datos transcriptómicos de los que se disponía, podrían estar implicados potencialmente en la regulación de la biosíntesis de los FN en condiciones de estrés. Se comprobó que uno de estos mutantes estaba afectado en el regulador transcripcional AraC, localizado en el plásmido simbiótico, y era incapaz de inducir los genes de nodulación en presencia de estrés salino ni de estrés osmótico.

Del mismo modo se ha demostrado, que este gen es importante en la simbiosis entre CIAT 899 y sus leguminosas hospedadoras, ya que indujo un menor número de nódulos en *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* que los que inducía la estirpe parental. En general, los reguladores transcripcionales de la familia AraC reprimen a los genes del catabolismo de azúcares por unión a su región promotora. Cuando la célula incorpora dicho azúcar se provoca un cambio en la conformación de la proteína AraC, que hace que se despegue de la citada región promotora del gen y hace posible la transcripción del gen, lo que permitirá catabolizar el azúcar en cuestión. La acumulación de moléculas compatibles para tolerar un estrés osmótico podría cambiar la conformación de este regulador, que además según estudios de ARNseq y doble híbrido, podría regular, aguas arriba, la activación de NodD2, que es fundamental para activar los genes implicados en la biosíntesis de los FN en condiciones de estrés.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a un Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad referencia AGL2016-77163-R. Además, del Cerro, P. disfruta de una beca FPU (FPU14-00160) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Aunión, C., *et al.* (2010) BMC Microbiol. 10:192.
del Cerro, P., *et al.* (2017) Sci. Rep.7:46712.

Fitomicrobiomas de halófitas: herramientas biotecnológicas para la fitorremediación de metales pesados en sedimentos costeros.

Pajuelo, E.* , Paredes-Páliz, K.I., Caviedes, M.A., Rodríguez-Llorente, I.D.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. c/ Profesor García González, s/n. 41012. Sevilla (España). *epajuelo@us.es

INTRODUCCIÓN

Los estuarios son algunos de los ecosistemas más contaminados en todo el mundo. En particular en España, el estuario conjunto del Tinto-Odiel presenta elevadas concentraciones de arsénico y metales pesados (Zn, Cu, Pb), constituyendo uno de los estuarios más contaminados de Europa. El uso conjunto de plantas adaptadas a elevadas concentraciones de sal (halófitas) y los microorganismos de su microbiota se perfila como una herramienta biotecnológica útil para la estabilización de estos contaminantes mediante la tecnología conocida como fitorremediación.

En este trabajo se han aislado bacterias rizosféricas de plantas halófitas de las marismas del Tinto-Odiel, las cuales se han utilizado como inoculantes para mejorar la adaptación de estas plantas a condiciones de estrés por metales pesados, así como una herramienta para estabilizar estos contaminantes en sedimentos costeros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han aislado bacterias de la rizosfera de plantas de *Spartina maritima* crecidas en sedimentos del Odiel. Se ha determinado su resistencia a sal y metales pesados y sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGP), particularmente: la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico, la producción de sideróforos, la síntesis de auxinas y la capacidad de fijación de N₂ atmosférico.

Utilizando las mejores bacterias, se ha diseñado un inoculante con el que se han inoculado plantas de *S. densiflora* cultivadas en sedimentos reales contaminados, estudiando: a) la germinación de las semillas; b) el crecimiento de las plantas; c) parámetros fotosintéticos; d) la acumulación de metales pesados; e) las enzimas de estrés oxidativo; y e) la expresión de genes marcadores de estrés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han aislado bacterias de la rizosfera de *Spartina maritima*, una planta halófito nativa de las marismas del Tinto-Odiel. De una colección inicial de 25 aislados, el 85% eran bacterias Gram positivas (pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*) y el 15% eran Gram negativas (pertenecientes a *Pantoea* y *Salmonella*).

A la colección completa de bacterias se les ha medido la resistencia a arsénico y metales pesados (Cu, Zn, Pb), la resistencia a sal y se han determinado sus propiedades (PGP). Con estos datos, se han seleccionado las tres mejores bacterias, en concreto dos cepas de *Pantoea agglomerans* (RSO6 y RSO7) y una de *Bacillus aryabhattai* (RSO25). Sus características se muestran en la Tabla 1 (Paredes-Páliz *et al.*, 2016a).

Se han utilizado las bacterias aisladas como inoculantes para plantas de *Spartina densiflora* (una halófito invasora naturalizada en las marismas del Tinto-Odiel). Los resultados indican un efecto positivo de las bacterias sobre la germinación en presencia de metales pesados (aumenta hasta 2,5 veces); sobre el crecimiento (aumenta hasta 5 veces, tanto en raíz como en parte aérea); sobre los parámetros fotosintéticos (la tasa fotosintética se incrementa hasta 2 veces y el intercambio gaseoso 1,8 veces); sobre las enzimas antioxidantes (que incrementan su actividad entre 2 y 5 veces, dependiendo de

la enzima en particular), así como sobre la expresión del gen de la fenilalanina amonio liasa (*PAL*), enzima implicada en la síntesis de lignina y de metabolitos secundarios (se incrementa 5 veces) (Fig. 1) (Paredes-Páliz *et al.*, 2016b; 2017; 2018).

Tabla 1. Resistencia a sal, metales pesados y As, y propiedades PGP de cepas seleccionadas.

Cepa	Resist. sal (mM)	Resist. met. (mM)				Propiedades PGP			
		As	Cu	Pb	Zn	Phos.	Aux.	Sid.	N ₂ fix.
<i>P. agglomerans</i> RSO6	3	2	8	>10	6	++	++	+	+
<i>P. agglomerans</i> RSO7	3	4	8	>10	6	+	++	+	++
<i>B. aryabhatai</i> RSO25	> 4	2	6	8	6	+	+	-	++

Respecto a la acumulación de metales, se ha encontrado un efecto diferencial según se inocule con bacterias Gram negativas (que no afectan a la acumulación de metal en los tejidos o incluso la disminuyen) y Gram positivas (que aumentan la acumulación, particularmente en las raíces) (Fig. 2). La concentración de metales en la parte aérea en todo caso queda por debajo de los límites de toxicidad establecidos para herbívoros. Esto permite modular la acumulación en plantas según el tipo de inoculante utilizado (Paredes-Páliz *et al.*, 2017).

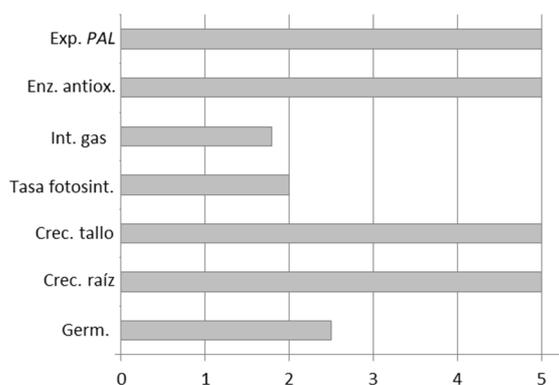


Figura 1. Incremento de la germinación, de parámetros de crecimiento, fisiológicos y bioquímicos en plantas de *S. densiflora* crecidas en sedimentos contaminados e inoculadas con PGPR.

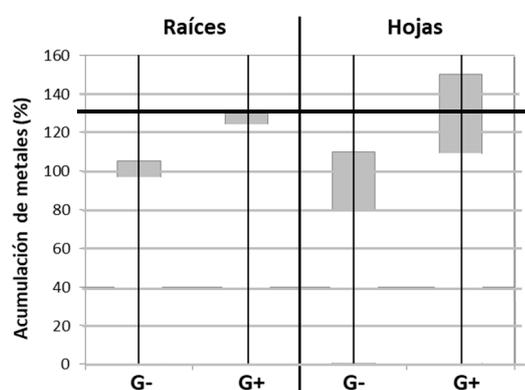


Figura 2. Acumulación de metales pesados y As en plantas de *S. densiflora* inoculadas con bacterias Gram negativas (G-) o Gram positivas (G+). Los datos se refieren al porcentaje respecto a plantas no inoculadas considerado como 100%.

Como conclusión de este trabajo, podemos decir que la utilización de inoculantes bacterianos basados en el fitomicrobioma de halófitas mejora la capacidad de adaptación de estas plantas en sedimentos contaminados y permite modular la acumulación de estos elementos tóxicos en raíces según la selección del inoculante.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por la Junta de Andalucía (Proyecto P11-RNM-7274). K.I. Paredes-Páliz ha disfrutado de una beca predoctoral del SENESCYT (Ecuador).

