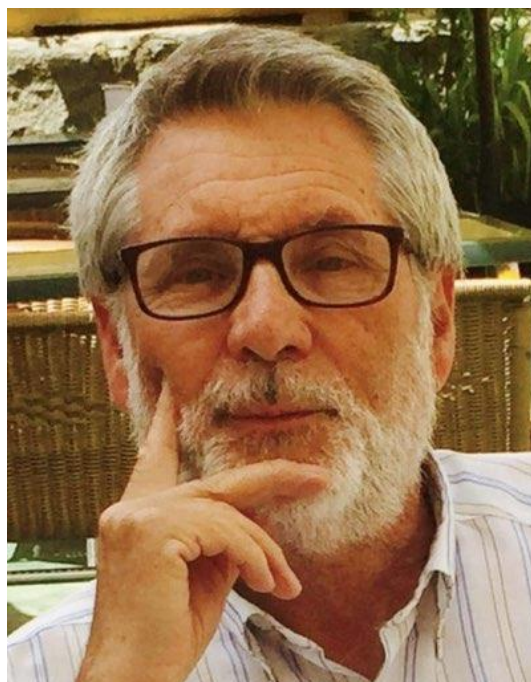


LIBRO DE RESÚMENES MIP2021
IX Reunión del grupo Microbiología
de Plantas-SEM
16 y 17 de febrero de 2021



In memoriam
Tomás Ruiz Argüeso
22/11/1943 - 21/03/2020

COMITÉ ORGANIZADOR

- Emilia López Solanilla (CBGP - Universidad Politécnica de Madrid- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria)
- Marta Martín Basanta (Dpto. Biología. Universidad Autónoma de Madrid)
- José Palacios Alberti (CBGP - Universidad Politécnica de Madrid- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria)
- Rafael Rivilla Palma (Dpto. Biología. Universidad Autónoma de Madrid)
- José J. Rodríguez Herva (CBGP - Universidad Politécnica de Madrid- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria)
- Miguel Redondo Nieto (Dpto. Biología. Universidad Autónoma de Madrid)

AGENDA

16 de febrero

9.00 Apertura de la Plataforma a los inscritos

9.15-9.30 Bienvenida

9.30-11.30 S1. MECANISMOS DE VIRULENCIA

Moderador: Cayo Ramos. Área de Genética. Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM–UMA–CSIC).

S1.1. A. Polonio Escalona. Una monooxigenasa lítica de polisacáridos haustorial de *Podosphaera xanthii* contribuye a la supresión de la inmunidad disparada por quitina. Dpto. de Microbiología, Universidad de Málaga, e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM–UMA–CSIC).

S1.2. A. Figás Segura. Influencia del material vegetal y la concentración bacteriana en la detección de *Xylella fastidiosa* mediante protocolos de PCR en tiempo real. Dpto. Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia.

S1.3. M.P. Velasco Amo. Estudio de caracteres asociados a la capacidad de colonización e infección de microorganismos que viven en el xilema mediante el uso de dispositivos de microfluídica. Dpto. de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IAS-CSIC)..

S1.4. A. Moreno Pérez. Papel de los efectores tipo III en la especificidad de huésped de los patovares de *Pseudomonas savastanoi*. Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM–UMA–CSIC)

S1.5. L. Díaz Martínez. La esporulación es un proceso prescindible para la persistencia del patógeno de humanos *B. cereus* en su ciclo de vida planta-hospedador. Instituto de agricultura tropical. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Dpto. de Microbiología, Universidad de Málaga

S1.6. C. Gálvez Roldan. Caracterización de la implicación de la pared celular vegetal y sus compuestos derivados en la virulencia de *Dickeya dadantii*. CBGP - Universidad Politécnica de Madrid (UPM)- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

S1.7. F. Velando Soriano. Mecanismos moleculares de la adaptación de quimiorreceptores en la bacteria fitopatógena *Pectobacterium atrosepticum*. Dpto. Protección Ambiental. EEZ-CSIC.

S1.8. A. Casas Román. Papel de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las interacciones planta-bacteria. *Dpto. Microbiología del suelo y sistemas simbióticos. EEZ-CSIC.*

11.30-12.00 Descanso

12.00-14.00 S2. MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO Y CONTROL BIOLÓGICO.

Moderadora: Ester Marco Noales. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA . Valencia

S2.1. Z.M. Heredia Ponce. Papel del polisacárido tipo Psl en dos modelos de *Pseudomonas* asociados a planta. *Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC) – Dpto. de Microbiología, Universidad de Málaga,*

S2.2. J. Mesa Marín. Biofertilizantes bacterianos para cultivos de fresa sostenibles. *Instituto de agricultura tropical. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga – IHSM La Mayora, CSIC.*

S2.3. N.J. Flores Duarte. Inoculación de *Medicago sativa* con bacterias rizosféricas que ayudan a la nodulación en suelos degradados. *Dpto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.*

S2.4. M. Murillo-Torres. Regulación del K1-T6SS de *Pseudomonas putida* por las proteínas Rsm. *Dpto. de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla*

S2.5. M. Illescas Morente. Efecto de la aplicación de N inorgánico y *Trichoderma harzianum* sobre el microbioma de la raíz de plantas de trigo cultivadas en campo. *Dpto. de Microbiología y Genética. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca.*

S2.6. L. Toral Navarro. Biocontrol de hongos fitopatógenos postcosecha mediado por compuestos volátiles bacterianos. *Xtrem Biotech S.L., European Business Innovation Center. Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Granada.*

S2.7. J. Iribarren Baró. Análisis del efecto de Fg-AFP y Ltd-I sobre el crecimiento y toxogénesis de hongos del género *Fusarium* con impacto en agroalimentación. *Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.*

S2.8. M.L. Domingo Calap. Búsqueda y caracterización de virus bacteriófagos frente a *Xylella fastidiosa*. *Tragsa, Empresa de Transformación Agraria, Delegación de Valencia. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).*

14.00-16.00 Comida

16.00-17.30 Presentaciones Cortas 1 y 2 (PC1-PC2)

Moderador: José J. Rodríguez Herva (CBGP - Universidad Politécnica de Madrid- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria)

PC1: MECANISMOS DE VIRULENCIA

PC1.1. A. Álvarez Mena. Estudio del papel diferencial de *tasA* y *calY* en la formación de *biofilm* en *B. cereus*.

PC1.2. C.M. Aure. Patogenicidad de aislados de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* del foco de Alicante en diferentes hospedadores.

PC1.3. M. Herrero-Cervera. Aproximaciones al cultivo de 'Candidatus Liberibacter solanacearum'

PC1.4. C. Lavado-Benito. Regulación de genes de virulencia por el sistema de dos componentes GacS/GacA en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335.

PC1.5. F. Morán. Retos para la detección de bacterias fitopatógenas mediante PCR: el caso de 'Candidatus Liberibacter' spp. asociados al HLB.

PC1.6. M. Munar-Palmer. Estudio de la vía de transducción de señales asociada a quimiotaxis en *Dickeya dadantii* 3937 y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

PC1.7. P. Sabuquillo. Detección de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* viable mediante qPCR mejorada.

PC1.8. Alejandra Vielba-Fernández. Resistencia a los fungicidas SDHI boscalida y fluopiram en *Podosphaera xanthii* proveniente de campos comerciales de cucurbitáceas en España.

PC1.9. M. Román-Écija. Caracterización de la diversidad metabólica de aislados de *Xylella fastidiosa* mediante fenotipado de alto rendimiento

PC2: MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO Y CONTROL BIOLÓGICO

PC.2.1. S. Barbé. Selección y caracterización de bacterias asociadas a plantas con actividad antagonista frente a *Erwinia amylovora*.

PC2.2. M.V. Berlanga-Clavero. Componentes de la matriz extracelular y metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* implicados en la interacción beneficiosa con la planta.

PC2.3. E. Blanco-Romero. *In silico* characterization and phylogenetic distribution of extracellular matrix components in the model rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* F113 and other pseudomonads.

PC2.4. J. Cámara-Almirón. Caracterización de regiones funcionales en el núcleo amiloide de TasA y su importancia estructural y ecológica para el proceso de polimerización e interacción con la planta.

PC. 2.5. Montserrat Grifé-Ruiz. Mejora genética de *Bacillus amyloliquefaciens* UMAF6639 para aumentar su capacidad de biocontrol

PC. 2.6. I. Ramírez-Novillo Actividad y efecto de nanopartículas de óxido de cobre frente a bacterias fitopatógenas.

PC2.7. M. Rodríguez. Promoción del crecimiento vegetal y biocontrol de fitopatógenos por la actividad de tres cepas de los géneros *Peribacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

PC2.8. L. Ruiz-Jiménez. Aplicación foliar de ARN exógeno: una nueva herramienta para el silenciamiento génico en *Podosphaera xanthii*.

PC2.9. R. Villar Moreno. Estudios de compatibilidad entre distintas cepas de *Pseudomonas chlororaphis* asociadas a raíz de aguacate.

PC2.10. I. Pérez-Lorente. Un método no invasivo para el estudio de interacciones microbianas y dinámica de biofilms.

17 de febrero

9.30-11.30 S3. MICROORGANISMOS ENDOSIMBIÓTICOS Y ENDÓFITOS.

Moderador: Jose M^a Vinardell. Dpto. de Microbiología. Universidad de Sevilla.

S3.1. F. Fuentes Romero. Un análisis detallado del regulón *nod* de *Sinorhizobium fredii* HH103. Dpto. de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

S3.2. L. Domingo Serrano. Análisis funcional de proteínas de respuesta a estrés (sHsp) en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. CBGP - Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

S3.3. P. Ayala García. OnfD, un regulador transcripcional de tipo AraC de *Rhizobium tropici* CIAT 899 implicado en la síntesis de factores de nodulación y en simbiosis. Dpto. de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

S3.4. L.M. Pulido Suárez. Uso de rizobios para la conservación de una especie de leguminosa clave en el ecosistema de alta montaña canario. *Dpto. de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Universidad de la Laguna.*

S3.5. P. Benito. El viaje de una actinobacteria filamentosa endofítica desde las raíces hasta las hojas. *Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.*

S3.6. N. González Benítez. Plant endophytes are resistance tools for the abiotic stress. *Dpto. de Biología, Geología, Física y Química inorgánica. ESCET-Universidad Rey Juan Carlos.*

S3.7. L. B. Conchillo. Respuesta de *Serendipita indica* a la deficiencia de K⁺ en condiciones de vida libre y durante la simbiosis con *Arabidopsis thaliana*. *CBGP - Universidad Politécnica de Madrid (UPM)- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).*

S3.8. J. Poveda Arias. Efectos beneficiosos de hongos endófitos filamentosos radiculares de *Brassica oleracea* var. *acephala* (berza): primer estudio sobre *B. oleracea*. *Misión Biológica de Galicia-CSIC.*

11.30-12.00 Descanso

12.00-14.00. S4. GENÓMICA Y METAGENÓMICA DE LA INTERACCIÓN PLANTA/MICROORGANISMO

Moderador: Jesús Murillo. Instituto de investigación multidisciplinaria en Biología Aplicada. Universidad Pública de Navarra.

S4.1. M. Torres Béjar. Estudio de la colonización bacteriana mediante técnicas de tipo Tn-seq. *Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, United States.*

S4.2. M. Urriza Leoz. Genómica comparativa de plásmidos nativos de bacterias fitopatógenas. *IMAB, Universidad Pública de Navarra.*

S4.3. D. Vázquez Arias. Two type VI Secretion Systems of *Pseudomonas fluorescens* F113 mediate bacterial killing and are important for rhizosphere microbiome adaption. *Dpto. Biología. Universidad Autónoma de Madrid.*

S4.4. Z. Saati Santamaría. Estudio del pan-genoma de *Pseudomonas* para descubrir funciones asociadas a la interacción con su hospedador. *Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.*

S4.5. J.D. Flores Félix. Caracterización metagenómica y culturómica de las poblaciones bacterianas asociadas a *Vaccinium myrtillus* en Portugal. *CICS-UBI-Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.*

S4.6. N. M. Wentzien. Estudio comparativo de las comunidades microbianas rizosféricas de encina y olivo: efecto del manejo agrícola y tolerancia a verticilosis. *Dpto. de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. EEZ-CSIC.*

S4.7. R. Vicentefranqueira Rodríguez. Evaluación de las comunidades microbianas de *Vaccinium myrtillus* para el aislamiento e identificación de microorganismos capaces de mejorar el rendimiento del cultivo y las propiedades nutricionales del arándano. *Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.*

S4.8. M. Iniesta Pallarés. Análisis del microbioma de los cultivos de arroz de las marismas del Guadalquivir. *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), CSIC y Universidad de Sevilla.*

14.00-16.00 Comida.

16.00-17.30 Presentaciones Cortas 3 y 4 (PC3-PC4).

Moderador: José Palacios Alberti (CBGP - Universidad Politécnica de Madrid- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria)

PC3. MICROORGANISMOS ENDOSIMBIÓTICOS Y ENDÓFITOS

PC3.1. M. Ayuso-Calles. *Rhizobium laguerreae* mejora del contenido nutricional de *Lactuca sativa* L. bajo condiciones de estrés salino.

PC3.2. M. Ballesteros. Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae a diferentes hospedadores.

PC3.3. B. F. S. De Sousa. Efecto de los Sistemas de Secreción Tipo VI (T6SS) de rizobios en la simbiosis con leguminosas.

PC3.4. N. Moreno-de Castro. Estudios *in silico* e *in vivo* del sistema de secreción de tipo VI de *Sinorhizobium fredii* USDA257.

PC3.5. A. Pedrero-Méndez. Cepas de *Trichoderma* endófitas de trigo incrementan la tolerancia de esta planta al estrés hídrico.

PC3.6. E. Peral-Aranega. Análisis del Potencial de Aislados del Género *Rhizobium* como Biofertilizantes de Trigo Duro (*Triticum durum*).

PC3.7. R. Roca Couso. Bacterias endofíticas aisladas del interior de zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott) para la promoción del crecimiento vegetal.

PC3.8. L. M. Bernabéu-Roda. Identificación de una tioesterasa de *Sinorhizobium meliloti* implicada en la síntesis del infoquímico 2-tridecanona.

PC4. GENÓMICA Y METAGENÓMICA DE LA INTERACCIÓN PLANTA/MICROORGANISMO

PC4.1. M. Anguita-Maeso. La atenuación de la microbiota del xilema modifica la reacción de resistencia de un clon de olivo silvestre a la infección por *Verticillium dahliae*.

PC.4.2. N. López-Pagán. Análisis del metiloma de *Pseudomonas syringae*.

PC4.3. C. Sanchis-López. Estudio del perfil de quimiorreceptores en microbiomas asociados a cultivos.

SESIÓN 1.