BIBLIOGRAFÍA

- Paredes-Páliz, K.I., *et al.* (2016a) Environ. Sci. Pollut. Res. 23:19825-19837.
 Paredes-Páliz, K.I., *et al.* (2016b) Mar. Pollut. Bull. 110:396-400.
 Paredes-Páliz, K.I., *et al.* (2017) Mar. Pollut. Bull. 125:77-85.
 Paredes-Páliz, K.I., *et al.* (2018) Plant Biol. 20:497-506.

GunA de *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 es una celulasa secretada a través del sistema de secreción de tipo 3 que afecta diferencialmente a la simbiosis con soja y coupí.

Pérez-Montaño, F.^{1*}, Jiménez-Guerrero, I.¹, Zdyb, A.², Beutler, M.², Gesa, W.², Göttfert, M.², Ollero, F.J.¹, Vinardell, J.M.¹, López-Baena, F.J.¹.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). ²Technische Universität Dresden. Institute of Genetics. Helmholtzstrasse 10. 01062. Dresden (Alemania). *fperezm@us.es

INTRODUCCIÓN

El éxito simbiótico entre *Sinorhizobium fredii* HH103 y sus leguminosas hospedadoras depende en gran medida del sistema de secreción de proteínas de tipo 3 (del inglés, *Type 3 Secretion System*, T3SS). Este sistema transloca proteínas, denominadas efectores, directamente al interior de las células vegetales para suprimir la respuesta defensiva de la planta, subvertir las rutas de señalización celular y así promover la infección. La proteína GunA, uno de los potenciales efectores del T3SS de HH103, es similar a la proteína GunA2 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, una celulasa secretada por el T3SS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la construcción de las diferentes estirpes se llevaron a cabo diversas técnicas microbiológicas y moleculares. Los ensayos de expresión génica en planta se realizaron mediante PCR cuantitativa, mientras que la purificación y análisis de proteínas secretadas se llevaron a cabo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida y posterior *western blot*. Los experimentos de translocación se realizaron mediante ensayos de actividad adelinato ciclasa. Para comprobar la expresión en nódulos, se llevó a cabo la tinción de secciones de estos órganos. Los ensayos de actividad celulasa se realizaron en placas de Petri que contenían carboximetil celulosa (CMC), revelándose con rojo congo. Los ensayos de nodulación se llevaron a cabo con las diferentes estirpes en plantas de *Glycine max* (L.) Merrill cv. Williams 82 (soja) y *Vigna unguiculata* cv. Bisbee Red (coupí).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la proteína GunA de *S. fredii* HH103 muestra actividad de tipo celulasa (Figura 1), secretándose a través del T3SS en respuesta al flavonoide inductor genisteína.

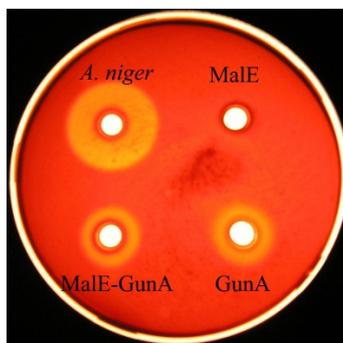


Figura 1. Actividad celulasa en agar CMC Congo. *A. niger*: C+. MalE: C-. MalE-GunA: proteína a ensayar fusionada a MalE. GunA: proteína a ensayar purificada.

A pesar de que GunA se detectó en nódulos desarrollados (18 días post-inoculación), los experimentos de translocación al interior de las células huésped indicaron que esta proteína no se translocaba directamente al interior celular en estas condiciones. Cabe resaltar que, en las etapas simbióticas iniciales, GunA es parcialmente responsable de la expresión del gen *GmPR1* de la soja, un gen utilizado como marcador para las respuestas de defensa de las plantas. Finalmente, se estudió el fenotipo simbiótico de una estirpe mutante en el gen *gunA* en ensayos de nodulación con soja y coupí. Los resultados obtenidos indicaron que GunA es beneficiosa para la simbiosis con la soja, pero perjudicial en la interacción con coupí (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Respuesta de *Glycine max* cv. Williams 82 a la inoculación de estirpes derivadas de *Sinorhizobium fredii* HH103.

Inoculante	Nº de nódulos	Peso fresco de nódulos (g)	Peso seco de la parte aérea (g)
Sin inocular	0 ± 0	0 ± 0	0.16 ± 0.07*
HH103Rif ^R	72.5 ± 27.2	0.92 ± 0.24	1.28 ± 0.27
HH103 Δ <i>gunA</i>	47.4 ± 9.8*	0.73 ± 0.21	1.04 ± 0.4
HH103 Δ <i>gunA</i> (pMUS1340)	79.2 ± 22.9	0.89 ± 0.3	1.15 ± 0.4

*Diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 2. Respuesta de *Vigna unguiculata* cv. Bisbee Red a la inoculación de estirpes derivadas de *Sinorhizobium fredii* HH103.

Inoculante	Nº de nódulos	Peso fresco de nódulos (g)	Peso seco de la parte aérea (g)
None	0 ± 0	0 ± 0	0.07 ± 0.05*
HH103Rif ^R	30.8 ± 6.9	0.55 ± 0.14	0.74 ± 0.18
HH103 Δ <i>gunA</i>	39.9 ± 4.4	0.99 ± 0.26*	1.54 ± 0.65*
HH103 Δ <i>gunA</i> (pMUS1340)	34.8 ± 8.4	0.73 ± 0.23	0.98 ± 0.32

*Diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la actividad celulasa de GunA, secretada a través del T3SS, tiene un importante papel simbiótico desde las primeras etapas hasta las más posteriores. De hecho, esta función afecta al éxito simbiótico de *S. fredii* HH103 con sus leguminosas hospedadoras. Sin embargo, se requiere una investigación más profunda para determinar las moléculas específicas sobre las que actúa GunA y los momentos exactos durante el proceso de infección en los que la actividad de esta celulasa es relevante para la simbiosis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a la Junta de Andalucía (proyecto P11-CVI-7050) y al Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto BIO2016-78409-R).

BIBLIOGRAFÍA

- Jiménez-Guerrero, I., *et al.* (2015) PloS ONE 10:e0142866.
 Jiménez-Guerrero, I., *et al.* (2015) Mol. Plant Microbe Interact. 28:790-799.
 Jiménez-Guerrero, I., *et al.* (2017) Appl. Environ. Microbiol. 83:e02770-16.
 López-Baena, F.J., *et al.* (2008) Microbiology 154:1825-1836.
 López-Baena, F.J., *et al.* (2009) Mol. Plant Microbe Interact. 22:1445-1454.
 Pérez-Montaño, F., *et al.* (2016) Sci. Rep. 6:31592.

Fenotipo simbiótico de *Sinorhizobium fredii* HH103, NGR234 y mutantes afectados en el sistema de secreción tipo III (T3SS) con *Glycine soja*.

Rodríguez-Navarro, D.N.^{1*}, López-Baena, F.J.², Temprano-Vera, F.J.¹ Ruiz-Sainz, J.E.², Acosta-Jurado, S.², Vinardell, J.M.²

¹IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil. Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, España.

²Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, España. *dulcenombre.rodriguez@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

Sinorhizobium fredii NGR234 es el rizobio con el mayor rango de hospedador descrito hasta ahora, y modelo para abordar las bases moleculares de la promiscuidad simbiótica (Perret *et al.*, 2000). Sin embargo, a diferencia de *S. fredii* HH103, NGR234 no es capaz de nodular con las variedades de soja *Glycine max* [L.] Merr. y *G. soja* Sieb. & Zucc. descritas por Pueppke and Broughton (1999). Recientemente se ha descrito que NGR234 es capaz de establecer simbiosis efectivas con diferentes ecotipos de *G. soja*, ancestro de la soja cultivada *G. max* (Temprano-Vera *et al.*, 2018).

La secreción de proteínas denominadas Nop (*nodulation outer proteins*) a través del sistema de secreción tipo III (T3SS), modula la compatibilidad simbiótica de las estirpes de *S. fredii* con diferentes cultivares de soja y otras leguminosas (revisado por López-Baena *et al.*, 2016). En *Rhizobium* los genes que codifican para los componentes estructurales del T3SS y las proteínas efectoras están regulados por el regulador transcripcional TtsI. En este trabajo hemos evaluado si la mutación en genes del T3SS contribuye al establecimiento de simbiosis efectivas con ecotipos de soja silvestre. Para ello, se han comparado las propiedades simbióticas de las estirpes parentales HH103 y NGR234 y los mutantes SVQ288 (*rhcJ*) y SVQ533 (*ttsI*) de HH103 y NGR234 (*rhcN*) y NGR234 (*ttsI*) de NGR234, en tres ecotipos de *G. soja*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos de nodulación se realizaron en invernadero, bajo condiciones controladas de temperatura, durante 6 semanas. La esterilización de las semillas se realizó mediante escarificación en ácido sulfúrico (20 min), 3 lavados con agua destilada estéril, desinfección con hipoclorito de sodio (5%, 5 min) y 6 lavados con agua destilada estéril. Los procesos de cultivo de las bacterias y de germinación de las semillas, siembra e inoculación se realizaron como se describe en Acosta-Jurado *et al.* (2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estirpes silvestres y los mutantes en T3SS se inocularon en tres ecotipos de *G. soja* originarios de China, que muestran un fenotipo simbiótico diferencial con la estirpe *S. fredii* HH103. Como puede observarse en la Tabla 1, dónde sólo exponemos los resultados en dos ecotipos “extremos”, CH2 y CH4, en los cuales HH103 es Nod⁺ y Fix⁺ respectivamente los mutantes en T3SS de HH103 ganan nodulación en el ecotipo CH2 no existiendo diferencias en su capacidad de formar nódulos, si bien las plantas inoculadas con el mutante SVQ533 sí acumulan significativamente más biomasa que aquellas inoculadas con SVQ288. La estirpe silvestre NGR234 nodula en el ecotipo CH2, y sus derivados *rhcN* y *ttsI* pierden la capacidad de nodular, siendo por tanto iguales al control no inoculado. Estos resultados indican que una o varias de las 5 Nops de NGR234 promueve(n) la nodulación con CH2, y, al contrario, la combinación de estas proteínas secretadas por HH103 previene la nodulación.

En simbiosis con CH₄, todas las cepas ensayadas forman nódulos con diferente grado de efectividad. Los mutantes derivados de HH103 reducen significativamente el número de nódulos/planta respecto a la estirpe parental, lo que no se traduce en una disminución de la efectividad simbiótica: biomasa de nódulos y parte aérea. En el caso de los mutantes derivados de NGR234, NGR-*rhcN* presenta un fenotipo semejante a la estirpe parental; mientras que las plantas inoculadas con NGR-*ttsI* presentan parámetros simbióticos (nodulación y acumulación de biomasa) significativamente inferiores.

Tabla 1. Fenotipos simbióticos de mutantes de *S. fredii* HH103 y NGR234 afectados en T3SS en dos ecotipos de *G. soja*.

Inóculos	NNOD/planta	PSNOD/planta (mg)	PSPA/planta (mg)
<i>Glycine soja</i> CH2			
HH103	0	0	15.7 ± 5.2 b
SVQ288	7.1 ± 1.4 a	13.0 ± 1.5 a	49.1 ± 9.6 ab
SVQ533	7.0 ± 4.1 a	16.6 ± 9.7 a	96.8 ± 58.8 a
No-inóculo	0	0	18.2 ± 9 b
<i>Glycine soja</i> CH4			
HH103	26.1 ± 8.1 a	59.4 ± 23.8 a	858.0 ± 316.2 a
SVQ288	12.6 ± 8.4 b	52.9 ± 35.4 a	762.8 ± 398.6 a
SVQ533	14.9 ± 1.6 b	60.8 ± 7.0 a	774.5 ± 132.7 a
No-inóculo	0	0	23.0 ± 5.8 b
NGR234	6.6 ± 1.9 a	19.0 ± 5.2 a	269.8 ± 70.7 a
NGR- <i>rhcN</i>	4.5 ± 3.6 ab	13.6 ± 8.5 a	262.9 ± 116 a
NGR- <i>ttsI</i>	2.7 ± 2.3 bc	3.8 ± 4.8 b	61.7 ± 33.1 b
No-inóculo	0 c	0 b	23.0 ± 5.8 b

NNOD, número de nódulos. PSNOD, peso seco de nódulos. PSPA, peso seco de la parte aérea. Los datos son la media ± SD de tres repeticiones. El análisis estadístico (ANOVA) está realizado para cada estirpe silvestre y sus mutantes derivados en cada ecotipo, de ahí que se repita el valor del tratamiento no inoculado en cada set de datos; de modo que los valores seguidos de la misma letra, para cada set: cepa silvestre-mutantes-ecotipo, no difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con los proyectos P11-CVI7500 de la junta de Andalucía y BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a las V y VI convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016) *Mol Plant-Microbe Interact.* 29:700-712.
 López-Baena, F.J., *et al.* (2016) *Int. J. Mol. Sci.* 17:E755.
 Perret, X., *et al.* (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180-201.
 Pueppke y Broughton. (1999) *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:293-318.
 Temprano-Vera, F. *et al.* (2018) *Front. Microbiol.* 9:2843.

Nodulación de *Calicotome villosa* en suelos desérticos asistida por PGPBs.

Bessadouk, K.¹, Navarro-Torre, S.², Pajuelo, E.², Caviedes M.A.², Fterich, A.¹, Mars, M.¹, Rodríguez-Llorente, I.D.^{2*}

¹Valuation of Biodiversity and Bioresources in Dry lands (BVBZA), Faculty of Sciences of Gabès Zrig, 6072, Gabès (Túnez). ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. c/ Profesor García González, 2. 41012. Sevilla (España). *irodri@us.es

INTRODUCCIÓN

Los suelos de las regiones áridas de Túnez se caracterizan por un bajo contenido en nutrientes, lo que limita la producción vegetal. Como consecuencia, dichas áreas sufren una rápida pérdida de cobertura vegetal y biodiversidad, así como un descenso en la actividad biológica. Para limitar la pérdida genética de un gran número de especies se hace necesario promover el cultivo de plantas autóctonas, especialmente las utilizadas para la restauración del balance de nitrógeno en el suelo. *Calicotome villosa* es una leguminosa mediterránea bastante común en el norte de África y España. *Calicotome* puede ser una planta pionera que crece en suelos pobres gracias a un sistema radicular profundo y ancho, así como a su capacidad de interacción simbiótica con diferentes rizobios, lo que le permite fijar el nitrógeno atmosférico. En este trabajo se han aislado rizobios que nodulan *C. villosa* en regiones áridas de Túnez, así como bacterias no rizobios con propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) que acompañan a estos como endófitos de los mismos nódulos, y se ha estudiado el efecto de la co-inoculación con rizobios y no rizobios sobre la nodulación y el crecimiento de la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del trabajo se aislaron un total de 60 cepas bacterianas, 48 rizobios y 12 endófitos no rizobios, de nódulos de plantas silvestres de *Calicotome villosa* que crecían en cinco localizaciones de zonas áridas de Túnez (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas aisladas y especies más cercanas según secuenciación del ADNr 16S.

Región (Túnez)	Nº aislamientos	Especies más cercanas
Gabes (G/TEM)	11	<i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> y <i>Brevundimonas</i> sp.
Matmata (M)	13	<i>Ensifer meliloti</i> y <i>Sphingomonas</i> sp.
Zarate (Z)	12	<i>Neorhizobium alkalisoli</i> , <i>Rhizobium sullae</i> , <i>Rhizobium pakistanensis</i> y <i>Bacillus</i> sp.
Medenine (E)	12	<i>P. ifriqiyense</i> , <i>R. sullae</i> , <i>R. pakistanensis</i> y <i>Sphingomonas</i> sp.
Tataouine (T)	12	<i>P. ifriqiyense</i> , <i>R. sullae</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> e <i>Inquilinus</i> sp.

La presencia de propiedades PGP (solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético y sideróforos, fijación de nitrógeno y producción de ACC deaminasa) se llevó a cabo *in vitro* siguiendo los métodos descritos en Navarro-Torre *et al.* (2016).

Se inocularon semillas de *C. villosa* con una selección de rizobios de las diferentes zonas y con los mismos rizobios en co-inoculación con *Variovorax paradoxus* CT715, aislamiento seleccionado por la presencia de propiedades PGP y en especial un elevado nivel de producción de ACC deaminasa.