MECANISMOS DE VIRULENCIA

S1.1. Una monooxigenasa lítica de polisacáridos haustorial de *Podosphaera xanthii* contribuye a la supresión de la inmunidad disparada por quitina

Á. Polonio*, D. Fernandez-Ortuño, A. de Vicente, A. Pérez-García

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

Podosphaera xanthii es el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas y uno de los agentes limitantes más importantes para su producción. Para completar su ciclo de vida, este hongo depende del desarrollo de unas estructuras especiales de parasitismo denominadas haustorios. Los haustorios son responsables de la obtención de nutrientes y la liberación de efectores. Entre las funciones de estos efectores destaca la supresión de la PTI, es decir, la inmunidad disparada por PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). La quitina es uno de los principales componentes de la pared celular fúngica y una PAMP muy conocida. En este trabajo, examinamos el papel de PHEC27213, el efector candidato específico de haustorio que presentó una mayor expresión relativa en estudios transcriptómicos previos en *P. xanthii*. PHEC27213 carece de función anotada, pero según diferentes predicciones computacionales, muestra características similares a una monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO), así como un dominio de unión a quitina. Sin embargo, su secuencia presenta una baja identidad con LPMO conocidas y el dominio de unión a quitina predicho difiere de los módulos de unión a carbohidratos canónicos. No obstante, los ensayos de actividad enzimática y de unión a polisacáridos mostraron que PHEC27213 es capaz de unir y catalizar tanto quitina coloidal como quito-oligosacáridos, actuando como LPMO. Además, los ensayos de silenciamiento génico mediante RNAi mostraron el papel de esta proteína en la prevención la activación de la respuesta inmune mediada por quitina. Por último, proteínas con características similares han sido encontradas en otros patógenos formadores de haustorios. En conjunto, nuestros resultados sugieren que estamos frente a un nuevo tipo de LPMO fúngica que es capaz de catalizar quito-oligosacáridos para contribuir en la supresión de la inmunidad de la planta durante el desarrollo del haustorio. Para nuestro conocimiento, este hallazgo supone la identificación del primer mecanismo de evasión de la respuesta inmune identificado en este tipo celular.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-76216-C2-1-R) cofinanciado con fondos FEDER (UE).

S1.2. Influencia del material vegetal y la concentración bacteriana en la detección de *Xylella fastidiosa* mediante protocolos de PCR en tiempo real

À. Figàs-Segura^{*1}, S. Barbé², M. San Martín², B. Llobregat¹, I. Navarro-Herrero², A. Monterde², E. Marco-Noales², E. G. Biosca¹

¹*Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universitat de València. España.*

²*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). España.
E-mail: Angela.Figas@uv.es*

La prevención de la introducción de una enfermedad en una zona libre de ella depende, en primer lugar, de la disponibilidad de técnicas de detección que sean sensibles y específicas. En el caso de las enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*, el protocolo actual de la EPPO para la detección de esta bacteria fitopatógena, se basa en la detección molecular, y en él se describen varios protocolos de PCR en tiempo real dirigidos a diferentes secuencias diana del genoma de esta bacteria. Entre algunas de las dificultades propias de la detección y el diagnóstico de *X. fastidiosa*, está el hecho que este patosistema incluye una amplia gama de plantas hospedadoras (más de 595 especies diferentes) y la distribución de la población bacteriana no es uniforme en la planta infectada. El objetivo del presente estudio ha sido determinar la idoneidad de diversos protocolos de PCR en tiempo real para diferentes tipos de material vegetal y diferentes concentraciones de la bacteria. Para ello, se prepararon extractos de plantas sanas de distintas especies de importancia agronómica y ornamental, como diversas variedades de almendro y olivo, naranjo, limonero, mandarino, níspero, higuera, caqui y adelfa. Los extractos se inocularon con diluciones decimales seriadas de cepas de *X. fastidiosa* de diferentes subespecies y orígenes. En todos los casos se utilizó el método CTAB para la extracción de ADN. Hasta ahora, se han encontrado ligeras diferencias en los resultados dependiendo de las variedades y especies de plantas analizadas, así como en función de los protocolos de PCR utilizados. En algunos casos, parece haber problemas de inhibición con algunos de estos protocolos. Actualmente, se están ensayando los diferentes protocolos en muestras de almendros de la zona afectada por *X. fastidiosa* en Alicante.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto XF-ACTORS del Programa Marco de Investigación Horizonte 2020 de la Unión Europea, por el proyecto E-RTA 2017-00004-C06-01 FEDER INIA-AEI Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-FEDER y por la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español. Agradecemos también el apoyo a la red IBERXYFAS (CYTED), de la que formamos parte.

S1.3. Estudio de caracteres asociados a la capacidad de colonización e infección de microorganismos que viven en el xilema mediante el uso de dispositivos de microfluídica

M.P. Velasco-Amo^{1*}, C. Quiles Pando¹, M. Román-Écija¹, L. De La Fuente², B.B. Landa del Castillo¹

¹*Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IAS-CSIC).*

²*Department of Entomology and Plant Pathology, Auburn University, USA.*

Email: blanca.landa@ias.csic.es

Los dispositivos (chips) de microfluídica permiten simular espacialmente nichos ecológicos a escalas micrométricas y crear un microambiente controlable mediante la inyección de fluidos de distinta composición con un flujo controlado a distintas presiones y velocidades a través de un canal. En comparación con los métodos tradicionales, los chips de microfluidos tienen las ventajas de miniaturización, alto rendimiento, rapidez, integración y menor consumo de materiales y reactivos. En los últimos años, los chips de microfluidos se han desarrollado y aplicado rápidamente a varios campos de investigación microbiológica, como por ejemplo el estudio de especies de microorganismos no cultivables que habitan nichos ecológicos complejos como es el xilema de las plantas. En concreto, los chips fabricados en elastómero de silicona, como el PDMS, sobre soporte de cristal, pueden ser utilizados en combinación con bombas de inyección de presión controlada que proporcionan flujos de velocidad variable de medios de crecimiento que permiten simular el nicho ecológico de los haces vasculares del xilema de una planta.

En este trabajo se han utilizado chips de microfluidos fabricados en nuestro laboratorio para caracterizar diversos procesos asociados con la colonización vascular de diferentes subespecies de *Xylella fastidiosa* incluyendo: la fuerza de adhesión, formación de biopelículas, movilidad, y división celular. La puesta a punto de esta metodología nos permitirá estudiar factores asociados con la virulencia diferencial de las distintas subespecies de *X. fastidiosa* sobre distintos huéspedes, caracterizar el papel de diversos genes de interés en los procesos de patogenicidad y virulencia a través de mutantes de esta bacteria, así como para el estudio de la interacción, competición y posible antagonismo in situ entre distintas subespecies de *X. fastidiosa* o con otras bacterias habitantes del xilema, que pueden actuar como agentes de biocontrol de este patógeno.

S1.4. Papel de los efectores tipo III en la especificidad de huésped de los patovares de *Pseudomonas savastanoi*.

A. Moreno-Pérez^{1,2*}, J. Murillo³, P. Rodríguez-Palenzuela⁴, C. Ramos^{1,2}.

¹Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Teatinos s/n, E-29010 Málaga. ²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga. ³IMAB, Universidad Pública de Navarra, Mutilva Baja, E-31192. ⁴Centro 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.

E-mail: crr@uma.es

La especie *Pseudomonas savastanoi*, englobada dentro del complejo *Pseudomonas syringae*, está constituida por cinco patovares capaces de infectar huéspedes leñosos: pv. *savastanoi* (Psv, aislados de olivo), pv. *nerii* (Psn, aislados de adelfa), pv. *fraxini* (Psf, aislados de fresno), pv. *retacarpa* (Psr, aislados de retama) y pv. *mandevillae* (Psm, aislados de dipladenia). Dentro del complejo *P. syringae*, se ha identificado al sistema de secreción tipo III (T3SS) y su repertorio de efectores (T3E) como uno de los factores más relevantes en el establecimiento de la enfermedad y en la determinación del rango de huésped. Hasta la fecha, solo se ha demostrado el papel del T3SS en la patogenicidad y virulencia de cepas de los patovares Psv y Psn. Para abordar su función en el resto de patovares, en este trabajo se han construido mutantes del gen *hrpL* (principal regulador positivo del T3SS) en cepas modelo de Psf, Psr y Psm, los cuales no indujeron síntomas en sus respectivos huéspedes ni la respuesta hipersensible en plantas no huésped. El análisis bioinformático del repertorio de T3E de todas las cepas de *P. savastanoi* secuenciadas hasta la fecha nos permitió identificar aquellos efectores que podían jugar un papel en el rango de huésped de estos patovares. En este trabajo se ha estudiado el papel en el rango de huésped de algunos de estos T3E mediante dos estrategias distintas: 1) expresión heteróloga de T3E en cepas de los patovares que no los codifican y, 2) mutación de genes codificadores de T3E en cepas de los patovares que los codifican de forma exclusiva. Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido 1) establecer una relación entre la variación alélica de genes de T3E y los patovares de *P. savastanoi*, 2) demostrar que el T3SS es esencial para la patogenicidad de todos los patovares de huéspedes leñosos de esta especie y, 3) demostrar que el repertorio de T3E juega un papel esencial en la definición del rango de huésped en *P. savastanoi*.

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

S1.5. La esporulación es un proceso prescindible para la persistencia del patógeno de humanos *B. cereus* en su ciclo de vida planta-hospedador.

L. Díaz-Martínez*, M.L. Antequera-Gómez, J.A. Guadix, A.M. Sánchez-Tévar, S. Sopena-Torres, J. Hierrezuelo, H.K. Doan, J. H.J. Leveau, A. de Vicente y D. Romero.

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

La contaminación de productos frescos, almacenados o procesados con patógenos de humanos es un problema muy grave en la seguridad alimentaria, pudiendo llegar a provocar brotes de intoxicación alimentaria.

Bacillus cereus es una bacteria que se encuentra de forma natural en los suelos y puede vivir asociado con plantas. Algunos miembros de este grupo bacteriano también son responsables de brotes de intoxicación alimentaria por consumo de verduras y frutas crudas o alimentos procesados. La intoxicación alimentaria causada por *B. cereus* se clasifica en dos categorías, emética y diarreica, según la batería de toxinas producidas. La intoxicación diarreica se produce después de la ingestión de alimentos contaminados con esporas enterotoxigénicas de *B. cereus* que, al germinar en el intestino, producen enterotoxinas termolábiles. Mientras que en la intoxicación diarreica está involucrado un grupo de tres enterotoxinas: hemolisina BL (Hbl), enterotoxina no hemolítica (Nhe) y citotoxina K (CytK).

Las esporas de *B. cereus* son altamente adhesivas y resistentes al estrés, lo que asegura su persistencia en una variedad de ambientes, bajo diversas medidas de saneamiento y en alimentos listos para el consumo o procesados. En condiciones ambientales más favorables, las esporas germinan fácilmente a células vegetativas y comienzan nuevos ciclos de vida. Además de las esporas, la contaminación con *B. cereus* en la industria alimentaria es atribuible a la formación de *biofilms*. En el ciclo de vida propuesto de *B. cereus*, estos microbios viven como saprófitos en el suelo, se trasladan a las plantas y luego ingresan a entornos relacionados con los humanos (hospitales, la industria alimentaria, etc). Las esporas o células vegetativas por tanto se van rotando en función a la etapa del ciclo de vida, bien como células individuales o embebidas en *biofilm*.

En este estudio, se investigó la relevancia de las esporas y el *biofilm* de *B. cereus* para la persistencia de esta especie en plantas. El análisis comparativo de un grupo de cepas involucradas en intoxicaciones alimentarias nos permitió proponer que la esporulación es un rasgo ecológico importante en la superficie de hojas de planta, pero es prescindible en vegetales listos para el consumo, donde las células vegetativas persisten colectivamente dentro del *biofilm*. Además, mostramos que defectos genéticos preexistentes en alguna de las cepas en la esporulación no disminuyen la patogenicidad de las células vegetativas de *B. cereus* en un modelo de ratón. Además de estas implicaciones ecológicas y evolutivas, nuestro estudio apoya la subestimación en el número de casos de intoxicación alimentaria asociados con *B. cereus*, ya que el diagnóstico de estos casos se basa principalmente en esporas y toxinas.

Este trabajo está financiado por los proyectos: AGL2016-78662-R y PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación; la European Research Council Starting Grant (BacBio 637971); UMA18-FEDERJA-055 de la Junta de Andalucía.

S1.6. Caracterización de la implicación de la pared celular vegetal y sus compuestos derivados en la virulencia de *Dickeya dadantii*.

C. Gálvez Roldán ^{*1}, H. Mérida Martínez¹, A. Molina Fernández^{1,2} y E. López Solanilla^{1,2}

¹*Centro 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.*

²*Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas.Madrid.*

E-mail: clara.galvez@upm.es

Dickeya dadantii 3937 (Dd3937), es una bacteria necrótrofa Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Causa podredumbres blandas en un amplio rango de cultivos de elevada importancia económica como patata, zanahoria, achicoria, col, etc. En su genoma se codifican 47 quimiorreceptores. En trabajos previos nuestro grupo ha descrito la participación de uno de ellos en la percepción de xilosa, un componente de la pared vegetal. La pared celular es, a menudo, el sitio inicial de encuentro entre las plantas y sus patógenos microbianos, además, constituye un componente esencial de las células vegetales que regula diversos procesos biológicos y determina directamente la capacidad de la planta de crecer y resistir estreses bióticos y abióticos. Por todo ello, nuestro estudio se centra en la percepción de compuestos derivados de la pared celular vegetal.

El principal objetivo de nuestra investigación es determinar la importancia de la composición de la pared celular en el progreso de la infección y la relevancia de la percepción de determinados oligosacáridos por la bacteria en el proceso de colonización.

Hemos llevado a cabo ensayos de infección de Dd3937 en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan diferentes modificaciones de la composición de la pared primaria o secundaria Hemos identificado mutantes con distintos niveles de resistencia y establecido una correlación entre determinados cambios en la composición de la pared celular y el nivel de resistencia al patógeno

Hemos definido el perfil quimiotáctico de la bacteria, identificando si Dd3937 presenta quimioatracción hacia compuestos derivados de la pared celular definiendo la capacidad de percepción de compuestos específicos

En paralelo hemos seleccionado diferentes quimiorreceptores con alto índice de asociación a plantas, basándonos en una aproximación bioinformática desarrollada en nuestro laboratorio, para llevar a cabo su caracterización y comprobar si estos participan en la percepción de oligosacáridos derivados de la pared celular vegetal.

Financiación: RTI2018-095222-B-I00. Clara Gálvez es beneficiaria de un contrato FPI Severo Ochoa (SEV-2016-0672-17-1).

S1.7. Mecanismos moleculares de la adaptación de quimiorreceptores en la bacteria fitopatógena *Pectobacterium atrosepticum*.

F. Velando ^{*1}, J. A. Gavira², M. A. Matilla¹ and T. Krell¹

¹*Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín &*

²*Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada.*

E-mail: tino.krell@eez.csic.es

La enterobacteria fitopatógena *Pectobacterium atrosepticum* es el agente causal de la enfermedad de pie negro y de podredumbres blandas en plantas y tubérculos de patata, respectivamente. Las pérdidas económicas derivadas de estas enfermedades son importantes, lo que ha supuesto que se incluya entre las 10 bacterias fitopatógenas con mayor relevancia científico-económica. De hecho, *P. atrosepticum* SCRI1043, cepa modelo en este estudio, fue la primera enterobacteria fitopatógena con genoma secuenciado. La cepa SCRI1043 es altamente quimiotáctica y representa un excelente modelo para el estudio del papel de la quimiotaxis en fitopatogenicidad. Nuestras investigaciones muestran que SCRI1043 presenta un único sistema de quimioseñalización que está implicado en quimiotaxis. El genoma de SCRI1043 codifica 36 quimiorreceptores, lo que sugiere que podría detectar una gran diversidad de moléculas quimioefectoras. La sensibilidad de reconocimiento de quimioefectores por los quimiorreceptores se modula alterando el estado de metilación de estos últimos. Este mecanismo de adaptación se lleva a cabo a través de la acción coordinada de la metiltransferasa CheR y la metilesterasa CheB, y permite a la bacteria desplazarse de manera eficiente en gradientes químicos. Determinados quimiorreceptores presentan pentapéptidos en su extremo C-terminal los cuales funcionan como sitios adicionales para la unión de CheR y CheB. Sin embargo, dado que únicamente el ~10% de los quimiorreceptores bacterianos tienen pentapéptidos, se desconoce la relevancia fisiológica de éstos. Notablemente, el 53% de los quimiorreceptores de SCRI1043 presentan pentapéptidos, lo que convierte a esta cepa en un magnífico modelo de estudio para analizar el papel fisiológico de estos péptidos. En este trabajo analizamos la interacción de las proteínas CheB y CheR de SCRI1043, CheB_Pec y CheR_Pec, con los nueve peptapéptidos presentes en los quimiorreceptores de esta cepa. Los resultados muestran que CheR une la totalidad de los pentapéptidos con afinidades comprendidas entre 86 nM y 1 µM. Sorpresivamente, CheB_Pec fue incapaz de unir pentapéptidos tanto en su forma fosforilada (utilizando un análogo de fosforilación) como desfosforilada. Para determinar las bases moleculares de esta ausencia de reconocimiento de pentapéptidos, se resolvió la estructura cristalográfica de CheB_Pec con una resolución de 2.3 Å. La estructura de CheB_Pec se superpone con la estructura de CheB de *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium, que sí es capaz de unir pentapéptidos. Sin embargo, aunque tanto el dominio aceptor de fosforilos como el dominio metilesterasa que caracterizan a las proteínas CheB están conservados en CheB_Pec, se observó una ausencia de densidad electrónica en la región que en CheB de *Escherichia coli* está implicada en el reconocimiento de pentapéptidos. Además, la secuencia implicada en unir pentapéptidos en *E. coli* no está conservada en SCRI1043. Por tanto, nuestros datos demuestran que las proteínas CheB pueden clasificarse como dependientes e independientes de pentapéptidos. Asimismo, proponemos que el reconocimiento diferencial de pentapéptidos por CheR sería un mecanismo que permitiría regular de manera eficiente el estado de metilación de ciertos quimiorreceptores.

S1.8. Papel de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las interacciones planta-bacteria

A. Casas-Román*, M. Werner, M.J. Lorite, S. Muñoz, M.D. Ferreiro, M.T. Gallegos, J. Sanjuán

*Departamento de Microbiología del suelo y sistemas simbióticos. Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.
E-mail: Juan.Sanjuan@eez.csic.es*

Las plantas se asocian de forma natural con una gran diversidad de microorganismos. Por un lado existen interacciones planta-microorganismo beneficiosas, como la simbiosis de leguminosas con rhizobia, caracterizada por su capacidad de fijar nitrógeno molecular. En el otro extremo se encuentran las interacciones patogénicas, en las que microorganismos patógenos afectan la salud de la planta y constituyen una amenaza para la producción de alimentos, como es el caso de *Pseudomonas syringae*. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una proteína central para el metabolismo de la glucosa y se encuentra presente en prácticamente todos los organismos. Esta enzima ha sido descrita como proteína *moonlighting* o multifunción, involucrada en diversos procesos biológicos en procariotas y eucariotas. En la simbiosis rhizobio-leguminosa, GAPDH ha sido encontrada asociada a la membrana de simbiosomas, mientras que en el caso de *Pseudomonas* se ha sugerido que esta proteína pudiera tener un rol específico en la virulencia. Con el fin de determinar la importancia de la GAPDH en las interacciones planta-bacteria se han construido y caracterizado mutantes por delección del gen o genes codificantes para esta enzima tanto en la cepa CFN42 de *Rhizobium etli* (Ret) como en *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto) DC3000.

En comparación con la cepa silvestre, el mutante *gap⁻* de Ret solo es capaz de formar un pequeño número de nódulos con capacidad de fijación de nitrógeno muy reducida, en raíces de judía (*Phaseolus vulgaris*). En vida libre, este mutante presenta importantes déficits de crecimiento a expensas de sustratos gluconeogénicos o glucolíticos como una única fuente de carbono; sin embargo, es capaz de crecer normalmente cuando se le proporciona simultáneamente una fuente de carbono de cada tipo.

En el caso de Pto la bacteria presenta hasta 3 parálogos diferentes de esta proteína. Un mutante *gap1⁻* presenta un fenotipo infeccioso en tomate (*Solanum lycopersicum*) y de respuesta hipersensible (HR) en judía (*Phaseolus vulgaris*) similar a la cepa silvestre, mientras que en vida libre presenta un déficit de crecimiento en sustratos metabolizados por la vía glucolítica. El mutante *gap2⁻* si presenta fenotipo deficiente en infección, y en vida libre no es capaz de crecer con sustratos gluconeogénicos. El doble mutante *gap1/gap2⁻* presenta un fenotipo tanto infeccioso como de HR muy deficiente, y en vida libre sólo es capaz de crecer cuando se le proporciona simultáneamente un sustrato carbonado de cada tipo. Los resultados obtenidos muestran que GAPDH está implicada en diferentes aspectos, tanto en el metabolismo como en la interacción con la planta hospedadora en ambos tipos de bacterias. El trabajo futuro se centrará en dilucidar la implicación de esta proteína en los mecanismos de colonización e infección de la planta independientemente de su papel en el metabolismo de azúcares.

Trabajo financiado por el proyecto BIO2017-83533-P de la Agencia Estatal de Investigación. A. C-R disfruta de un contrato predoctoral (AEI).

SESIÓN 2.

MECANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO Y CONTROL BIOLÓGICO

S2.1. Papel del polisacárido tipo Psl en dos modelos de *Pseudomonas* asociados a planta

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

Dirección: *Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC) - Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur, 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071, Málaga, España.*

E-mail:adevicente@uma.es

El polisacárido Psl es un componente importante de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*. Existe una región homóloga que codifica para este polisacárido en otras *Pseudomonas* diferentes a *P. aeruginosa*, incluidas bacterias patógenas y beneficiosas de plantas, pero su papel en la formación de biopelículas no se ha analizado hasta ahora. La cepa fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 (PssUMAF0158), agente causal de la necrosis apical del mango, y el agente de biocontrol *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 (PcPCL1606), contienen ambos una región genómica que codifica para este polisacárido. Mutantes en esta región han demostrado que este componente tiene un papel importante en la formación de biopelículas en ambas cepas. El clúster génico de tipo *psl* de PssUMAF0158 está presente en todos los filogrupos del complejo *P. syringae* que están asociados a plantas. Sin embargo, la presencia del clúster génico de tipo *psl* de PcPCL1606 en el complejo *Pseudomonas fluorescens* es más variable, aunque está presente en todas las cepas del filogrupo *P. chlororaphis* que se han incluido en este estudio. Este componente ha mostrado ser importante en la arquitectura tridimensional de la biopelícula formada por ambas cepas, así como en adhesión, movilidad y la colonización, llegando a influir el estilo de vida manifestado en interacción con el huésped vegetal. Estos resultados constituyen el primer estudio del polisacárido de tipo Psl en *Pseudomonas* ambientales y destaca su importancia en la formación de biopelículas e interacción con planta.

S2.2. Biofertilizantes bacterianos para cultivos de fresa sostenibles

J. Mesa-Marín^{*1}, J.V. García-López², A. Pérez-Romero², S. Redondo-Gómez², I.D. Rodríguez-Llorente³, E. Mateos-Naranjo²

¹Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga
– IHSM La Mayora, CSIC, Málaga

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

³Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla
E-mail: jmesam@uma.es

El sector de la fresa constituye un motor económico y social fundamental para Andalucía, ya que genera unos 45.000 puestos de trabajos directos y un beneficio de exportación por campaña de cerca de 500 millones de euros. A pesar de su importancia, la sostenibilidad de su cultivo a corto y medio plazo está comprometida. Por un lado, como consecuencia de la disminución de la disponibilidad hídrica. Por otro lado, por los costes y riesgos toxicológicos derivados del exceso de aplicación de químicos para la fertilización y el control de patógenos. Esta situación es especialmente crítica en áreas más sensibles, como podría ser el Parque Nacional de Doñana y su entorno. En nuestro trabajo, proponemos abordar esta problemática desde una nueva perspectiva que contribuya a hacer de la fresa un cultivo más sostenible. Hemos desarrollado una bioherramienta basada en el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR). El objetivo de nuestra investigación consiste en estudiar si con la biofertilización bacteriana propuesta es posible mantener, e incluso mejorar, el balance hídrico y nutricional del cultivo de la fresa al reducir los insumos (agua, fertilizantes y tratamientos fitosanitarios), con el consiguiente impacto económico y medioambiental. Para ello, seleccionamos bacterias con propiedades promotoras del crecimiento vegetal y diseñamos varios inoculantes. Estos se probaron en condiciones de invernadero en la Universidad de Sevilla, con plantas de fresa en maceta, de las variedades Fortuna y Rociera, de la campaña 2019/2020. Las plantas se sometieron a déficit de agua y déficit de fertilización química durante varios meses. Durante el experimento, analizamos (a) el crecimiento y la respuesta fisiológica de la fresa, a través de medidas quincenales de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila, y (b) la producción y calidad de la fruta, mediante medidas semanales de número de frutas, calibre, peso y grados Brix. Nuestros resultados concluyeron que, tras la primera cosecha, sólo uno de los inóculos bacterianos diseñados produjo resultados significativamente favorables sobre la fresa. Por ejemplo, su uso mejoró la producción de fresa (g fresa/planta) respecto a plantas sin inocular en un 36 % en situación de déficit de agua, un 14 % bajo restricción de fertilización, y en un 32% cuando se combinaron los dos factores de estrés. Los parámetros de fluorescencia, al igual que los grados Brix, también mejoraron, aunque de forma más leve que los datos de producción. Para la campaña 2020/2021 estamos diseñando un experimento de campo para verificar la eficacia agronómica del inóculo propuesto. Se llevará a cabo en túneles de cultivo comerciales cedidos por la empresa Agro GM. Además, se analizará de forma adicional el potencial del inóculo seleccionado para mejorar de las condiciones del suelo tras el desarrollo de la campaña. En última instancia, buscamos soluciones que permitan al agricultor una gestión más eficiente de los recursos hídricos y producir fresa con menores cuotas hídricas y/o aguas de peor calidad, si fuera necesario.

Financiación: CGL2016-75550-R, FEDER US-1262036, FJC2018-036625-I

S2.3. Inoculación de *Medicago sativa* con bacterias rizosféricas que ayudan a la nodulación en suelos degradados.

N. J. Flores-Duarte *, E. Pajuelo, I. D. Rodríguez-Llorente, S. Navarro-Torre

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Email: norflodua@alum.us.es

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos en la agricultura y ganadería es una de las causas principales de la contaminación ambiental, provocando deterioro de los suelos por deficiencia de nutrientes, así como causando estrés a las plantas por factores bióticos y abióticos. Esto ha llevado a buscar nuevas alternativas biológicas, donde la interacción entre plantas y microorganismos beneficiosos, como rizobacterias capaces de promover el crecimiento de las plantas (PGPR), juega un papel importante. La utilización de PGPR como biofertilizantes es una alternativa sostenible para aumentar la disponibilidad de nutrientes en los suelos, mejorando así el crecimiento y la producción de los cultivos. Con el objetivo de aumentar la productividad vegetal en suelos degradados, se aislaron, identificaron y caracterizaron 15 cepas bacterianas diferentes de la rizosfera de leguminosas crecidas en suelos degradados, pobres en nutrientes, en el estuario del río Piedras (Huelva). En base a la presencia de propiedades PGP y actividades enzimáticas, se seleccionaron 3 cepas identificadas como: *Pseudomonas brenneri* L1, *Chriseobacterium* sp. L2 y *Bacillus* sp. L3. Una vez seleccionadas las bacterias, se utilizaron como inoculantes de semillas de *Medicago sativa*, para determinar la cinética y la tasa de germinación en presencia de estas bacterias. Posteriormente, se inocularon semillas germinadas de *M. sativa* para realizar estudios de nodulación *in vitro* en placas con medio BNM. Para ello, se utilizó como rizobio *Ensifer medicae* MA11. Las condiciones fueron las siguientes: placas control con plántulas sin inocular (C-), placas control con plántulas inoculadas con MA11 (MA11), placas con plántulas co-inoculadas con MA11 y cada una de las bacterias seleccionadas (MA11+L1, MA11+L2 y MA11+L3) y placas con plántulas co-inoculadas con MA11 y un consorcio de las tres bacterias seleccionadas (CSR).

Los resultados obtenidos mostraron que las semillas co-inoculadas tuvieron un mayor porcentaje de germinación. Además, las plántulas co-inoculadas presentaron mayor biomasa, tanto en la raíz como en la parte aérea, siendo el mejor resultado el obtenido con la co-inoculación con el consorcio. Por último, la nodulación también se vio mejorada en las plántulas co-inoculadas, destacando la co-inoculación con el consorcio que mostró un 77 % más nódulos que el control con MA11.

Estos resultados sugieren que la co-inoculación con estas bacterias seleccionadas mejora la nodulación de *M. sativa* gracias a sus propiedades PGP y actividades enzimáticas. Aunque se necesita más investigación para completar estos resultados, la co-inoculación con rizobacterias en plantas de *M. sativa* parece ser una herramienta ecológica útil para reducir el uso de fertilizantes químicos en suelos con baja disponibilidad de nutrientes y también para promover el crecimiento de las plantas en suelos degradados.

S2.4. Regulación del K1-T6SS de *Pseudomonas putida* por las proteínas Rsm**M. Murillo-Torres*, C. Civantos, L.P. Allsopp, P. Bernal***Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla**E-mail: marmurtor1@alum.us.es*

Pseudomonas putida es un agente de biocontrol que protege a las plantas del ataque de fitopatógenos. En la cepa KT2440, esta capacidad se atribuye en gran parte al Sistema de Secreción Tipo VI (T6SS), una nanomáquina que inyecta toxinas al interior de otras bacterias. Esto le otorga una gran ventaja evolutiva para aniquilar a sus competidores, entre ellos los fitopatógenos. Concretamente, *P. putida* KT2440 codifica tres T6SS (K1-, K2- y K3-T6SS), siendo el primero funcional y efectivo en ensayos *in vitro* e *in planta*.

Comprender los mecanismos que regulan el K1-T6SS resulta fundamental para la búsqueda de cepas con una mayor actividad antibacteriana. Aunque los elementos reguladores de los T6SS suelen variar bastante entre especies, muchos estudios coinciden en que su expresión depende de varios reguladores globales. Entre ellos, se encuentran las proteínas Rsm, que reconocen en el ARNm la estructura tridimensional de una secuencia específica (sitios de unión a Rsm) comúnmente solapante con la secuencia de unión a ribosoma o Shine Dalgarno. La unión de Rsm a esta secuencia permite regular su traducción, en algunos casos favoreciéndola y en otros casos reprimiéndola. En *P. putida*, se han descrito tres proteínas Rsm (RsmI, RsmE y RsmA), aunque se desconoce si regulan el T6SS. No obstante, el homólogo de estas proteínas en *Pseudomonas protegens* (CsrA) está implicado en biocontrol, y el homólogo en *Pseudomonas aeruginosa* (RsmA) controla sus tres T6SS. Así pues, nuestro objetivo es evaluar la implicación de las proteínas Rsm en la regulación del K1-T6SS.