Pasados 5 meses se midieron el peso fresco de la parte aérea de las plantas, el peso seco de las raíces, la altura, el número de nódulos, y el contenido en clorofila a y b.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 50% de las cepas aisladas fijó N atmosférico y el 42% fue capaz de solubilizar fosfatos. Por su parte, sólo el 6% de los aislamientos produjo IAA y un 8% ACC deaminasa. Las tres mejores cepas, con 3 de las 4 propiedades PGP, fueron *Variovorax paradoxus* CT715 y CT75 y *Neorhizobium alkalisoli* CZ47. Se seleccionó la primera para posteriores experimentos.

Las semillas de *C. villosa* se inocularon con las cepas *Phylobacterium ifriquiense* CTEM17, CT717 y CT716; *Neorhizobium alkalisoli* CZ47 y CZ710; *Rhizobium sultae* CT310 y CZ27; *Ensifer meliloti* CM61 y ACTM 81 y *Rhizobium pakistanensis* CE36; así como con esas mismas cepas acompañadas del endófito *Variovorax paradoxus* CT715.

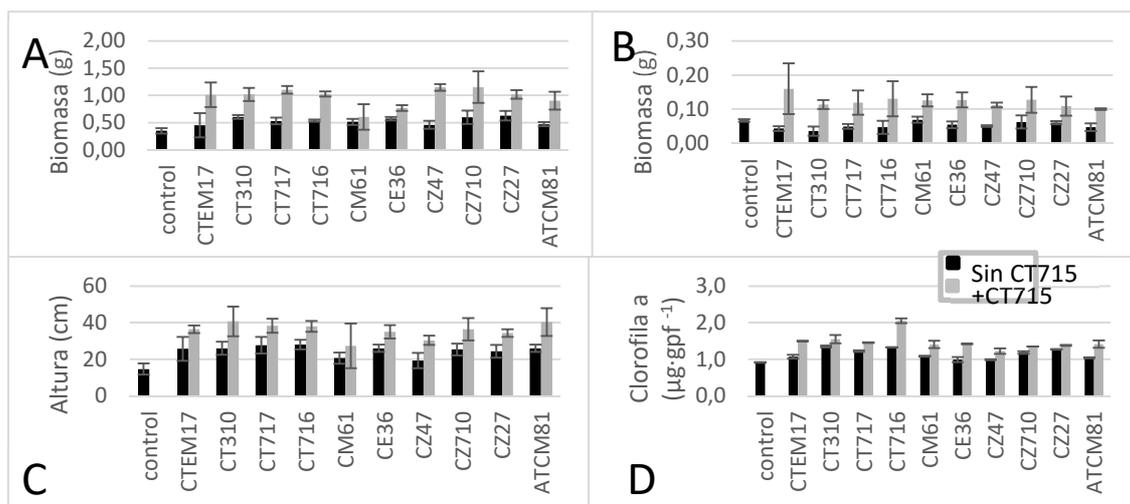


Figura 1. Peso fresco de la parte aérea (A), peso seco de raíces (B), altura (C) y contenido en clorofila a (D) de plantas inoculadas con los diferentes rizobios y co-inoculadas con los mismos rizobios y *Variovorax paradoxus* CT715. Control: plantas sin inocular.

Como se puede apreciar en la Figura 1, en líneas generales se produjo un incremento en todos los parámetros analizados de las plantas (peso fresco de parte aérea, peso seco de raíz, altura y contenido en clorofila a) cuando éstas se co-inocularon con los rizobios y la bacteria productora de ACC deaminasa.

La co-inoculación también supuso un claro beneficio para la nodulación en la mayoría de los casos, ya que el número de nódulos observado en plantas co-inoculadas fue entre 2 y 3 veces el número generado en plantas inoculadas con los rizobios solos.

Los resultados mostraron el claro beneficio que supone en la mayoría de los casos para el crecimiento y la nodulación de *C. villosa* la co-inoculación de las plantas con los rizobios y *V. paradoxus*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto INIA RTA 2012-0006-C03-03.

BIBLIOGRAFÍA

Navarro-Torre, S., *et al.* (2016) Mar. Pollut. Bull. 110:133-142.

El gen *nodD2* de *Sinorhizobium fredii* HH103 reprime la transcripción de los genes de nodulación y está involucrado en la especificidad de nodulación.

Ruiz-Sainz, J.E.^{1*}, Acosta-Jurado, S.¹, Rodríguez-Navarro, D.N.², Rodríguez-Carvajal, M.A.³, Pérez-Montaño, F.¹, Alías-Villegas, C.¹, Navarro-Gómez, P.¹, López-Baena, F.J.¹, Vinardell, J.M.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, España. ²IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil. Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, España. ³Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 1. 41012 Sevilla, España. *rsainz@us.es

INTRODUCCIÓN

La estirpe *Sinorhizobium fredii* HH103 es un rizobio de crecimiento rápido que nodula una gran variedad de leguminosas, herbáceas y leñosas, formadoras de nódulos esféricos (“determinados”) o cilíndricos (“indeterminados”). La secuenciación del genoma de HH103 ha establecido que esta bacteria posee dos copias del gen *nodD*: *nodD1* y *nodD2* (Vinardell *et al.*, 2015). Las identidades entre las secuencias de ADN de ambos genes y de sus proteínas deducidas son 75% y 71%, respectivamente.

En presencia de isoflavonas (como la genisteína), el gen *nodD1* es responsable de: i) la activación de la transcripción de los genes de nodulación (*nod*, *nol* y *noe*) que actúan en la biosíntesis del factor de nodulación (o LCO); ii) de la producción de proteínas del aparato de secreción de tipo tres (T3SS) y de las proteínas secretadas (Nop); iii) de la activación transcripcional de numerosos genes que, de una u otra manera, deberían jugar algún papel en el proceso simbiótico. La mutación en el gen *nodD1* incapacita a la bacteria para nodular en la soja y otras leguminosas como *Lotus burtii*.

El gen *nodD2* está mucho menos estudiado en *S. fredii*. En este trabajo, se estudian algunos aspectos del posible papel simbiótico del gen *nodD2* de *S. fredii* HH103 y se demuestra que un mutante en *nodD2* de *S. fredii* HH103 (SVQ515) ha ganado la capacidad de nodular con *Lotus japonicus* ecotipo Gifu y con *L. krilovii*, mientras que la estirpe parental HH103-Rif^R sólo forma nódulos y pseudonódulos que no fijan nitrógeno. Se demuestra también que los cultivos de SVQ515 produce más factores de nodulación (LCOs) que su estirpe parental HH103-Rif^R. Además, los resultados de los experimentos de expresión génica mediante RNAseq y/o PCR cuantitativa (*qPCR*) confirman que el gen *nodD2* actúa reprimiendo la transcripción de los genes de nodulación, lo que concuerda con que los cultivos de dicho mutante produzcan más factores de nodulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El mutante SVQ515 fue construido insertando el interposon Omega en el gen *nodD2* de *S. fredii* HH103-Rif^R (López-Baena *et al.*, 2008). Los ensayos de nodulación con *L. burtii* y *L. japonicus*, de determinación de factores de nodulación (LCOs) mediante HPLC y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) y de expresión génica (RNAseq o *qPCR*) se realizaron como se describe en Acosta-Jurado *et al.* (2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Plantas de *L. burtii* y *L. japonicus* fueron inoculadas con *S. fredii* HH103-Rif^R y su mutante SVQ515. Como se puede observar en la Tabla 1, la mutación en *nodD2* incrementa la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103-Rif^R en ambas especies de *Lotus*. A su vez, el mutante SVQ515 complementado con una copia funcional de *nodD2* (llamado SVQ515c) pierde la mejora simbiótica observada.

Tabla 1. Respuesta de *Lotus burttii* y *L. japonicus* a la inoculación con *S. fredii* HH103-Rif^R, SVQ515 y SVQ515c.