En este trabajo identificamos, mediante una búsqueda *in silico*, varios sitios putativos de unión a Rsm a lo largo de la secuencia del K1-T6SS. Para estudiar cómo afecta su reconocimiento por Rsm a nivel traduccional, hemos generado fusiones traduccionales al gen *lacZ* de los genes *tagB1*, *tssE1*, *tssJ1*, *hcp1* y *vgrG1* y se han estudiado en la estirpe silvestre y el triple mutante $\Delta rsmIEA$. Resultados preliminares muestran que *tagB1* presenta una mayor actividad β -galactosidasa en el triple mutante durante la fase exponencial, lo que indica una mayor traducción del transcrito en ausencia de Rsm y que, por tanto, Rsm parece inhibir su traducción. Así mismo, para comparar la actividad del sistema en la cepa silvestre y el triple mutante, se ha analizado la producción intracelular y la secreción de una proteína secretada por el K1-T6SS (Hcp1). No se detectaron diferencias en la producción intracelular, pero sí un aumento de la secreción de Hcp1 en el triple mutante. Esto implica una mayor activación del sistema en ausencia de Rsm, lo que se relaciona con la mayor tasa de traducción de los transcritos del mismo, como visto anteriormente. En ensayos de competición de la cepa de biocontrol frente a *Escherichia coli* y diferentes fitopatógenos, observamos que el triple mutante tiene mayor capacidad para eliminar competidores que la cepa silvestre. Es decir, en ausencia de Rsm, la traducción de los transcritos del K1-T6SS está desreprimida, lo que se traduce en una mayor capacidad para secretar efectores y por tanto para matar competidores. El conjunto de datos aquí presente apunta a que las proteínas Rsm reprimen el K1-T6SS a nivel traduccional y que su ausencia resulta en una cepa con mayor capacidad biocontroladora.

S2.5. Efecto de la aplicación de N inorgánico y *Trichoderma harzianum* sobre el microbioma de la raíz de plantas de trigo cultivadas en campo.

M. Illescas*, M. B. Rubio, E. Monte y R. Hermosa.

*Departamento de Microbiología y Genética. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca
E-mail: maria.illescas.94@gmail.com*

La aplicación de nitrógeno (N) químico en forma de fertilizantes es una práctica agronómica muy común en nuestro país para aumentar el rendimiento de los cultivos, pero las plantas utilizan solamente un 30-40% del N aplicado, perdiéndose el resto con impactos muy negativos para el medio ambiente. *Trichoderma* es un género de ascomicetos ubicuo en muchos ecosistemas y que incluye especies utilizadas como agentes de biocontrol en agricultura. Además, algunas cepas han demostrado su capacidad para causar efectos positivos en las plantas. El objetivo de este trabajo fue explorar cómo la fertilización con N y la aplicación de *Trichoderma* afectan a la composición de las comunidades microbianas de la raíz de trigo. Para ello, se utilizó secuenciación Illumina y muestras de suelo no rizosférico, rizosfera y endosfera de raíz de plantas de trigo, que se obtuvieron de un ensayo de campo que incluyó los siguientes tratamientos: 1) control, 2) fertilización nitrogenada de cobertera, 3) aplicación de *T. harzianum* (T34) y 4) la combinación de ambas. Se detectaron diferencias en riqueza y diversidad microbiana entre compartimentos para bacterias y hongos, con una disminución gradual de géneros desde suelo no rizosférico hasta endosfera de la raíz. Los phyla más abundantes fueron Proteobacteria y Actinobacteria en el caso de bacterias, y Ascomycota y Basidiomycota en el de hongos. La mayoría de las diferencias en abundancia microbiana se encontraron en muestras de suelo no rizosférico. Además, se observó un enriquecimiento en géneros como *Kaistobacter*, *Mortierella* y *Solicoccozyma* en suelo no rizosférico, *Olpidium* en rizosfera, y *Janthinobacterium* y *Pedobacter* en endosfera de raíz, todos ellos asociados previamente a suelos con abuso de fertilizantes químicos. Dentro de cada compartimento, se observaron asociaciones entre los tratamientos ensayados y algunos taxones de bacterias y hongos. Por ejemplo, cualquiera de los tres tratamientos redujo los niveles de *Claroideoglomus* en suelo no rizosférico, respecto al control, pero la aplicación de T34 aumentó los niveles de esta micorriza en la rizosfera de las plantas de trigo.

Agradecimientos: Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (proyecto RTI2018-099986-B-I00) y Junta de Castilla y León por el FEDER (proyecto Escalera de Excelencia CLU-2018-04 y beca predoctoral de María Illescas).

S2.6. Biocontrol de hongos fitopatógenos postcosecha mediado por compuestos volátiles bacterianos

**L. Toral^{1*}, Miguel Rodríguez^{2,3}, A. Montañó⁴, A. Cortés-Delgado⁴,
I. Llamas^{2,3}, V. Béjar^{2,3}, I. Sampedro^{2,3}**

¹Xtrem Biotech S.L., European Business Innovation Center, Granada

²Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada

³Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Granada

⁴Dpto. de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa, Sevilla

E-mail: isampedro@ugr.es

El uso extensivo de fertilizantes químicos en la producción agrícola, incluso durante el almacenamiento postcosecha, supone un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Entre las causas responsables de las pérdidas postcosecha se estima que las infecciones por hongos patógenos representan aproximadamente el 20-25% de la pudrición postcosecha de frutas y hortalizas contribuyendo significativamente a un deterioro de la calidad y composición en nutrientes. Las principales especies fúngicas descritas asociadas a estas pérdidas son: *Alternaria alternata*, los patógenos necrotróficos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea*, diferentes especies del género *Fusarium*, y el género *Monilinia*, principal hongo que causa infección en frutas con hueso. En la actualidad, uno de los grandes retos de la agricultura sostenible para combatir las pérdidas asociadas a estas especies fúngicas, es el desarrollo de alternativas que respeten el medio ambiente y preserven la sanidad de la población. En la última década y en la búsqueda de una naturaleza *eco-friendly*, se ha incrementado el empleo de cepas bacterianas como mecanismo de control biológico. Entre la variedad de vías en las que puede ocurrir la inhibición fúngica por bacterias, podemos destacar la producción de metabolitos secundarios tales como compuestos orgánicos volátiles (COVs).

El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad de COVs producidos por bacterias aisladas de ambientes extremos pertenecientes a los géneros *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Psychrobacillus* y *Bacillus* y evaluar la actividad antifúngica de dichos compuestos frente a diferentes fitopatógenos postcosecha. Se pudo comprobar la relevancia de los COVs como principales metabolitos relacionados con la actividad antifúngica de las cepas de estudio. Los COVs producidos por las bacterias *Bacillus atrophaeus* L193 y *B. velezensis* XT1 mostraron la mayor diversidad de actividad antifúngica. El mayor porcentaje de inhibición fúngica se detectó en la exposición del patógeno necrotrófico *S. sclerotiorum* a los COVs producidos por *B. velezensis* XT1 con un porcentaje de reducción fúngica del 96%. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las bacterias de estudio fue efectiva frente a todos los hongos fitopatógenos incluidos en este estudio. El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los COVs de las bacterias de estudio mostró la presencia de 34 compuestos mayoritarios, destacando de entre ellos la alta producción de acetoina y 2-3 butanodiol por las bacterias con mayor actividad antifúngica, L193 y XT1. Por otro lado, el análisis mediante microscopía TEM reveló que dichos compuestos producen importantes alteraciones en la morfología de los hongos fitopatógenos, provocando alteraciones y destrucción celular en las hifas. Estudios llevados a cabo en cerezas demostraron la eficacia de estos metabolitos secundarios frente a la infección causada por *B. cinerea*, *M. laxa* y *M. fructicola* con un porcentaje de reducción de la enfermedad de 85, 66 y 50%, respectivamente en el tratamiento con XT1 y de 100, 83 y 0% en el tratamiento con L193.

S2.7. Análisis del efecto de Fg-AFP y Ltd-I sobre el crecimiento y toxogénesis de hongos del género *Fusarium* con impacto en agroalimentación

J. Iribarren^{*1}, J. Gil-Serna², A. Martínez del Pozo³, B. Patiño²

¹ Dpto. de Microbiología y Genética, Edif. Departamental, Universidad de Salamanca)

² Dpto. de Genética, Fisiología y Microbiología, Fac. de CC. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid)

³ Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid)
E-mail: jorgeiri@usal.es

La colonización de cultivos de cereales por hongos productores de toxinas como *Fusarium* spp. o *Aspergillus* spp. genera grandes pérdidas económicas, tiene efectos negativos sobre la salud y podría aumentar su incidencia en el contexto de cambio climático. Aun teniendo en cuenta las consecuencias de este problema, es difícil encontrar métodos eficaces que impidan la producción de micotoxinas por parte de estos hongos y, además, una vez las micotoxinas están presentes en los alimentos son muy difíciles de eliminar. Es por esto que el método más eficiente hasta el momento para reducir el contenido en micotoxinas de los alimentos es evitar la aparición de hongos tóxicos o el proceso de toxogénesis.

En este estudio fueron enfrentados hongos comunes en cultivos con fines alimentarios con distintas moléculas que podrían limitar su crecimiento o su capacidad de producción de toxinas, concretamente dos proteínas de diferentes orígenes. La primera de ellas es *Fusarium graminearum* Antifungal Protein (Fg-AFP), producida por la especie *Fusarium graminearum* para competir con otros hongos por recursos esenciales mediante la inhibición del crecimiento de varias especies. La segunda es *Latrodectin I* (Ltd-I), una proteína que proviene del veneno de la araña *Latrodectus hesperus* y de la que no se conoce la función con seguridad por falta de estudios, pues ha sido purificada correctamente hace poco tiempo. Fueron utilizadas 6 cepas del género *Fusarium*, enfrentándolas con distintas concentraciones de las proteínas purificadas (7 µg/µL, 3,5 µg/µL, 1,4 µg/µL y 0,7 µg/µL) en agar Czapek, e incubándolas después a 25°C. Fue posible apreciar halos de inhibición del crecimiento a distintas concentraciones en 5 de las cepas enfrentadas con Fg-AFP, siendo estos halos mayores a concentraciones más altas de proteína. En los enfrentamientos realizados con Ltd-I no fue posible observar efecto alguno sobre el crecimiento, pero sí fue posible observar claros aumentos de la esporulación en 4 cepas, siendo esto un posible indicador de estrés. Para los estudios posteriores fueron seleccionadas 2 especies: *Fusarium proliferatum* y *F. verticilloides*. Éstas fueron cultivadas en el mismo medio, esta vez suplementado con 100 µL de proteína en superficie a concentración de 1,5 µg/µL. Los porcentajes de reducción del crecimiento observados fueron del 71,1% y 83,2%, respectivamente, en presencia de Fg-AFP, sin ser observable ningún grado de inhibición con la proteína Ltd-I. La expresión del gen *fum-1* en *F. proliferatum* y *F. verticilloides*, la cual fue evaluada por RT-PCR a tiempo real, no varió mediante la exposición a las proteínas.

Es posible afirmar que las proteínas estudiadas tienen potencial como limitadores del crecimiento, no obstante, es necesario analizar en profundidad diferentes dosis para estudiar los efectos sobre la producción de toxinas.

S2.8. Búsqueda y caracterización de virus bacteriófagos frente a *Xylella fastidiosa*.

M.L. Domingo-Calap^{*1}, C.M. Aure², I. Navarro-Herrero², P. Domingo-Calap³, E. Marco-Noales².

¹Tragsa, Empresa de Transformación Agraria, Delegación de Valencia, España.

²Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). España.

³ Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, I2SysBio, Universitat de València-CSIC. España

E-mail: mdomingo@tragsa.es

Xylella fastidiosa es una bacteria Gram-negativa de la familia *Xanthomonadaceae* que habita el xilema de la planta hospedadora, donde se multiplica y puede llegar a obstruir el flujo de savia bruta, pudiendo llegar a provocar la muerte de la planta. Tiene un modo de vida dual, ya que también habita en el tracto digestivo anterior de insectos chupadores de xilema que actúan como vectores. Afecta a un elevado número de especies vegetales, muchas de ellas de gran interés agrícola y medioambiental. De hecho, está considerada como una de las quince bacterias de cuarentena de mayor interés fitopatológico en la Unión Europea. Las medidas de control actuales implican el uso de productos químicos tradicionales frente a los insectos vectores, así como la erradicación de las plantas infectadas, pero son insuficientes, por lo que existe la necesidad de desarrollar otras estrategias. Este trabajo se centra, entre otras alternativas prometedoras de control eco-sostenible, en la búsqueda de bacteriófagos específicos de *X. fastidiosa*. Debido a la dificultad inherente al cultivo de esta bacteria en medios de laboratorio, hemos comenzado la búsqueda de bacteriófagos empleando cepas de especies próximas filogenéticamente, pertenecientes a *Xanthomonas* spp., que se cultivan con facilidad. Se han analizado muestras vegetales, de agua y de suelo procedentes de zonas con brotes activos de *X. fastidiosa* del foco de Baleares y Alicante, y aguas residuales de distintos puntos de la provincia de Valencia. Hasta el momento, se han aislado y amplificado un total de 14 bacteriófagos empleando una cepa de *X. arboricola* pv. *juglandis* (IVIA 1317-1a) y 8 con una cepa de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (CECT 914). Todos los fagos aislados proceden de aguas residuales. La actividad lítica de estos 22 bacteriófagos se ha ensayado frente a un total de 27 cepas de *Xanthomonas* spp., encontrándose diferencias en el rango de infección. Además, se están realizando ensayos en laboratorio para evaluar el efecto de los 22 bacteriófagos aislados frente a diferentes cepas de *X. fastidiosa*. Los resultados preliminares indican que algunos fagos son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de la bacteria en medio líquido. Actualmente se están caracterizando los 22 fagos fenotípica y genómicamente y se compararán con fagos descritos previamente.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto XF-ACTORS (*Xylella fastidiosa* Active Containment Through a Multidisciplinary-Oriented Research Strategy, grant 727987 from the European Union's Horizon 2020 Framework Research Programme).

SESIÓN 3.

MICROORGANISMOS ENDOSIMBIÓTICOS Y ENDÓFITOS

S3.1. Un análisis detallado del regulón *nod* de *Sinorhizobium fredii* HH103.

F. Fuentes-Romero*, P. Navarro-Gómez, I. Jiménez-Guerrero, S. Acosta-Jurado, C. Alias-Villegas, P. Ayala-García, C. Medina-Morillas, J. E. Ruiz-Sainz, J. M. Vinardell.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla
E-mail: jvinar@us.es

Antecedentes:

Los rizobios son un grupo de proteobacterias del suelo capaces de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con las leguminosas. Los rizobios infectan las raíces de estas plantas e inducen la formación de nuevos órganos llamados nódulos, que colonizan intracelularmente. Dentro de las células del nódulo, los rizobios se diferencian a bacteroides capaces de fijar N₂ y suministrar nitrógeno combinado a la planta, recibiendo a cambio compuestos orgánicos que le sirven de fuente de energía y C. El establecimiento de esta interacción requiere un complejo diálogo molecular entre ambos simbioses, que comienza con la exudación de flavonoides por parte de la planta. Estos activan al regulador transcripcional NodD bacteriano, perteneciente a la familia LysR, que es el principal regulador positivo de un grupo de genes bacterianos relacionados con la simbiosis y que conforman el llamado regulón *nod*, responsable de, entre otros procesos, la producción de señales moleculares bacterianas implicadas en la interacción. La modulación de la expresión de estos genes es compleja y en ella pueden participar varias copias de NodD, así como otros reguladores transcripcionales, positivos y/o negativos.

El objetivo de este trabajo es determinar el papel de los diversos reguladores transcripcionales que participan en la modulación de la expresión del regulón *nod* de *Sinorhizobium fredii* HH103, un rizobio capaz de nodular un amplio número de leguminosas. Para ello, se han realizado estudios transcriptómicos y de qPCR para analizar el efecto de flavonoides inductores sobre la expresión de los diversos genes del regulón *nod* tanto en la estirpe silvestre como en mutantes individuales afectados en cada uno de los reguladores implicados: NodD1 (regulador principal), NodD2, SyrM, TtsI y NolR (reguladores secundarios). Además, para estudiar las relaciones entre los diversos reguladores, se ha generado una batería de mutantes dobles en los que un regulador se ha mutado con un casete que contiene el gen *lacZ* (lo que permite estudiar su expresión mediante ensayos de actividad β -galactosidasa) y otro regulador se ha deletado o mutado con un interposón. Dado que se postula que NodD actúa en forma dimérica, estamos realizando estudios de doble híbrido para analizar si NodD1, NodD2 y SyrM (también perteneciente a la familia LysR) pudieran formar homodímeros así como diversos heterodímeros.

Por último, hemos comprobado que la inactivación de cada uno de los reguladores secundarios (NodD2, SyrM, TtsI) afecta negativamente a la simbiosis con soja, un hospedador natural de *S. fredii*, pero extiende el rango de nodulación a *Lotus japonicus*. Estos resultados sugieren que la compleja red reguladora de los genes simbióticos de *S. fredii* HH103 está destinada a optimizar la nodulación con su hospedador natural, aún a costa de perder la capacidad de establecer simbiosis con otras leguminosas.

Este trabajo está siendo financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos BIO2016-78409R y PID2019-107634RB-I00)

S3.2. Análisis funcional de proteínas de respuesta a estrés (sHsp) en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

L. Domingo-Serrano^{1*}, M. Albareda^{1,2}, C. Sanchis¹, C. Alejandre¹, J.M. Palacios^{1,2}.

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP UPM-INIA), ²Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid.

[*lucia.domingo.serrano@upm.es](mailto:lucia.domingo.serrano@upm.es)

Los rizobios son bacterias Gram-negativas que establecen simbiosis con leguminosas, induciendo nódulos en sus raíces donde se diferencian a bacteroides. Estas formas simbióticas fijan el nitrógeno atmosférico que es asimilado por las leguminosas a cambio de compuestos carbonados. La fijación biológica de nitrógeno no es solo interesante desde el punto de vista biológico, sino también en el marco de una agricultura sostenible, contribuyendo a la reducción del uso de fertilizantes nitrogenados.

Las leguminosas del grupo IRLC (del inglés, Inverted Repeat-Lacking Clade), en el que se incluyen leguminosas de gran interés agronómico como el guisante o la lenteja, forman nódulos indeterminados en los que la diferenciación de los bacteroides es terminal y está inducida por la acción de una familia de péptidos antimicrobianos (NCR) producidos por la planta, y que se expresan en el nódulo. Cada especie de leguminosa produce una mezcla diferente de NCRs, los cuales son elicitores de genes que responden a condiciones de estrés en los rizobios, jugando, además, un papel en el establecimiento selectivo de una simbiosis estable. Estudios previos de proteómica comparativa entre bacteroides inducidos por la cepa UPM791 de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae (*Rlv*) en plantas de guisante (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) pusieron de manifiesto la existencia de alrededor de 100 proteínas que se expresan de manera diferencial en función de la leguminosa hospedadora. Entre ellas se identificaron proteínas de respuesta a estrés del tipo sHsp (del inglés, *small Heat Shock Protein*), un grupo de proteínas chaperonas que estabilizan otras proteínas parcialmente desnaturalizadas por distintos tipos de estrés.

El objetivo de este trabajo es estudiar el papel de dos sHsp, sHsp_252 y sHsp_851, sobreexpresadas en simbiosis de *Rlv* UPM791 con guisante y en lenteja respectivamente. Los resultados han mostrado que las proteínas sHsp_252 y sHsp_851 se requieren para obtener máximos niveles de fijación de nitrógeno en plantas de guisante y lenteja, respectivamente. Por otro lado, el alineamiento de secuencias de sHsp_252 y sHsp_851 con otras sHsp de *Rlv* 3841 y *R. leguminosarum* bv. trifolii ha puesto de manifiesto que están incluidas en las clases B y A, respectivamente, de las sHps de la bacteria endosimbiótica *Bradyrhizobium japonicum*, sugiriendo que ambas proteínas podrían realizar funciones diferentes. Por otro lado, el análisis de la regulación de la expresión del gen *sHsp_252* mediante fusión transcripcional de su promotor al gen *lacZ* ha mostrado que este promotor se induce bajo condiciones de microaerobiosis y en bacteroides de guisante y lenteja. Este promotor contiene una caja anaeróbica y no se induce en un doble mutante *fnrN1 fnrN2*. Mediante experimentos de inducción controlada de la proteína se ha observado que sHsp_252 ejerce un efecto protector sobre la viabilidad de las células cuando son sometidas simultáneamente a un estrés oxidativo (1mM H₂O₂) y térmico (43°C). Estudios de copurificación mediante cromatografía de afinidad permitirán identificar las proteínas sustrato de estas proteínas sHsp.

S3.3. OnfD, un regulador transcripcional de tipo AraC de *Rhizobium tropici* CIAT 899 implicado en la síntesis de factores de nodulación y en simbiosis

P. Ayala-García*, P. Del Cerro, P. Buzón, R. Castells-Graells, F.J. López-Baena, F.J. Ollero, F. Pérez-Montaña

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla

E-mail: payala@us.es

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 bacteriana NodD, que lleva a cabo la inducción de la expresión de los genes de nodulación (*nod*) en el rizobio. Estos genes *nod* son los encargados de la síntesis y secreción de factores de nodulación (FN), originando la formación de estructuras especializadas en la planta conocidas como nódulos, donde tiene lugar la fijación biológica de nitrógeno.

Rhizobium tropici CIAT 899 es un rizobio capaz de establecer simbiosis con un amplio rango de hospedadores, entre ellos *Phaseolus vulgaris*, *Lotus burttii* y *Lotus japonicus*. Se caracteriza por presentar en su genoma cinco copias diferentes del gen *nodD*, llevando a cabo la síntesis de FN en presencia del flavonoide inductor apigenina y bajo condiciones de estrés osmótico, mediante las proteínas NodD1 y NodD2, respectivamente. Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto por el cuál la proteína NodD2 lleva a cabo la activación de los genes de nodulación en presencia de estrés osmótico.

Por este motivo, en este trabajo decidimos estudiar el papel de OnfD, un nuevo regulador transcripcional de la familia AraC situado aguas abajo del gen *nodD2*. La construcción del mutante por delección del gen *onfD* junto a estudios de ARNseq y ensayos de tipo β -galactosidasa nos permitió averiguar que este factor de transcripción es esencial, junto con NodD2, para la activación de los genes *nod* en presencia de estrés osmótico. De hecho, mediante análisis por cromatografía en capa fina se determinó que ambos reguladores, OnfD y NodD2, son cruciales para la síntesis y exportación de los FN bajo condiciones de estrés osmótico. Asimismo, los ensayos de nodulación llevados a cabo mostraron que OnfD es un factor transcripcional importante a la hora de establecer una simbiosis exitosa con sus leguminosas hospedadoras. Además, mediante ensayos de doble híbrido, se demostró que OnfD y NodD2 forman homodímeros y que OnfD / NodD2 pueden formar heterodímeros, que estarían involucrados en la producción de los FN en condiciones de estrés osmótico.

S3.4. Uso de rizobios para la conservación de una especie de leguminosa clave en el ecosistema de alta montaña canario.

L. Pulido-Suárez*, A.M González-Rodríguez, J. Cubas, M. del Arco Aguilar, J. Martín-Esquivel, M. León-Barrios

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética, área de Microbiología. Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife. España.

Email: slaurama@ull.edu.es

La Retama del Teide, *Spartocytisus supranubius*, es una especie endémica de Tenerife y La Palma (Islas Canarias, España), y la leguminosa dominante del ecosistema de alta montaña canaria en el Parque Nacional (P.N) del Teide. Sin embargo, estreses bióticos y abióticos están provocando el deterioro y retroceso de las poblaciones de esta leguminosa. En este ecosistema, la principal entrada de nitrógeno es la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por medio de la simbiosis retama-bradyrizobio. Por tanto, el retroceso de sus poblaciones y la consiguiente reducción de la FBN podrían llegar a comprometer el mantenimiento del ecosistema. Los inoculantes de rizobios han sido utilizados amplia y exitosamente en el cultivo de leguminosas con fines agronómicos. Sin embargo, en pocas ocasiones se ha empleado estos inoculantes para la conservación de especies de leguminosas en ecosistemas naturales. En este trabajo, se estudió el efecto de la inoculación con tres cepas de *Bradyrhizobium* sp. sobre plántulas de retama del Teide creciendo en invernadero y en individuos juveniles de 2 años trasplantados en campo en el P.N. Se estudiaron parámetros simbióticos y de crecimiento para evaluar el efecto de la inoculación con los rizobios. Los resultados mostraron que, en comparación con los controles (sin inocular), las retamas inoculadas con dos de las cepas presentaron una biomasa y tamaño (biovolumen) superiores, tanto en condiciones de invernadero como en campo. El número y peso de los nódulos también fue mayor, si bien los contenidos de nitrógeno fueron similares. Asimismo, se observó un efecto positivo de la inoculación en la tasa de supervivencia. Al promover el crecimiento y desarrollo de las retamas, la inoculación con rizobios produce plantas más grandes y robustas, capaces de afrontar mejor los estreses abióticos en campo. Por tanto, el uso de inoculantes de rizobios es una estrategia que podría integrarse en las campañas de conservación de esta leguminosa amenazada.

S3.5. El viaje de una actinobacteria filamentosa endofítica desde las raíces hasta las hojas

P. Benito*, M. Ortuzar y M. E. Trujillo

Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, Salamanca. E-mail: patriciabs@usal.es

El género *Micromonospora* ha sido descrito como una bacteria endofítica capaz de colonizar nódulos fijadores de nitrógeno tanto de leguminosas como de plantas actinorrícicas (cita). Recientemente se demostró que *Micromonospora* es capaz de colonizar los tejidos internos de los nódulos en co-inoculación con la bacteria fijadora de nitrógeno utilizando como plantas modelo las leguminosas *Medicago sativa* y *Trifolium repens* (Benito et al., 2017). Sin embargo, se dispone de poca información sobre su presencia en otros tejidos vegetales. En este trabajo se analizaron diferentes tejidos de plantas silvestres de *Lupinus angustifolius* y *Pisum sativum*, que evidenciaron la alta abundancia de cepas de este género, no solo en nódulos sino en otros tejidos como las hojas. Estas cepas mostraron una gran capacidad de producir diferentes enzimas degradadoras de polímeros vegetales. De las enzimas evaluadas, el 100% de los aislados mostraron actividad xilanolítica, mientras que el 99% presentaba actividad pectinolítica, el 98% actividad celulolítica y el 97% actividad amilolítica. En el caso de las quitinasas solo el 93% mostró resultados positivos en la producción de esta enzima. Este conjunto de enzimas pueden ser utilizadas por *Micromonospora* para colonizar los tejidos internos de la planta. Para evaluar la capacidad de *Micromonospora* de colonizar las hojas, se inoculó la cepa *M. lupini* (ML01) marcada con GFP (Benito et al., 2017) en las raíces de plántulas axénicas de *Pisum sativum*. Los tejidos de las hojas se monitorizaron mediante microscopía óptica y de fluorescencia durante 30 días. La primera evidencia de la presencia de *Micromonospora* en los tejidos foliares se observó a 11 dpi, cuando se detectó una fluorescencia verde dentro de los estomas de las hojas. Sin embargo, las células de *Micromonospora* no fueron completamente visibles en las estomas hasta los 16 dpi. A partir de los 24 dpi, *Micromonospora* no solo fue visible en los estomas sino también en sus células circundantes. Además, se detectó ADN de *Micromonospora* en las hojas utilizando cebadores específicos para el gen *gyrB*, lo que confirmó su presencia no solo en las hojas, sino también en los otros tejidos evaluados (raíces, nódulos y tallos) cuando la cepa fue co-inoculada junto con la bacteria fijadora de nitrógeno. En el caso de plantas únicamente inoculadas con *Micromonospora* no se obtuvo amplicón en ninguno de los tejidos evaluados, lo que sugiere que o la presencia de un rizobio o la formación de nódulos son obligatorios para la translocación interna de este microorganismo. Sin embargo, experimentos adicionales son necesarios para confirmar si *Micromonospora* solo se puede distribuir a los diferentes tejidos vegetales si está acompañada de la presencia de un rizobio.

Referencias

- Trujillo, M. E., Riesco, R., Benito, P., and Carro, L. (2015). Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Front. Microbiol.* 6,1341.
- Benito, P., Alonso-Vega, P., Aguado, C., Luján, R., Anzai, Y., Hirsch, A. M., and Trujillo, M. E. (2017). Monitoring the colonization and infection of legume nodules by *Micromonospora* in co-inoculation experiments with rhizobia. *Sci. Rep.* 7, 11051.

S3.6. Plant endophytes are resistance tools for the abiotic stress

N. González-Benítez*, I. Martín, I. Cuesta, M. Méndez, M. Arrayás, Carmen Molina.

*Department of Biology, Geology, Physics and Inorganic Chemistry. ESCET-URJC.
28933-Madrid. Spain*

E-mail: natalia.gonzalez@urjc.es

Endophytes are microorganisms symbiotically associated with plants, located in the vegetal tissues providing a multitude of niches, either outside or inside cells. This microorganisms coexist with plants having an important role in promoting the productivity and improving the tolerance to environmental stress. However, this last concept has yet to be conclusively demonstrated, such as the As stress. The present work has studied the role of the horizontal (bioaugmentation) and vertical transmission (maternal inheritance from seeds) of endophytes in two *Jasione* species to the resilience against abiotic stress such as As. *Jasione montana* is a plant tolerant to arsenic (As) and *J. sessiliflora* has not been previously described in areas with As or As tolerant but is phylogenetically close to *J. montana*. All experiments were conducted under sterile conditions avoiding any horizontal transfer of bacteria with the exception of the controlled colonization by *Rhodococcus rhodochrous*. This bacterium possesses important traits to be considered for the horizontal transfer (bioaugmentation) such as efficient colonization capacity, As tolerance and promoting plant growth. The through high-throughput sequencing showed the structure and diversity of the endophytic bacterial communities within *J. montana* and *J. sessiliflora*. This study reveals that a substantial proportion of seed microbes were able to colonize the plant rhizosphere showing a conserved “core endomicrobiota” composed by genera *Pseudomonas* spp, *Ralstonia* spp, *Unidibacterium* spp, *Cutibacterium* spp, *Kocuria* spp and *Comamonadaceae* across different environmental conditions. All these OTUs were coexisting from seeds state to the development of the plant, independently of the arsenic stress, bioaugmentation treatment and type of *Jasione* species.

S3.7. Respuesta de *Serendipita indica* a la deficiencia de K^+ en condiciones de vida libre y durante la simbiosis con *Arabidopsis thaliana*

L. B. Conchillo*, R. Haro, B. Benito

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Campus Montegancedo 28223-Pozuelo de Alarcón (Madrid), Spain
E-mail: begona.benito@upm.es

Serendipita indica es un hongo endófito capaz de colonizar gran variedad de plantas, produciendo en ellas una mejoría en el crecimiento incluso en condiciones adversas, como son las condiciones salinas (Lanza *et al.*, 2019. *Environ Microbiol*, 21) o bajo la deficiencia de fosfato (Yadav *et al.*, 2010. *J Biol Chem*, 285). En este trabajo, hemos abordado por primera vez el estudio del efecto de la deficiencia de otro macronutriente esencial, el potasio, tanto sobre el crecimiento del hongo en condiciones de vida libre como en el crecimiento del hongo y de la planta durante la simbiosis con *Arabidopsis thaliana*.