Tratamiento (inoculación)	Numero de nódulos (rosa/blancos)		Peso seco de la parte aérea (mg)	
	<i>L. japonicus</i>	<i>L. burttii</i>	<i>L. japonicus</i>	<i>L. burttii</i>
<i>S.f.</i> HH103-Rif ^R	0 ± 0 / 41 ± 3	6 ± 1 / 4 ± 1	4,8 ± 0,6	14,8 ± 1,4
SVQ515	6 ± 1 / 62 ± 10	15 ± 2* / 7 ± 1	18,4 ± 3,7*	26,3 ± 2,5*
SVQ515c	0 ± 0 / 44 ± 6	7 ± 1 / 5 ± 1	5,4 ± 1	13,3 ± 1
No inóculo	No hay nódulos	No hay nódulos	8,7±0,4	2,3±0,3

Los números son medias (± errores standard de la media SEM) por planta. Para cada combinación *Lotus*/tratamiento se analizaron 9-12 plantas a las 9 semanas de su inoculación.

*Dentro de cada columna, los valores acompañados por este signo son significativamente mayores que los correspondientes a los otros tratamientos, según los análisis ANOVA a una cola ($\alpha=5\%$)

Los análisis por HPLC-HRMS de dos series de cultivos independientes de *S. fredii* HH103-Rif^R, SVQ515 y SVQ515c crecidos en presencia de genisteína mostraron que las tres estirpes producían los mismos 32 LCOs. Se estimó que 17 LCOs producidos por el mutante SVQ515 estaban en mayor cantidad (al menos por un factor 6x) que los correspondientes detectados en los cultivos de HH103-Rif^R. Los cultivos de SVQ515c no mostraban este aumento drástico en la producción de los LCOs, lo que viene a indicar que el incremento de los factores producidos es debido a la mutación en *nodD2*.

Se comprobó que, en presencia de exudados radicales de *L. japonicus* GIFU, la transcripción de los genes involucrados en la producción de LCOs estaba sobre-expresada en los cultivos de SVQ515 respecto a los de HH103-Rif^R, lo que indica que NodD2 actúa como un represor. Todos estos resultados apuntan a la existencia de una *correlación* entre el incremento en la producción de ciertos LCOs producidos por SVQ515 y la mejora de sus capacidades simbióticas con *L. japonicus* y *L. burttii*. De momento no es posible demostrar la existencia de una relación de *causalidad* entre ambos fenómenos porque hay otros genes no involucrados en la producción de LCOs cuya transcripción también está alterada en el mutante SVQ515.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con los proyectos P11-CVI7500 de la Junta de Andalucía y BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a las V y VI convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016) *Mol Plant Microbe Interact*, 29:700-712.
 López-Baena, F.J., *et al.* (2008) *Microbiology* 154:1825-1836.
 Vinardell, J.M., *et al.* (2015) *Mol Plant Microbe Interact*, 28:811-824.

Comportamiento simbiótico de ecotipos de *Glycine soja* procedentes de diversas regiones de China, Japón, Corea y Rusia con *Sinorhizobium fredii* y *Bradyrhizobium* sp.

Temprano-Vera, F.^{1*}, Rodríguez-Navarro, D.N.¹, Acosta-Jurado, S.², Ruiz-Sainz, J.E.², Vinardell, J.M.²

¹IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, España;

²Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla. *francisco.temprano@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

La soja cultivada, *Glycine max* (L.) Merrill, procede de la domesticación desde hace más de 3.000 años de la especie salvaje *G. soja* Sieb. & Zucc. (Hymowitz, 1970) que todavía crece espontáneamente en algunas regiones de China, Japón, Corea y Rusia oriental. En los suelos de estos países, normalmente están presentes los rizobios que nodulan y establecen simbiosis con *G. soja*. Varias especies de rizobios, pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*, son capaces de nodular y fijar nitrógeno, en mayor o menor grado con la soja salvaje. Se conoce de una forma muy general la presencia de las principales especies de rizobios en los suelos de algunas regiones de China: en las provincias del norte predominaría *Bradyrhizobium* sp., sobre todo *B. japonicum*, en el Centro-Este *Sinorhizobium fredii* y en el Sureste los suelos estarían colonizados fundamentalmente por *B. japonicum* (Tian *et al.*, 2012). En este trabajo se ha estudiado la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de 40 ecotipos de *G. soja* de diverso origen, con dos estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (*B. diazoefficiens* USDA110 y *B. elkanii* USDA76) y la estirpe HH103 de *S. fredii*. Asimismo, se ha evaluado la competencia para nodular entre esas estirpes con tres ecotipos de *G. soja* con distinta capacidad simbiótica con *S. fredii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 40 ecotipos (*accessions*) de *G. soja* recogidos en China (25 ecotipos), Japón (5 ecotipos), Corea del Sur (5 ecotipos) y Rusia oriental (5 ecotipos), procedentes de los bancos de germoplasma del National Crop Genebank of China y del United States Department of Agriculture. Los ecotipos pertenecen a grupos de maduración diferentes (I hasta V) y los de China proceden de provincias del norte (Heilongjiang, Jilin y Liaoning) o del centro (Shandong, Shanxi y Shaanxi). Las estirpes utilizadas fueron USDA110 de *B. diazoefficiens*, USDA76 de *B. elkanii* y HH103-Rif^r de *S. fredii*. Los ensayos se desarrollaron bajo condiciones bacteriológicamente controladas en invernadero (18 °C – 30 °C, 14 h de luz) durante 60 días, según se ha descrito anteriormente (Vincent, 1970; Acosta-Jurado *et al.*, 2016). Para medir la capacidad simbiótica de las estirpes se evaluaron el número y peso seco de los nódulos de las plantas y el peso seco de la parte aérea, y se calculó el índice de eficiencia relativa (IER) de los tratamientos inoculados en relación a los controles no inoculados (Brockwell *et al.*, 1966).

En los estudios de competitividad se utilizaron 3 ecotipos de *G. soja*, CH2, CH3 y CH4, con propiedades simbióticas diferentes frente a HH103-Rif^r y las 3 estirpes anteriores inoculadas en combinaciones binarias. Para la identificación de la procedencia de los nódulos se utilizó la diferente resistencia a los antibióticos tetraciclina y estreptomina de las estirpes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto *B. diazoefficiens* USDA110 como *B. elkanii* USDA76 nodularon en los 40 ecotipos de soja salvaje ensayados. Ambas estirpes dieron lugar a simbiosis efectivas, aunque muy variables según los ecotipos, con IER oscilando entre 7% y 98%. USDA110, en promedio resultó ser más efectiva (IER = 48,8%) que USDA76 (IER = 28,9%). *S. fredii* HH103-Rif^r noduló con todos los ecotipos, excepto dos, procedentes de la provincia de Jilin (Norte de China), si bien en general produjo menos nódulos y masa nodular que las dos estirpes de *Bradyrhizobium*. Si exceptuamos 8 ecotipos originarios de las provincias de China Central, Shanxi y Shaaxi, la efectividad de *S. fredii* fue muy baja (IER = 0-9%) no difiriendo significativamente, en general, el peso de las plantas inoculadas de las de los controles no inoculados. Los 8 ecotipos que mostraron ser efectivos en simbiosis con HH103-Rif^r (IER = 30-67%), proceden del centro de China de un total de 12 ecotipos originarios de esta región. Estos resultados estarían en concordancia con el hecho de que *S. fredii* predomina en las poblaciones de los suelos de las provincias de China central (Tian *et al.*, 2012).

Los ecotipos CH3 y CH4 nodulan tanto con *B. diazoefficiens* USDA110 y *B. elkanii* USDA76 como con *S. fredii* HH103-Rif^r, y en los estudios de competitividad entre estas estirpes y esos dos ecotipos, *Bradyrhizobium* dominó en la formación de nódulos frente a *S. fredii*, dando lugar a una ocupación superior al 75%. CH2 no es capaz de nodular con HH103-Rif^r y lógicamente sólo se estudió la competitividad entre las 2 estirpes de *Bradyrhizobium*. Con los ecotipos CH2 y CH3 USDA110 es más competitiva que USDA76, siendo destacable la alta proporción de nódulos mixtos, de hasta el 30% conteniendo ambas estirpes. Contrariamente en el ecotipo CH4, USDA76 fue más competitiva que USDA110: 70% de nódulos frente a 30%.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con los proyectos P11-CVI7500 de la Junta de Andalucía y BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016) Mol. Plant Microbe Interact. 29:700-712.
Brockwell, J., *et al.* (1966) Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husband. 6:365-370.
Hymowitz, T., (1970) Econ. Bot. 24:408-421.
Tian, C.F., *et al.* (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:8629-8634.
Vincent J.M. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Sci. Pub.