En condiciones de vida libre, *S. indica* es capaz de crecer en medios con una gran variedad de concentraciones de K^+ , desde concentraciones tan bajas como 50 μM KCl hasta concentraciones de hasta 100mM KCl, a partir de la cual, curiosamente, se inhibe su crecimiento.

Para averiguar cuál/es son los transportadores del hongo implicados en la captación de K^+ , hemos clonado y caracterizado los transportadores SiHAK1, SiTRK1, SiTRK2 y el canal SiTOK1. La expresión heteróloga de estos genes en mutantes levaduras defectivos en sus transportadores endógenos de K^+ , mostró que SiHAK1 es un transportador de entrada de K^+ de alta afinidad (K_m de 180 μM), que restaura la capacidad de las levaduras mutantes de crecer a 50 μM KCl, mientras que SiTRK2 es un transportador de baja afinidad que complementa el crecimiento del mutante a 500 μM KCl.

El análisis de expresión de estos transportadores de K^+ mediante RT-qPCR mostró que, en condiciones de vida libre, *SiHAK1* se induce en condiciones de ayuno de potasio, mientras que la expresión de *SiTRK1*, *SiTRK2* y *SiTOK1* es constitutiva, siendo *SiTRK1* el gen que más se expresa en todas las condiciones de K^+ ensayadas.

En ensayos de simbiosis entre *Arabidopsis* y *Serendipita* durante el ayuno de K^+ se observó que el hongo produce el engrosamiento de las raíces colonizadas y un mayor número de raíces laterales, pero curiosamente no mejora el crecimiento ni aumenta el contenido interno de K^+ de la planta; ni en la asociación con *Col-0* ni con plantas mutantes *hak5*, *akt1* que carecen de los principales transportadores de K^+ y son más sensibles al ayuno de este nutriente. Sin embargo, resultados preliminares de microscopía confocal empleando una cepa de *Serendipita* que expresa constitutivamente GFP, muestran que el ayuno de K^+ favorece la colonización de la raíz, observándose el crecimiento del hongo preferencialmente alrededor de las raíces en lugar de desarrollarse por toda la superficie de la placa, como ocurre en condiciones normales de potasio. Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo que ocurre en condiciones de deficiencia de P, la asociación simbiótica no parece aportar ningún efecto beneficioso a la planta en condiciones limitantes de K^+ si bien si beneficiaría al hongo, probablemente asegurándole el K^+ que éste necesita para crecer.

S3.8. Efectos beneficiosos de hongos endófitos filamentosos radicales de *Brassica oleracea* var. *acephala* (berza): primer estudio sobre *B. oleracea*

J. Poveda^{*1}, I. Zabalgogezcoa², P. Soengas¹, V. M. Rodríguez¹, M. E. Cartea¹, R. Abilleira¹, P. Velasco¹

¹Misión Biológica de Galicia (CSIC), Pontevedra, Spain. ²Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (CSIC), Salamanca, Spain.

**E-mail: jpoveda@mbg.csic.es*

La berza o kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) es una hortaliza crucífera ampliamente cultivada por sus hojas y sus botones florales en la Europa atlántica y en el área mediterránea. Kale es un alimento de gran interés actual en el mercado por la presencia en sus tejidos de componentes nutricionales de alto valor añadido, siendo conocido como un superalimento. Hasta el momento existen pocos estudios realizados con respecto a la diversidad de hongos endófitos en raíces de plantas del género *Brassica*, no existiendo con anterioridad ningún estudio dentro de la especie *B. oleracea* ni ninguna de sus distintas variedades. En el presente trabajo hemos estudiado la diversidad de hongos endófitos filamentosos cultivables presentes en raíces de seis cultivares locales diferentes de berza gallega. Junto con ello, hemos determinado si la presencia radicular de alguno de estos hongos identificados es beneficiosa para las plantas de berza en términos de promoción del crecimiento vegetal, tolerancia a estreses abióticos como el frío o inducción de resistencia sistémica frente a patógenos, como *Xanthomonas campestris*, y plagas, como *Mamestra brassicae*. El conjunto de hongos identificados pertenecía a 33 taxones diferentes, de los cuales *Fusarium* sp. y Pleosporales sp. A, situado entre los géneros *Setophoma* y *Edenia* (llamado como *Setophoma/Edenia*), estaban presentes en los cinco cultivares locales utilizados, representando un posible core del microbioma de la berza gallega. Estos datos representan la primera vez que diferentes géneros fúngicos se han descrito como endófitos de *Brassica* con beneficios para su planta hospedadora. En este sentido, *Fusarium* sp. y Pleosporales sp. (cercano a *Pyrenophora*) son capaces de promover el crecimiento vegetal e incrementar la tolerancia a frío. Por otro lado, *Trichoderma* sp., Pleosporales sp. C (cercano a *Phialocephala*), *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Setophoma/Edenia* y *Acrocalymma* sp. fueron capaces de activar la resistencia sistémica vegetal contra *X. campestris* en infección foliar. Respuesta vegetal de defensa observada también contra el ataque foliar por *M. brassicae* en plantas colonizadas radicularmente por *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. y *Setophoma/Edenia*. Finalmente, destacar que la diversidad de hongos filamentosos endófitos radicales en berza es menor que la descrita para especies no pertenecientes a la familia Brassicaceae, siendo alguno de los hongos descritos patógenos de otros cultivos, pero endófitos beneficiosos para el cultivo de berza.

SESIÓN 4.

GENÓMICA Y METAGENÓMICA DE LA INTERACCIÓN PLANTA/MICROORGANISMO

S4.1. Estudio de la colonización bacteriana mediante técnicas de tipo Tn-seq.**M. Torres*¹, D. Faure², A. Deutschbauer¹.**¹*Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, United States.*²*Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France.**E-mail: martatorresbejar@lbl.gov*

Al fijar carbono, las plantas producen azúcares y aminoácidos que proporcionan un ambiente idóneo para la proliferación de microorganismos que residen en el suelo. Entre ellos hay patógenos pero también diversas bacterias beneficiosas que pueden influir de forma positiva en el crecimiento y desarrollo de las plantas. A pesar de la disponibilidad de datos sobre la diversidad funcional y filogenética de las bacterias asociadas a las plantas, los mecanismos moleculares que les permiten colonizar las plantas de manera efectiva siguen siendo poco conocidos.

El objetivo de nuestro estudio es identificar los genes microbianos que están involucrados en la colonización de las raíces de las plantas utilizando técnicas de ‘*transposon sequencing*’ (mutagénesis por transposón y secuenciación masiva de los sitios de inserción del transposón). En la última década se han desarrollado varias metodologías de este tipo, como por ejemplo Tn-seq, RB-Tn-seq, TraDIS, HITS, INSeq, etc., generalmente denominadas colectivamente como ‘*transposon sequencing*’ o ‘Tn-seq’. Brevemente, el primer paso es la construcción de una librería de mutantes por transposón (cada uno con un *barcode* diferente) y la secuenciación de dicha librería, el segundo paso es el crecimiento de la biblioteca en una condición dada (por ejemplo, en plantas) y la secuenciación de la librería tras el crecimiento en dicha condición, y el último paso es identificar la importancia de un gen comparando la abundancia de *barcodes* en una condición dada frente a la librería inicial. Hasta la fecha, las técnicas de Tn-seq han demostrado ser una herramienta muy útil para identificar genes involucrados en metabolismo, en la colonización de un hospedador, etc.

En este trabajo hemos utilizado un enfoque Tn-seq en el patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens* para identificar y comparar genes involucrados en la colonización de cuatro condiciones: tumores de agalla en dos plantas hospedadoras (tomate y álamo) y raíces de una planta hospedadora (tomate) y no hospedadora (maíz). Los datos obtenidos se han confirmado mediante la construcción de mutantes *knockout* y su evaluación en la colonización de los cuatro entornos vegetales en comparación con la cepa salvaje.

También estamos usando un enfoque RB-Tn-seq, que simplifica enormemente el procesamiento de muestras y aumenta el rendimiento en comparación con Tn-seq, para identificar genes de colonización de plantas en bacterias no patógenas de las clases Bacteroidetes y Proteobacteria.

Los resultados obtenidos permitirán comprender mejor la colonización de las plantas por diversas bacterias y, en el caso de los patógenos vegetales, establecerán las dianas para el desarrollo futuro de estrategias de biocontrol adaptadas.

S4.2. Genómica comparativa de plásmidos nativos de bacterias fitopatógenas.

M. Urriza^{1*}, G. Dimaria², M. Añorga¹, V. Catara² y J. Murillo¹.

¹IMAB, Universidad Pública de Navarra, Mutilva Baja, Navarra.

²Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, Università degli studi di Catania, Catania, Italia.

E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

Los plásmidos son los principales agentes que median la transferencia horizontal de genes entre procariotas. Además, muchas bacterias fitopatógenas contienen plásmidos nativos que portan genes que modulan la interacción con el huésped o que facilitan su supervivencia en los agroecosistemas. En este trabajo hemos abordado la caracterización de plásmidos de bacterias fitopatógenas completamente secuenciados y ya disponibles en bases de datos públicas. El tamaño es muy variable, tanto en conjunto (1.3 kb, en *Xanthomonas* y *Xylella*, hasta 2.2 Mb en *Ralstonia*) como intragenéricamente (3.3 a 972 kb en *P. syringae sensu lato*), así como el contenido en G+C (24.7 %, en *Phytoplasma*, a 70.2 %, en *Streptomyces*). Mediante genómica comparativa, hemos caracterizado más de 300 plásmidos pertenecientes a géneros de tres familias de relevancia (*Erwinia*, *Pantoea* y *Pectobacterium*, Enterobacteriaceae; *Pseudomonas*, Pseudomonadaceae, y *Xanthomonas* y *Xylella*, Xanthomonadaceae). Los genes de proteínas iniciadoras de la replicación (proteínas Rep), presentes en el 69 % de estos plásmidos, se reparten en 16 grupos de homología distintos, con 8-9 grupos en Enterobacteriaceae y Xanthomonadaceae y solo 4 en Pseudomonadaceae. Cuatro de los grupos Rep se han encontrado en al menos dos familias de bacterias, aunque con baja identidad. Esto sugiere que existe una amplia diversidad de replicones en bacterias fitopatógenas y que no hay un intercambio frecuente de plásmidos nativos entre distintas familias de bacterias. La fusión de plásmidos parece un fenómeno relativamente frecuente, ya que un 14 % del total de plásmidos contiene al menos dos replicones, cuya filogenia permite descartar la duplicación del replicón o errores de secuenciación. Esto podría contribuir a una mayor estabilidad del plásmido o a un incremento de su espectro de huésped. Se han identificado secuencias codificantes (CDSs) anotadas como efectores del sistema de secreción de tipo III en más de la mitad de plásmidos de Pseudomonadaceae y en más de un tercio de los de Xanthomonadaceae, pero no en Enterobacteriaceae. Un 23 % de los plásmidos de Pseudomonadaceae, pero solo un 10 % de los plásmidos de las otras dos familias, portan genes de resistencia a metales pesados (fundamentalmente cobre y arsénico). Igualmente, hemos identificado genes de resistencia a antibióticos, fundamentalmente estreptomycin, en un 7% (Enterobacteriaceae), 6 % (Pseudomonadaceae) y 2 % (Xanthomonadaceae) de los plásmidos analizados. Solo en torno al 68 % de los plásmidos analizados contienen al menos un tipo de secuencia de inserción, lo que contrasta con la idea generalizada de la ubicuidad de elementos transponibles en plásmidos nativos. La familia IS3 fue la más abundante en *Erwinia*, *Pantoea* y *Xanthomonas*, mientras que IS91 predominó en *Pseudomonas* e IS200 en *Xylella*. El análisis de la distribución de sistemas de secreción de tipo IV, todavía en marcha, ha identificado orígenes de transferencia conjugativa (*oriT*) en aproximadamente un tercio de los plásmidos de *Pseudomonas*. Además, las filogenias de los replicones y de las secuencias de *oriT* de estos plásmidos no son congruentes. Esto indica que la mayoría de los plásmidos de *Pseudomonas* no son potencialmente movilizables y que hay un intercambio muy dinámico de los elementos básicos del esqueleto (backbone) plasmídico.

S4.3. Two type VI Secretion Systems of *Pseudomonas fluorescens* F113 mediate bacterial killing and are important for rhizosphere microbiome adaption.

D. Vázquez-Arias^{1*}, D. Durán¹, E. Blanco-Romero¹, D. Garrido-Sanz¹, M. Redondo-Nieto¹, R. Rivilla¹, P. Bernal^{1,2} and M. Martín¹

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin, 2, 28049 Madrid, Spain.

² Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida de la Reina Mercedes, 6, 41012, Sevilla, Spain.

E-mail: david.vazqueza@estudiante.uam.es

The genome of *Pseudomonas fluorescens* F113, a model rhizobacterium considered a plant growth-promoting agent, encodes three putative types VI secretion systems (T6SSs); F1-, F2- and F3-T6SS. Bioinformatic analysis of F113 T6SSs has revealed that they belong to group 3, group 1.1 and group 4a respectively, similar to those previously described in *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, the *in silico* analyses allowed us to identify genes encoding a total of five orphan VgrG proteins and eight putative effectors (Tfe), some with their cognate immunity protein (Tfi) pairs; these genes are found in the proximity of *P. fluorescens* F113 *vgrG*, *hcp*, *eagR* and *tap* genes. RNA-Seq in culture and rhizosphere analysis has revealed that F1- and F3-T6SS are active systems, while F2-T6SS did not show any relevant expression under the tested conditions. The phenotypic analysis of structural mutants in the three T6SSs has shown that the active F1- and F3-T6SSs are involved in inter-bacterial competition. Moreover, *vgrG5a* and *tap5a* together with the *tfe8/tfi8* pair constitute a genetic cluster encoding an additional tip for F113 T6SSs, since mutations affecting *vgrG5a* or *tfe8* impair bacterial killing by F113. A rhizosphere competition analysis of a double mutant in F113 F1- and F3-T6SS clusters revealed the importance of these systems in the competence for rhizosphere colonization.

Este trabajo se ha financiado mediante el proyecto RTI2018-093991-B-I00.

S4.4. Estudio del pan-genoma de *Pseudomonas* para descubrir funciones asociadas a la interacción con su hospedador

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

*Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental de Biología.
Universidad de Salamanca.
E-mail: zakisaati@usal.es*

Las interacciones bacteria-hospedador son de vital importancia para la salud del hospedador, entre las que se incluye la interacción entre bacterias y plantas. Sin embargo, la biología molecular subyacente a estas interacciones está lejos de ser completamente entendida. Por ejemplo, en el caso de las plantas y las bacterias, se han descrito muchos de los genes responsables de la interacción entre rizobios y leguminosas, pero no tantos de otros grupos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como las *Pseudomonas*. Así, en este estudio tratamos de desvelar la asociación entre genes de bacterias del género *Pseudomonas* y sus distintos hospedadores. Para ello, hemos realizado un proceso de genómica comparativa con genomas no redundantes de cepas de *Pseudomonas* aisladas de distintos nichos ecológicos u hospedadores, incluidas las plantas. Comenzamos descargando >11.000 genomas de bases de datos públicas. Se eliminaron genomas redundantes, genomas demasiado distantes filogenéticamente del género y también genomas de baja calidad. Finalmente se utilizaron 3.274 genomas para el proceso de genómica comparativa. A través de este análisis hemos descubierto proteínas y funciones que podrían ser de relevancia para las distintas interacciones llevadas a cabo entre *Pseudomonas* y sus hospedadores.

En el caso de las plantas, una de las proteínas asociadas con la interacción entre *Pseudomonas* y su planta hospedadora es una hidrolasa de membrana no estudiada hasta el momento en las interacciones bacteria-planta. Con el objetivo de averiguar si el gen que codifica para esta enzima está sobreexpresado en la interacción, hemos llevado a cabo un análisis transcriptómico entre la cepa PGP *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 y su hospedador, *Brassica napus*, a partir de RNA de células bacterianas colonizando la raíz. Tras comprobar que está sobreexpresado en la interacción, hemos realizado un mutante *knock-out* de este gen y hemos estudiado su fenotipo en la planta, comprobando que la delección del gen conlleva una reducción de la capacidad de la bacteria para promover el desarrollo de *B. napus*.

S4.5. Caracterización metagenómica y culturómica de las poblaciones bacterianas asociadas a *Vaccinium myrtillus* en Portugal

J.D. Flores Félix*; L. R. Silva; G. Alves

CICS-UBI–Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal. E-mail: jdflores@usal.es

La distribución salvaje del género *Vaccinium* está limitada en Portugal continental por las altas precipitaciones, las bajas temperaturas y los suelos ácidos, estableciéndose su área de distribución a la mitad norte, encontrando sus límites ecológicos al sur en la Serra da Estrela, siendo más común en las regiones del norte de Portugal como Peneda-Gerês. En estas sierras se pueden encontrar dos especies de este género, *V. uliginosus* y *V. myrtillus*. La presencia de la primera es considerada un relicto glaciar y se limita a algunas matas en las cumbres de Serra da Estrela, mientras que la segunda es más abundante y tiene una distribución más amplia. Sin embargo, sus poblaciones se han visto muy afectadas por incendios forestales que están promoviendo una reducción y fragmentación de su hábitat. A este respecto, el actual escenario de cambio climático, con una previsión de aumento de las temperaturas y reducción de las precipitaciones puede reducir notablemente la distribución de este género en Portugal. El objetivo de este trabajo es estudiar las poblaciones rizosféricas y endofíticas del arándano silvestre en tres localidades del territorio continental de Portugal (Serra da Estrela, Serra do Marão y Serra do Alvão) con el objetivo de estudiar las implicaciones ecológicas que pudiera tener el cambio climático y su aplicación en estrategias de reintroducción.

En primer lugar, se llevó a cabo la secuenciación metagenómica de las poblaciones bacterianas de la rizosfera y endofíticas de la raíz de arándano en las tres localizaciones indicadas, observándose un dominio de Proteobacteria y Acidobacteria en las poblaciones rizosféricas y de Actinobacteria en las endofíticas. También se observó que las poblaciones de Serra da Estrela presentaban una menor diversidad alfa. El análisis de la diversidad beta mostraba que, aunque existía una considerable divergencia entre las poblaciones rizosféricas, las poblaciones endofíticas de la raíz presentaban una elevada similitud. En segundo lugar, se realizó el estudio culturómico de estas mismas poblaciones aislando un total de 318 cepas. Se analizó la diversidad infraespecífica mediante la técnica M13-RAPD mostrando un elevado número de cepas individuales, indicando una alta diversidad. A continuación, se llevó a cabo la caracterización mediante MALDI-TOF. De esta manera, un 64% de los aislados fue identificado al menos a nivel de género completando su identificación mediante secuenciación del 16S. Se identificaron cepas dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Rhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Achromobacter*, *Streptomyces* o *Bacillus* entre otros. A su vez, la mayoría de los aislados presentaron capacidad para crecer a pH de 5,5, condiciones de salinidad de hasta el 2% y un carácter mesófilo psicrorresistente. Con respecto a sus cualidades para interactuar positivamente con las plantas la mayoría de los aislados eran capaces de solubilizar fosfato bicálcico y tan sólo un 17% de los aislados producían sideróforos. Es análisis nos ha mostrado como *V. myrtillus* es capaz de modular sus poblaciones y además, estas pueden presentar características para el diseño de estrategias para afianzar poblaciones salvajes asegurando la permanencia de esta especie en el país luso.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 101003373.

S4.6. Estudio comparativo de las comunidades microbianas rizosféricas de encina y olivo: efecto del manejo agrícola y tolerancia a verticilosis.

N. M. Wentzien*, A. J. Fernández-González, P. J. Villadas, A. Valverde-Corredor, A.V. Lasa, C. Gómez-Lama Cabanás, J. Mercado Blanco, M. Fernández-López.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, Spain.

E-mail: nuria.martin@eez.csic.es

La verticilosis del olivo, causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb, es considerada como una de las enfermedades más relevantes que afectan a un cultivo de tanta importancia como es el del olivo. Una de las principales técnicas de los agricultores frente a esta plaga es reemplazar los árboles enfermos por árboles de una variedad tolerante a dicha enfermedad: Frantoio. Sin embargo, aunque existen estudios que ahondan en aspectos transcriptómicos, histológicos y bioquímicos subyacentes a esta tolerancia, poco se sabe sobre la influencia del microbioma de la raíz, a pesar de que es bien conocido el papel que juega la especie vegetal, e incluso la variedad, en el ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a la planta. Más allá de esto, el manejo agrícola es un elemento de gran influencia en el desarrollo de la enfermedad y en la salud del árbol y el equilibrio del suelo en general. A pesar de esto, existen escasos estudios que indaguen sobre el efecto del manejo agrícola en comunidades microbianas asociadas a leñosas. Así, se plantearon dos comparaciones en este estudio: (i) Analizar la posible variación de las comunidades microbianas de suelo suelto y rizosférico de olivares en comparación a sistemas sin manejo agrícola, en concreto, bosques autóctonos de encinas que se encuentren rodeando al olivar objeto de estudio (ii) Testar la hipótesis de una posible diferencia en las comunidades microbianas de dos variedades de olivar presentes en el mismo cultivar, pero con susceptibilidades a la verticilosis diferentes (Frantoio, tolerante; Picual, sensible). Estos objetivos se abordaron con el uso de técnicas de secuenciación masiva, mediante la secuenciación de regiones específicas del gen 16S rARN para identificación bacteriana y del ITS2 (espacio intergénico del operón ribosomal) para hongos. Como resultados destacables, hay que resaltar que no se pudo observar la presencia de efecto rizosférico en el suelo sometido a manejo agrícola, mientras que este estaba claramente presente en el caso del encinar. El manejo tuvo una influencia importante, con variaciones claras entre las rizosferas y los suelos sueltos de ambas especies de árboles. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las comunidades rizosféricas de ambas variedades de olivos. De acuerdo a nuestros resultados, y bajo las condiciones analizadas, la composición y estructura de las comunidades microbianas rizosféricas no parecen jugar un papel en la tolerancia del olivo a *V. dahliae*.

S4.7. Evaluación de las comunidades microbianas de *Vaccinium myrtilus* para el aislamiento e identificación de microorganismos capaces de mejorar el rendimiento del cultivo y las propiedades nutricionales del arándano.

R. Vicentefranqueira, Z. Saati, P. García-Fraile y R. Rivas.

Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

E. mail: rverdew@usal.es

El consumo de arándanos (género *Vaccinium*), está creciendo de manera exponencial en todo el mundo. Este aumento en la demanda tiene un fiel reflejo a nivel de producción de este fruto. Para el cultivo de arándano se utiliza la especie *Vaccinium corymbosum*, originario de América, pues se ha seleccionado a lo largo del tiempo consiguiéndose una planta de porte alto y frutos grandes. Sin embargo, la especie originaria de Europa *V. myrtilus*, presente de forma natural en zonas montañosas del norte y centro de nuestro territorio, es una planta arbustiva de porte bajo y frutos pequeños, pero capaz de resistir diferentes estreses y condiciones ambientales variadas.

Este trabajo está enfocado a conocer si existen diferencias entre las comunidades microbianas de *V. myrtilus* (arándano silvestre) de diferentes localizaciones españolas con respecto a cultivos de *V. corymbosum* e identificar microorganismos con capacidad de activar resistencias a diferentes tipos de estrés, promover del crecimiento o mejorar la composición nutricional de los frutos, para utilizarlos como bioestimulantes en los cultivos agrícolas.

Han sido muestreadas cuatro poblaciones de arándanos. En tres de ellas se recolectaron individuos de *V. myrtilus* y en la otra de *V. corymbosum*. De cada localización han sido recolectados 2 individuos y se analizaron mediante análisis metagenómicos las comunidades microbianas de hojas, endófitos de raíz y rizosfera.

Los análisis metagenómicos revelaron que las familias bacterianas mayoritarias fueron Acidobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Sinobacteraceae, Burkholderiaceae, Rhodospirillaceae y Chitinophagaceae. Los géneros bacterianos en las raíces de las diferentes localizaciones son similares, aunque existen diferencias en los porcentajes encontrados en cada una de ellas. A partir de estos datos, se seleccionaron medios de cultivo adecuados para aislar los microorganismos, obteniéndose 500 aislados en total. De momento estos aislados han sido identificados mediante MALDI-TOF MS, lo que ha permitido detectar patógenos humanos y de plantas (ej. *Burkholderia glathei*, *Pseudomonas marginalis*, *P. fragi*, *P. rhodesiae*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Flavobacterium pectinovorum*) que se desestimaron del estudio, e identificar también especies de interés, como *Burkholderia phymatum*, *Paenibacillus amylolyticus*, *P. koreensis*, *P. chlororaphis*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Bacillus mycoides*. Por otro lado, en base a sus perfiles proteicos se realizaron dendrogramas para obtener una visión de los grupos aislados, estuviesen o no identificados mediante esta técnica y que nos ha proporcionado información sobre clones del mismo organismo.

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación del proyecto PID2019-109960RB-I00 con el que se lleva a cabo este trabajo.

S4.8. Análisis del microbioma de los cultivos de arroz de las marismas del Guadalquivir

M. Iniesta-Pallarés*, M. Brenes-Álvarez, C. Álvarez, F.P. Molina-Heredia, V. Mariscal.

*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), CSIC y Universidad de Sevilla.
Avda. Américo Vespucio 49, 41092, Sevilla.
E-mail: vicente.mariscal@ibvf.csic.es*

En el sistema de producción actual, las plantas únicamente utilizan el 30 % de los fertilizantes suplementados sobre el cultivo, mientras que el 70 % restante se pierde contaminando acuíferos, lagos, ríos y mares. En consecuencia, solo en Europa se han descrito cerca de 200 zonas eutróficas, entre las que se encuentra la desembocadura del río Guadalquivir. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevos sistemas de producción basados en la biotecnología vegetal y la agroecología, encaminadas a mejorar la producción mediante la disminución del riesgo ambiental, lo que se conoce como la Segunda Revolución Verde. Los microorganismos del suelo, especialmente los que fijan el nitrógeno atmosférico, son importantes como alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis química. El suelo está repleto de microorganismos que pueden ser beneficiosos para el crecimiento y desarrollo de la planta, como son los microorganismos PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal), los solubilizadores de fosfato, los hongos micorrícicos o los fijadores de nitrógeno atmosférico. En el grupo Simbiosis Planta-Cianobacteria del IBVF estudiamos las relaciones mutualistas entre las cianobacterias y diferentes cultivos agrícolas, con el objetivo de obtener nuevos biofertilizantes. Como base para el diseño racional de biofertilizantes, hemos comenzado por analizar el microbioma presente en los cultivos de arroz de las marismas del Guadalquivir, uno de los más importantes en la región. Nos hemos basado en el estudio de las secuencias de los marcadores moleculares más universales, en concreto las regiones hipervariables V4-V5 del ARN ribosómico 16S, y su posterior análisis con herramientas de Big Data de metagenómica. Esta técnica de análisis metagenómico nos ha permitido estudiar una gran cantidad de secuencias de cada grupo de muestras. Por un lado, hemos analizado el microbioma presente en el suelo de los arrozales de siete parcelas distribuidas a lo largo de las marismas; y por el otro, hemos centrado nuestros estudios en el análisis de una parcela concreta, en la que hemos tomado muestras durante tres tiempos de cultivo (antes de la siembra y 1, 2 y 3 meses post-siembra) y con diferentes tratamientos (una zona tratada con nitrógeno y otra sin tratar). Para el procesamiento de los resultados, hemos realizado un análisis estadístico de la riqueza ecológica de las muestras (diversidad- α) y la similitud de las muestras entre sí (diversidad- β). El objetivo principal ha sido el análisis funcional y la predicción metabólica de los microorganismos presentes tanto en la raíz de las plantas de cultivo como en el suelo, a lo largo del periodo de ensayo. Los resultados que hemos obtenido muestran un cambio en el metabolismo predominante en el cultivo a lo largo del tiempo, así como diferencias significativas en los microorganismos predominantes en las raíces de las plantas respecto a los suelos.

COMUNICACIONES CORTAS:

PC1: Virulencia

PC2: Promotoras del crecimiento y
Biocontrol

PC3: Endosimbióticos y endófitos

PC4: Genómica

PC1.1. Estudio del papel diferencial de *tasA* y *calY* en la formación de *biofilm* en *B. cereus*

A. Álvarez-Mena*, M. L. Antequera-Gómez, J. Caro-Astorga, A. de Vicente, D. Romero

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” –
Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31
(Campus Universitario de Teatinos), 29071, Málaga, Spain. alvarezmena@uma.es*

Bacillus cereus es una bacteria saprófita que se aísla frecuentemente del suelo y a su vez puede llegar a ser patógeno de humanos causando numerosas intoxicaciones alimentarias debido al consumo de verduras y comida procesada contaminada. La producción de esporas y la formación de comunidades bacterianas conocidas como *biofilms*, son dos factores claves en la contaminación de los alimentos, la transmisión y la producción de toxinas perjudiciales para el consumidor. En el proceso de desarrollo y maduración de los *biofilms*, una subpoblación celular secreta una matriz extracelular compuesta principalmente por exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular. Las proteínas amiloides, uno de los componentes más atractivos de dicha matriz, poseen una alta tendencia a fibrilar y se caracterizan por poseer un papel multivalente en la fisiología bacteriana. En estudios previos se ha identificado que *B. cereus* posee dos regiones ortólogas a *B. subtilis* y que son esenciales para la formación de fibras amiloides. En concreto se han descrito dos genes ortólogos a *tasA*, denominados *tasA* y *calY* respectivamente en nuestra especie bacteriana de estudio. Ambos locus se encuentran en la misma región génica, se transcriben de forma independiente y la delección de cada uno de los locus da lugar a un fenotipo deficiente en la formación de *biofilm*. En el caso del *ΔtasA*, el *biofilm* se desprende de la superficie del pocillo a las 72 horas, y en ausencia de *calY* el grosor es menor. En este trabajo nos centramos en la dinámica de expresión de estas proteínas mediante citometría de flujo, y demostramos que hay una mayor inducción en células del anillo en comparación con planctónicas. En concreto diferenciamos tres tipos de subpoblaciones: las que expresan conjuntamente ambos locus, las que sólo expresan *calY* o bien las que no muestran ningún tipo de expresión. Con el objetivo de estudiar si estos genes participan de algún modo en el estilo de vida epífito de *B. cereus*, se llevaron a cabo ensayos de persistencia en hojas de cucurbitáceas y se observó que en *ΔtasA* hay menor tasa de esporulación en comparación con la cepa silvestre, y la biopelícula del mutante está bastante afectada en su arquitectura. Los estudios de expresión *in situ*, demostraron que la expresión de la proteína amiloide se ve influenciada por huésped. Los resultados obtenidos indican que *tasA* y *calY* podrían tener un papel diferencial y complementario en la formación de la biopelícula, por lo que es esencial una caracterización en mayor detalle a nivel bioquímico y celular.