El gen *syrM* de *Sinorhizobium fredii* HH103 es un regulador global que actúa tanto en presencia como en ausencia de flavonoides inductores y cuya mutación permite la nodulación efectiva de *Lotus japonicus*.

Vinardell, J.M.^{1*}, Acosta-Jurado, S.¹, Navarro-Gómez, P.¹, Alías-Villegas, C.¹, Almozara, A.¹, Medina, C.¹, Rodríguez-Carvajal, M.A.², López-Baena, F.J.¹, Ruiz-Sainz, J.E.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla(España). ²Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla. Calle Profesor García González, 1. 41012 Sevilla (España). *jvinar@us.es

INTRODUCCIÓN

Sinorhizobium fredii HH103 es un rizobio que establece simbiosis efectivas con gran número de leguminosas, incluyendo formadoras de nódulos indeterminados y determinados. Entre las últimas destacan *Glycine max* (soja) y *Lotus burttii*, pero no se incluye la leguminosa modelo *Lotus japonicus*. Disponemos tanto de la secuencia genómica como de estudios transcriptómicos de HH103 realizados en ausencia y presencia de genisteína, un flavonoide inductor para esta estirpe (Vinardell *et al.*, 2015; Pérez-Montaña *et al.* 2016). En dichos estudios se observó que en HH103 existe un grupo de 100 genes cuya expresión se altera significativamente (sube o baja más de 3 veces) en presencia de genisteína, 35 de ellos controlados por cajas *nod*. Entre los últimos se encuentra el gen codificante de SyrM, un regulador transcripcional de la familia LysR. En este trabajo presentamos el efecto de la inactivación de *syrM* en la expresión génica global, la producción de diferentes señales simbióticas, y en la interacción simbiótica de HH103 con diversas leguminosas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han construido dos mutantes independientes de HH103 en *syrM* (por delección en fase y por inserción del casete *lacZΔp-Gm^R*) siguiendo metodologías habituales en nuestro laboratorio (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a). La producción de exopolisacáridos (EPS) y de factores Nod (NF) se analizó usando los métodos descritos por Acosta-Jurado *et al.* (2016a, b). Los estudios de expresión génica mediante RNAseq y/o qPCR se han realizado según Acosta-Jurado *et al.* (2016a). Los ensayos de nodulación con *G. max*, *L. burttii* y *L. japonicus* Gifu se han llevado a cabo en cámaras de plantas siguiendo la metodología descrita por Acosta-Jurado *et al.* (2016a; b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El gen *syrM* de HH103 se localiza en su plásmido simbiótico, está bajo el control transcripcional de la caja *nod* 19 (NB19) y su expresión aumenta unas 6 veces tras 36 h de inducción con genisteína. Los estudios de RNAseq llevados a cabo con HH103 y con el mutante Δ *syrM* crecidos en ausencia y en presencia de genisteína, indicaron que la ausencia de SyrM afecta a la expresión de un gran número de genes, hecho que está en consonancia con su pertenencia a la familia LysR de reguladores transcripcionales. En ausencia de genisteína se detectaron 69 DEG (*Differentially Expressed Genes*, genes cuya expresión en valor absoluto varía en más de 3 veces con respecto al control), de los cuales 24 se indujeron y 45 se reprimieron. De los 69 genes, 24 codifican proteínas hipotéticas y 4 reguladores transcripcionales, todos ellos inducidos. Entre los genes reprimidos en ausencia de SyrM y de flavonoides destacan distintas copias de chaperonas *groEL* y de genes codificantes de serina proteasas. Tras 36 h de crecimiento en presencia de genisteína, el número de DEG se incrementó a 279, de los que sólo 35 correspondieron a

genes también detectados como DEG en ausencia de flavonoides, y entre ellos no se encontraron copias de *groEL* ni de genes codificantes de Ser proteasas. De los 279 genes, 95 se indujeron y 184 se reprimieron. Entre los genes inducidos se encuentran aquellos responsables de la síntesis de NF, una señal molecular clave para el inicio de la interacción simbiótica.

El estudio de la producción de NF por HPLC-HRMS en HH103 y su derivado Δ *syrM* ha revelado que: 1. el mutante produce mayor cantidad de NF en presencia de genisteína; 2. el mutante, a diferencia de la estirpe silvestre, produce NF sin flavonoides.

En HH103 la producción de EPS se reprime por NodD1 cuando este regulador se activa con genisteína (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c), aunque se desconoce el mecanismo exacto. Dado que *syrM* se activa por genisteína y NodD1 y codifica un regulador transcripcional, hemos investigado su posible papel en ese proceso.

Como se observa en la Figura 1, el mutante *syrM* conservó parte de la mucosidad en presencia de flavonoide, lo que sugiere su implicación en la regulación de la producción del EPS.

En cuanto a estudios simbióticos, los primeros ensayos muestran que la mutación en *syrM* tiene distintos efectos en función de la planta hospedadora: disminución y aumento significativo del nº de nódulos formados en soja y en *L. burttii*, respectivamente, y ganancia de la capacidad de nodular efectivamente con la leguminosa modelo *L. japonicus* Gifu.

Conclusiones: los resultados obtenidos indican que en HH103 *SyrM* interviene en la regulación de la expresión de numerosos genes tanto en vida libre como en simbiosis. La ausencia de este regulador altera la regulación de la producción de al menos dos importantes señales simbióticas (EPS y NF), afecta de modo diferencial a la interacción con plantas hospedadoras, y permite una interacción efectiva con la leguminosa modelo *L. japonicus* Gifu.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias al proyecto BIO2016-78409-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a las V y VI convocatorias del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016a) Mol. Plant Microbe Interact. 29:700-712.
 Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016b) Mol. Plant Microbe Interact. 29:925-937.
 Acosta-Jurado, S., *et al.* (2016c) PLOS ONE 11:e0160499.
 Pérez-Montaña, F., *et al.* (2016) Sci. Rep. 6:31592.
 Vinardell, J.M., *et al.* (2015) Mol. Plant Microbe Interact. 28:811-824.

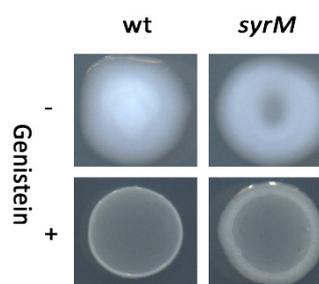


Figura 1. Mucosidad de HH103 y su mutante Δ *syrM* en placas de medio YMA en ausencia (-) y presencia (+) de genisteína.

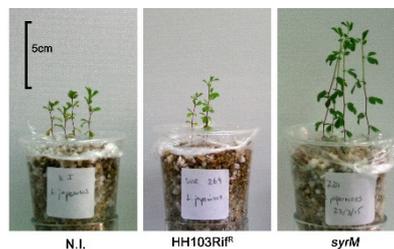


Figura 2. Aspecto de plantas de *L. japonicus* Gifu no inoculadas (N.I.) o inoculadas con HH103 o con su mutante Δ *syrM*.

Mutantes en genes reguladores de *Sinorhizobium fredii* HH103 que inducen nódulos fijadores de nitrógeno en judía.

Buzón, P.^{*}, del Cerro, P., Ayala-García, P., Almozara, A., Navarro-Gómez, P., Alías-Villegas, C., Acosta-Jurado, S., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Ollero, F.J.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla (España). *pbuzon@us.es

INTRODUCCIÓN

Los factores de nodulación o factores Nod (NF), producidos por un grupo de bacterias conocidas como rizobios, son moléculas de naturaleza lipoquitoligosacáridica involucradas en el establecimiento de la simbiosis con plantas leguminosas. Estos compuestos, sintetizados y excretados por el microorganismo en respuesta a flavonoides, interaccionan con receptores específicos de las células epiteliales e inducen, en el córtex radical, la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico. *Rhizobium tropici* CIAT 899 es capaz de establecer una relación simbiótica con leguminosas como judía (*Phaseolus vulgaris*) o *Lotus japonicus* Gifu, pero no con soja (*Glycine max*). Por otra parte, *Sinorhizobium fredii* HH103 establece relaciones simbióticas con soja, entre otras leguminosas, pero es incapaz de nodular en judía. CIAT 899 presenta en su genoma cinco copias del gen regulador *nodD* y HH103 solo dos copias. En el caso de CIAT 899, los mutantes en los genes *nodD1* o *nodD2* siguen nodulando, al menos, en algunas de las leguminosas hospedadoras utilizadas y solo el doble mutante *nodD1nodD2* deja de nodular (del Cerro *et al.*, 2015 a y b; del Cerro *et al.*, 2017). En el caso de HH103, es suficiente con mutar el gen *nodD1* para impedir la nodulación (Vinardell *et al.*, 2004). En este estudio se ha analizado el efecto de los genes *nodD* de HH103 en el fondo genético de *R. tropici* CIAT 899 y se ha estudiado el fenotipo simbiótico de algunos mutantes de HH103 en genes reguladores en judía y *Lotus japonicus* Gifu.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los plásmidos pMUS296 y pMUS746, que portan los genes *nodD1* y *nodD2* de HH103 clonados en el vector pMP92 se transfirieron al doble mutante de CIAT 899 afectado en los genes *nodD1* y *nodD2* (cepa denominada CIATD1D2) mediante conjugación. Para evaluar los fenotipos simbióticos, las diferentes cepas silvestres y mutantes se cultivaron en medio TY hasta alcanzar una concentración de 10⁹ células/ml. Las semillas de las leguminosas estudiadas, previamente desinfectadas superficialmente y pregerminadas, se sembraron en jarros de Leonard que contenían solución nutritiva carente de nitrógeno y se inocularon con alrededor de 1 ml de los cultivos bacterianos. Las plantas se crecieron en cámara iluminada con una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo luz/oscuridad de 16 h 25 °C/ 8 h 18 °C. Las plantas se cosecharon tras 30 días en el caso de la judía y 50 días en el caso de *L. japonicus* Gifu.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la cepa CIATD1D2, incapaz de nodular, se le transfirió por conjugación el gen *nodD1* y el gen *nodD2* de la cepa HH103. Tan solo el gen *nodD1* de HH103 complementó parcialmente el fenotipo de CIATD1D2 para nodular en judía y en *L. japonicus* Gifu. Además, esta cepa fue capaz de inducir pseudonódulos en soja, fenotipo que no presenta la estirpe parental CIAT 899, si bien de estas estructuras no se pudieron aislar bacterias. Por otra parte, en ensayos de competitividad en judía, mientras que la cepa CIAT 899 ocupó el 81,5% de los nódulos, la cepa CIATD1D2 complementada con el gen *nodD1* de HH103 solo ocupó el 18,5% de los nódulos.

Del mismo modo, se estudió el fenotipo de los mutantes de *S. fredii* HH103, SVQ515, mutado en el gen *nodD2*, SVQ548, mutado en el gen *nolR*, SVQ533, mutado en el gen *ttsI* y SVQ724, mutado en el gen *syrM* para nodular en judía, donde HH103 solo induce la formación de pseudonódulos no fijadores de nitrógeno. Los resultados obtenidos han mostrado que las estirpes SVQ515, SVQ548 y SVQ724 ganaron la capacidad de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en judía. En todos los casos, el número de nódulos y el peso seco de la parte aérea, fue significativamente menor que los parámetros obtenidos por la estirpe silvestre CIAT 899. Estos resultados parecen indicar que la estirpe de *S. fredii* HH103 que es una estirpe de amplio rango de nodulación, podría tener aún un mayor rango y si no nodula más leguminosas es por la presencia de genes como *nolR*, *syrM* o *nodD2*, que impiden la nodulación en determinadas plantas, como la judía o *L. japonicus* Gifu. Por lo tanto, estos genes, pero no los implicados en el sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), controlado por el regulador *ttsI*, deben ser responsables de un control “fino” de la expresión de los genes implicados en la producción de los factores de nodulación, bien a nivel estructura, o bien a nivel de cantidad de factores producidos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado gracias a un Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad referencia AGL2016-77163-R y BIO2016-78409-R. Pablo del Cerro disfruta de una beca FPU (FPU14-00160) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte y Pilar Navarro-Gómez de una beca predoctoral del VI Plan Propio de la Universidad de Sevilla. Pablo Buzón García y Andrés Almozara disfrutaban de un contrato de empleo joven (PEJUS2) de la Junta de Andalucía.

BIBLIOGRAFÍA

- del Cerro, P., *et al.* (2015a) BMC Genomics 16:251.
- del Cerro, P., *et al.* (2015b) BMC Genomics, 16:864.
- del Cerro, P., *et al.* (2017) Sci. Rep.7:46712.
- Vinardell, J.M., *et al.* (2004) Arch. Microbiol. 81:144-154.

Use of *Rhizobium tropici* 899 metabolites in a consortium with soybean and wheat inoculants in Brazil.

Bomfim, C.A.^{1*}, Reis Junior, F.B.², Vale, H.M.M.³, Megías, M.E.², Ollero, F.J.⁴, Megías, M.⁴.

¹Microbial Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil. ²Embrapa Cerrados, BR-020, km18, Distrito Federal - Planaltina, 73310-970, Brazil. ³Department of Phytopathology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil. ⁴University of Seville, Fac. Biology. University of Seville Department of Microbiology. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012-Seville, Spain. *catharineabreu@gmail.com

INTRODUCTION

The use of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria is recommended for the main crops of agronomic interest in Brazil, allowing total or partial reduction on the use of industrial nitrogen fertilizers. Currently, inoculants are available to soybean and bean crops based on rhizobia and, more recently, on grasses, especially wheat, corn and brachiaria containing effective strains of *Azospirillum brasilense*. Effective strain inoculation, in addition to being less costly to the farmer, is associated with reducing environmental pollution and promising for an agriculture that combines sustainability and productivity. New strategies and formulations of biofertilizers are being produced with the aim of making them even more effective, less costly and with more consistent results in the field. The objective of this work was to evaluate the effect of the application of a *Rhizobium tropici* CIAT 899 metabolic extract (ME) and its fractions, in combination with the inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. diazoefficiens* in soybean and *Azospirillum brasilense* in wheat.

MATERIAL AND METHODS

R. tropici CIAT 899 was grown in specific medium with the presence of an inducer for 48 hours. The extraction of ME was performed from the culture supernatant using butanol as the extracting agent. Subsequently, the extracted fraction was purified and fractionated in MEF1 and MEF2. The experiment was carried out in greenhouse using Leonard jars, using wheat (BRS 264 and BRS 394) and soybean (Desafio 8473RR). The soybean was inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) and *B. diazoefficiens* (SEMIA 5080) and wheat was inoculated with *A. brasilense* (Abv5 and Abv6). All bacterias used in this experiment are commercially available in Brazil. Five treatments were tested: control without inoculation, inoculated control and the others with the inoculum plus the molecules (ME, MEF1 and MEF2) for both crops. Thirty days after germination, shoot dry mass (SDM) and root dry mass (RDM) were measured. Number of nodules and nodules dry mass were also evaluated in soybean plants.

RESULTS AND DISCUSSION

The bacterial consortium with the molecules extracted from *R. tropici* CIAT 899 showed expressive results when compared with the treatments carried out with only the inocula. For wheat, when inoculated and treated with ME and MEF1, cultivar BRS 264 presented SDM 40% and 35% higher than the control, and 20% and 13% superior than the treatment inoculated only with *A. brasilense*, respectively. For soybean compared to the treatment exclusively inoculated with *Bradyrhizobium* spp., RDM and SDM were, respectively, 11% and 5% higher when MEF2 was applied. No statistic differences were observed among the treatments for wheat BRS 394. In conclusion, the results indicate the biotechnological potential of rhizobia secondary metabolites and their fractions to improve the performance of commercial inoculants.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Embrapa, INCT (MCTI/CNPq/CAPES/FAPS/MPCPAgro), CNPq and MINECO AGL2016-77163-R.

REFERENCES

- Hungria, M., *et al.* (2013) *Biol. Fertil. Soils* 49:791-801.
Marks, B., *et al.* (2015) *AMB Express* 5:71.
Kidaj, D., *et al.* (2012). *Microbiol. Res.* 167:144-150.

Índice de autores

Acosta-Jurado, S.	42, 48, 50, 109, 121, 129, 134, 136, 138, 140
Albareda, M.	52, 100
Alexandre, A.	7
Alho, L.	7
Almozara, A.	109, 121, 138, 140
Alías-Villegas, C.	42, 48, 50, 109, 115, 134, 138, 140
Álvarez, C.	6, 36
Álvarez-Mena, A.	98
Alves-Martínez, P.,	6
Antequera-Gómez, M.L.	3, 90
Aprile, F.	14
Armengaud, J.	102
Arrebola, E.	63
Aunión, A.	115
Aussel, L.	20
Ayala-García, P.	37, 111, 123, 140
Baena, I.	106
Bakker, P.	61
Ballesteros, M.	52
Barcia-Piedras, J.M.	9, 85
Barón, M.	27
Becker, A.	41
Bejarano, E.R.	94
Benito, B.	81
Berlanga-Clavero, M.V.	54, 86
Bernabeu-Meana, M.	78
Bernal, P.	91
Bernal-Govaerts, A.	70
Bessadouk, K.	132
Beutler, M.	127
Beuzón, C.	20, 35, 94
Blanco-Romero, E.	55
Blasco-Santamaría, M.L.	54
Blázquez, L.	81
Bomfim, C.A.	142
Bonilla, I.	106
Bovolini, M.P.	79
Brígido, C.	7, 102
Brito, I.	7
Burdman, S.	33, 117
Buzón, P.	37, 111, 123, 140
Camacho, M.	113
Cámara-Almirón, J.	93
Caraballo-Rodríguez, A.M.	86
Caro-Astorga, J.	98
Carvalho, M.	7
Casadesús, J.	20
Caviedes, M.A.	9, 125, 132

Cazorla, F.	14, 63, 104
Celador-Lera, L.	119
Cerna-Vargas, J.P.	16, 24
Cox, L.	85
Cubo, T.	115
De Francisco-De Polanco, S.	16
De los Santos, B.	113
de Vicente, A.	3, 14, 26, 29, 30, 31, 54, 63, 76, 86, 90, 93, 98, 104, 107
de Vos, S.	44
del Cerro, P.	37,111, 115, 123, 140
Del Espino, A.	94
Del Hoyo, D.	24
Díaz-Martínez, L.	3
Díez-Méndez, A.	66, 119
Dorrestein, P.C.	86
Duran, D.	52
Eberl, L.	104
El-Azaz, J.	29
Espuny, M.R.	115
Felipe, A.	18
Fernández-Ortuño, D.	29, 30, 31
Ferreiro, M.D.	18
Fetch, S.	91
Filloux, A.	91
Flors, V.	87, 96
Fterich, A.	132
Furniss, C.	91
Galicia-Campos, E.	39
Gallegos, M.T.	18
García-Fraile, P.	57, 59, 68
García-Tomsig, N.I.	41
García-Villaraco, A.	39, 70, 72
Garrido-Sanz, D.	4
Gesa, W.	127
Gil-Serrano, A.M.	37, 111, 123
Gómez-Luengo, A.	55
Göttfert, M.	127
Grifé-Ruiz, M.	26
Guirado, M.	4
Gutiérrez-Albanchez, E.	39, 70
Gutiérrez-Barranquero, J.A.	14, 104
Gutiérrez-Mañero, F.J.	72
Haro, R.	81
Heredia-Ponce, Z.M.	104
Hermosa, R.	74, 79
Hervás, M.	6, 36
Hurtado-Rodríguez, A.	16
Igual, J.M.	7
Jaén, L.	81
Jiménez-Gómez, A.	57, 59, 68

Jiménez-Guerrero, I.	33, 37, 42, 111, 117, 121, 123, 127
Jiménez-Zurdo, J.I.	41
Krell, T.	16
Lanza, M.	81
Lavado-Benito, C.	19
Lee, S.	91
León-Barrios, M.	11
Lidoy-Logroño, J.	83
Lloret, J.	106
López-Baena, F.J.	37, 42, 48, 50, 109, 111, 117, 121, 123, 127, 129, 134, 138, 140
López-Márquez, D.	35, 94
López-Pagán, N.	20, 94
López-Robles, D.J.	61
López-Solanilla, E.	16, 24
López-Ráez, J.A.	83
Lucas, J.A.	70, 72
Macías, F.A.	83
Magno-Pérez-Bryan, M.C.	93
Malone, J.	44
Mariscal, V.	6, 36
Mars, M.	132
Martín, M.	4, 55
Martín-Rivilla, H.	72
Martínez-Fernández, J.	79
Martínez-Gil, M.	19
Mateos, P.F.	66, 68, 119
Mateos-Naranjo, E.	9, 78, 85
Materatski, P.	7
Mateu, D.	87, 96
Mateus Da Silva, G.	33
Matilla, M.A.	16
Mavridou, D.	91
Medina, C.	117, 121, 138
Medina-Cabrera, A.	11
Megías, M.E.	142
Megías, M.	37, 111, 123, 142
Menéndez, E.	7, 66
Mesa-Marín, J.	78, 85
Millán, R.	4
Millán, V.	41
Monreal, J.A.	117
Montalbán, C.	83
Molina-Heredia, F.P.	6, 36
Molina-Santiago, C.	54, 86, 93
Monte, E.	74, 79
Montero-Palmero, B.	39
Moreno-Pérez, A.	22
Navarro, J.A.	6, 36
Navarro, Y.	54, 86, 93
Navarro-Gómez, P.	42, 48, 50, 109, 134, 138, 140

Navarro-Torre, S.	9, 85, 132
Nicolás, C.	74
Ollero, F.J.	33, 37, 111, 115, 117, 123, 127, 140, 142
Ortega, J.M.	6, 36
Pacheco-Moreno, A.	44
Paço, A.	102
Pacios, L.F.	100
Pajuelo, E.	9, 78, 85, 125, 132
Palacios, J.M.	52, 100
Paredes-Páliz, K.I.	125
Parra, R.	85
Pastor, V.	87, 96
Pastor-Fernández, J.	87, 96
Pearson, J.R.	86
Peregrina, A.	41
Pérez-Bueno, M.L.	27
Pérez-García, A.	26, 29, 30, 31, 54, 76, 93
Pérez-Mendoza, D.	106
Pérez-Montaña, F.	33, 37, 48, 109, 111, 117, 123, 127, 134
Pérez-Romero, J.A.	78
Pérez-Yépez, J.	11
Petras, D.	86
Pieterse, C.M.J.	61
Pineda, M.	27
Polonio, A.	29
Poveda, J.	74
Pozo, M.J.	83, 87
Pulido-Suárez, L.	11
Purtschert, G.	104
Ramírez-Moncayo, C.	6, 36
Ramos, C.	19, 22, 24
Ramos-Solano, B.	39, 70, 72
Real, M.	85
Redondo-Gómez, S.	9, 78, 85
Redondo-Nieto, M.	4, 55
Reis Junior, F.B.	142
Rial, C.	83
Ridout, C.	44
Rivas, R.	57, 59, 66, 68, 119
Rivilla, R.	4, 55
Rodríguez-Carvajal, M.A.	48, 134, 138
Rodríguez-Herva, J.J.	16
Rodríguez-Navarro, D.N.	48, 129, 134, 136
Rodríguez-Llorente, I.D.	9, 78, 85, 125, 132
Rodríguez-Palenzuela, P.	16, 19, 22, 24
Robledo, M.	41
Romero, D.	3, 54, 76, 86, 90, 93, 98, 107
Roncel, M.	6, 36
Rueda-Blanco, J.	35
Rufián, J.S.	20, 35

Ruiz-Albert, J.	20, 35, 94
Ruiz-Jiménez, L.	30
Ruiz-Sainz, J.E.	48, 129, 134, 136, 138
Saati-Santamaría, Z.	59, 68
Sacristán-Pérez-Minayo, G.	61
Sánchez-Bel, P.	87, 96
Sánchez-Colmenero, J.	24
Sánchez-Romero, M.A.	20
Sanjuán, J.	106
Sanmartín, N.	87, 96
Santamaría-Hernando, S.	16, 24
Santero, E.	117
Sonawane, M.	33
Sopeña-Torres, S.	54, 107
Soto, M.J.	50
Steinmetz, G.	102
Spiga, L.	91
Temprano-Vera, F.	129, 136
Tienda, S.	63
Vale, H.M.M.	142
Varó, A.	70
Vela-Corcía, D.	76
Vida, C.	63
Viejobueno, J.	113
Vielba-Fernández, A.	31
Vinardell, J.M.	42, 48, 50, 109, 121, 127, 129, 134, 136, 138, 140
Zdyb, A.	127



Departamento de
Microbiología



c.viral
Biología Molecular & Celular

Tel: 954 41 07 59 | Fax: 954 41 89 08

cviral.com