Este trabajo está financiado por el proyecto AGL2016-78662-R y PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación; la European Research Council Starting Grant (BacBio 637971). Ana Álvarez posee un contrato predoctoral (BES-2017-081275) del programa FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación.

PC1.2. Patogenicidad de aislados de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* del foco de Alicante en diferentes hospedadores.

M.L. Domingo-Calap¹, C.M. Aure^{*2}, I. Navarro-Herrero², M. Simó-Esquivel¹, E.G. Biosca³, M. Román-Écija⁴, B.B. Landa⁴, M. Saponari⁵, E. Marco-Noales².

¹Tragsa, Empresa de Transformación Agraria, Delegación de Valencia, España.

²Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). España.

³Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de València. España.

⁴Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IAS-CSIC), Córdoba, España.

⁵ Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Bari, Italy.

E-mail: martinez_criaur@gva.es

Xylella fastidiosa es una de las principales bacterias de cuarentena en la Unión Europea, que habita en el xilema de la planta hospedadora y el tracto digestivo de insectos que actúan como vectores. Se multiplica en los vasos conductores de numerosas especies vegetales, pudiendo llegar a obstruir el flujo de savia, lo que provoca síntomas de estrés hídrico que pueden causar la muerte de la planta. En España, las zonas con focos activos son las Islas Baleares y la Comunidad Valenciana, con diferencias en cuanto a las características genéticas de los aislados bacterianos y las especies vegetales afectadas. El foco de la Comunidad Valenciana se extiende por la zona noreste de la provincia de Alicante, y el principal hospedador es el almendro; hasta el momento, todos los aislados pertenecen a la subespecie *multiplex* ST6. Sin embargo, la adscripción de los aislados a una subespecie y un ST no determina la gama de hospedadores a los que pueden infectar. En este trabajo se presentan ensayos de patogenicidad para conocer la susceptibilidad de diversas especies vegetales a la infección por aislados de Alicante, haciendo un seguimiento periódico de la bacteria y de la planta. Se seleccionaron especies vegetales, y variedades de algunas de ellas, que constituyen cultivos relevantes, como almendro, olivo, vid, limonero, naranjo, mandarino, níspero y caqui; y dos especies forestales de gran importancia en el paisaje mediterráneo: encina y alcornoque. Se inocularon 25 plantas de cada especie o variedad, testándose dos cepas del foco de Alicante y, en el caso de vid, se inocularon 5 plantas más de cada variedad, incluyendo una cepa aislada de esta especie en el foco de Baleares. Los análisis se realizaron mediante PCR en tiempo real tras 1, 3, 6, 12 y 18 meses post-inoculación (m.p.i.), avanzando en cada muestreo unos cuantos cm por encima del punto de inoculación. El análisis de los resultados revela, hasta el momento, que el movimiento de la bacteria en la planta no sigue un patrón claramente predecible a lo largo del tiempo. Es de destacar que en especies particularmente interesantes, como el olivo y la vid, los aislados de Alicante están muy ralentizados en su movimiento y, después de 12 meses, solo llegan a detectarse en menos del 4% de las plantas y con valores de Cq muy tardíos (i.e., carga bacteriana muy baja).

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos XF-ACTORS (Unión Europea) y E-RTA2017-00004-C02 (Programa Estatal de I+D+I Orientada a los Retos de la Sociedad y FEDER), por la Interprofesional del Aceite de Oliva y por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.

PC1.3. Aproximaciones al cultivo de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'**M. Herrero-Cervera^{*1}, S. Barbé¹, E. Marco-Noales¹**¹*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). España.**E-mail: herrero_marcer@gva.es*

'*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CaLso) es una bacteria Gram negativa asociada a desórdenes vegetativos en cultivos estratégicos como patata, zanahoria, tomate, apio, pimiento y chirivía. Estos desórdenes pueden modificar el aspecto de los tubérculos, las raíces y los frutos de las plantas infectadas, afectando a su comercialización. Esta bacteria está restringida al floema de las plantas hospedadoras y a la hemolinfa de los psílidos que se alimentan de las mismas, constituyendo la principal vía de transmisión. Actualmente, la bacteria no es cultivable en condiciones de laboratorio por lo que su estudio está muy limitado. Por ello, se están desarrollando diversas estrategias como el uso de biorreactores de membrana, microcámaras de fluido, co-cultivo, etc. Nuestro trabajo tiene como objetivo el diseño de un medio de cultivo para CaLso mediante diversas aproximaciones. Una de ellas consiste en tratar de simular la composición química y física del hábitat natural de la bacteria, el floema de la planta hospedadora, al tiempo que se suplen las deficiencias metabólicas de CaLso (debidas a su reducción genómica). Los primeros resultados con extracto vegetal del floema de raíz de zanahoria, en condiciones de pH neutro, agitación moderada y temperaturas menores de 28 °C, suplementado con determinados compuestos químicos, parecían indicar un aumento de la cantidad de ADN de CaLso y, quizá, crecimiento bacteriano o, al menos, estabilidad del cultivo en condiciones de laboratorio.

Complementariamente, se realizó una secuenciación masiva de hojas, raíz y rizosfera de muestras de zanahorias sanas e infectadas con diferente carga bacteriana de CaLso. En el caso de las muestras de floema de raíz de zanahoria, los resultados indicaron que, efectivamente, *Liberibacter* sp. solo se encontraba en las muestras infectadas por CaLso. Además, la presencia de *Liberibacter* sp. produjo una disminución en la diversidad microbiana, pasando de un número de taxones de entre 8 y 9 (muestras no infectadas) a 6-7. En el caso de las muestras de rizosfera, *Nitrosococcus* sp. y *Gaiella* sp. fueron siempre los taxones más abundantes, independientemente de la presencia o no de CaLso. Además, *Rubrobacter* sp. disminuyó considerablemente en presencia de CaLso; y *Xiphinematobacter* sp., por el contrario, aumentó en estas mismas muestras. Las diferencias en el microbioma entre las zanahorias infectadas y no infectadas pueden constituir una nueva aproximación mediante co-cultivo para abordar la problemática del crecimiento de CaLso *in vitro*.

Los autores agradecen la financiación al proyecto POnTE, UE (gran number 635646), y MHC al Fondo Social Europeo.

PC1.4. Regulación de genes de virulencia por el sistema de dos componentes GacS/GacA en *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335.

C. Lavado-Benito^{*1}, M. Martínez-Gil¹, J. Murillo², C. Ramos¹, L. Rodríguez-Moreno¹.

¹ Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga-CSIC, Campus de Teatinos, 29010 (Málaga)

² IMAB, Universidad Pública de Navarra, Mutilva Baja, E-31192.

Email: lgrodriguez@uma.es

El sistema de dos componentes GacS/GacA es uno de los principales mecanismos de regulación global en bacterias, incluyendo distintas especies fitopatógenas pertenecientes al complejo *Pseudomonas syringae*. Trabajos realizados con bacterias patógenas de plantas herbáceas, pertenecientes a este complejo, han descrito cómo el sistema GacS/GacA interviene en la regulación de diversos factores de virulencia, incluyendo el sistema de secreción tipo III (T3SS), si bien, la regulación de estos factores muestra variabilidad no solo entre especies, sino también entre cepas. Además, el sistema GacS/GacA ha sido mayoritariamente estudiado en cepas que infectan huéspedes herbáceos, limitando la predicción de su papel regulador en la virulencia de especies patógenas de plantas leñosas. En este trabajo, hemos estudiado el papel regulador del sistema GacS/GacA en la virulencia y patogenicidad de la cepa modelo *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335. Esta bacteria fitopatógena, perteneciente al complejo *P. syringae*, induce la formación de tumores en las partes aéreas del olivo. Para este trabajo, se construyó un mutante de esta cepa en el gen *gacA*, con el que se han realizado ensayos de virulencia en plantas de olivo adulto, de adhesión a hojas de olivo, y de respuesta de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco. Los resultados muestran que el mutante *gacA* acelera el desarrollo de síntomas en las plantas de olivo inoculadas, y provoca una HR más intensa en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, el mutante *gacA* mostró una menor adhesión a las hojas de olivo en comparación con la cepa silvestre. Además, con el fin de obtener una visión global de todos aquellos procesos en los que está involucrado el sistema GacS/GacA, hemos llevado a cabo un análisis por secuenciación masiva del RNA (RNAseq) utilizando la cepa silvestre y su mutante *gacA*. Los resultados de este análisis muestran que el sistema GacS/GacA interviene en la regulación de la expresión de factores de virulencia de Psv NCPPB3335 ya descritos para otras bacterias. Concretamente, y en consonancia con los ensayos fenotípicos mencionados anteriormente, los datos de RNAseq muestran que el mutante *gacA* presenta una disminución en la expresión de los genes implicados en el metabolismo de compuestos de hierro y el metabolismo de purinas; y un aumento de la expresión de genes relacionados con el T3SS, síntesis de auxinas, locomoción y quimiotaxis bacteriana, metabolismo de lignina, y degradación de compuestos fenólicos o región WHOP, asociada con huéspedes leñosos. Los datos de expresión de algunos de los genes identificados por RNAseq han sido confirmados utilizando PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Actualmente estamos realizando diversos ensayos de caracterización fenotípica que permitan complementar los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico.

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

PC1.5. Retos para la detección de bacterias fitopatógenas mediante PCR: el caso de '*Candidatus Liberibacter*' spp. asociados al HLB

F. Morán^{*1}, S. Barbé¹, S. Bastin², I. Navarro-Herrero¹, E. Bertolini³, M. M. López¹, E. Hernández-Suárez², A. Urbaneja¹, A. Tena¹, F. Siverio², E. Marco-Noales¹.

¹*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).*

²*Unidad de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA).*

³*Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Brasil.*

E-mail: moran_fel@gva.es

El HLB es la enfermedad más devastadora de los cítricos que se conoce hoy en día. Se asocia a tres especies bacterianas del género *Liberibacter*: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*' y '*Ca. L. americanus*'. Estas bacterias son transmitidas por insectos vectores de la familia *Psyllidae*, y no se han podido cultivar hasta el momento en el laboratorio, lo que dificulta en gran medida su estudio y control. La prevención de la diseminación de estas tres especies y de su entrada en áreas libres de la enfermedad, como el continente europeo y, en particular, la cuenca mediterránea, requiere el uso de técnicas de detección específicas y sensibles. Actualmente, la detección de las especies bacterianas asociadas al HLB está basada mayoritariamente en protocolos de PCR en tiempo real dirigidos a fragmentos del gen ARNr 16S. Sin embargo, el empleo de este tipo de dianas puede ser problemático debido a la naturaleza altamente conservada de este gen, lo que puede dar lugar a homologías de secuencia con algunas especies de la diversa microbiota que puede estar presente en los hospedadores y en reservorios de la bacteria diana. En el presente trabajo se emplearon dos métodos de PCR en tiempo real estandarizados para el diagnóstico del HLB, uno de ellos diseñado para la detección simultánea de las tres especies de '*Ca. Liberibacter*' y el otro para la detección de cada una de ellas, ambos dirigidos a la región del gen ARNr 16S. Se analizaron 4.915 muestras procedentes de diferentes zonas de España y otros países, en las que se incluían cítricos, insectos vectores de HLB y parasitoides de estos (empleados en programas de control biológico). Los resultados mostraron que el 9,3% de las muestras fueron positivas mediante la PCR universal y el 0,3% mediante alguna de las PCRs específicas. Para confirmar los positivos obtenidos, se diseñaron iniciadores externos a la región diana de ambos protocolos, para su posterior secuenciación. El análisis bioinformático de las secuencias reveló que todas las amplificaciones obtenidas se debían a organismos procariotas presentes en las muestras no pertenecientes al género *Liberibacter*; es decir, que se trataba de amplificaciones no deseadas. Por tanto, los datos de secuenciación permitieron identificar microbiota ambiental, no asociada al HLB, que puede dar lugar a falsos positivos con dichos protocolos y con consecuencias negativas para la prevención y gestión de la enfermedad. Los iniciadores diseñados en este estudio deben ser utilizados en los protocolos de diagnóstico del HLB como un paso necesario de confirmación de los resultados positivos, previamente obtenidos mediante PCRs estandarizadas.

Este trabajo se financió con los proyectos TROPICSAFE (grant number 727459), UE, y E-RTA2015-00005-C06-01 (Programa Estatal de I+D+I Orientada a los Retos de la Sociedad).

PC1.6. Estudio de la vía de transducción de señales asociada a quimiotaxis en *Dickeya dadantii* 3937 y *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000

M. Munar-Palmer¹, S. Santamaría-Hernando¹, Jean Paul Cerna-Vargas¹, S. Nebreda¹, José Juan Rodríguez- Herva^{1,2}, E. López-Solanilla^{1,2}.

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.*

²*Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Madrid.*

E-mail: marti.munar.palmer@upm.es

La quimiotaxis y la motilidad bacteriana han sido descritas como caracteres importantes para la patogénesis en plantas, especialmente durante las etapas iniciales de la infección. Para diseñar estrategias de interferencia para la protección vegetal, es crucial conocer estos procesos y su regulación. Sin embargo, diversos estudios ponen de manifiesto que la quimiotaxis puede estar involucrada en otros aspectos fisiológicos de las bacterias además de la motilidad flagelar. Por ello, nuestro objetivo es elucidar la ruta de señalización asociada a la quimiopercepción y obtener así más información acerca de los procesos que ésta puede regular.

Se ha estudiado con detalle la ruta de señalización que controla la motilidad bacteriana. Los quimiorreceptores, llamados MCPs (Methyl Acceptor Proteins), en presencia de químicos no atrayentes o en ausencia de ellos, activan la autofosforilación de la proteína central de esta ruta, la histidin kinasa CheA. CheA-P interactúa con CheY, la proteína reguladora de la respuesta, y la fosforila. CheY en su estado fosforilado se une al motor flagelar y provoca el movimiento flagelar en sentido horario (CW), generando un movimiento aleatorio conocido como “tumbling”. En caso contrario y, por tanto, en presencia de un químico atrayente, CheA deja de autofosforilarse, provocando así un ratio mayor de CheY no fosforilada frente a CheY fosforilada, lo que promueve el movimiento flagelar en sentido antihorario (CCW), que se traduce en un movimiento dirigido. Esto no ocurre de manera aislada, sino que la MCP y CheA se agrupan en un complejo supramolecular a través de la proteína auxiliar CheW. También existen metil-esterasas y metiltransferasas, como CheB y CheR, que regulan la respuesta.

Nuestro grupo centra sus esfuerzos en estudiar los efectos del ambiente en la capacidad de infección de dos bacterias modelo en el estudio de la fitopatogénesis bacteriana, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPto DC3000) y *Dickeya dadantii* 3937 (Dd3937). El objetivo principal de este trabajo es elucidar la ruta de señalización de quimiotaxis y qué procesos regula en estas dos bacterias. Para ello, el primer paso es encontrar qué proteínas endógenas interactúan con CheA, para lo que realizaremos ensayos KISS (Kinase Interacting Substrate Screening).

En PsPto DC3000 existen 3 genes *che*, mientras que en Dd3937 existe únicamente un gen *che*. Estos 4 genes se han clonado en vectores de expresión para obtener dichas proteínas y se van a realizar los ensayos KISS con todas ellas. Estos ensayos se complementarán con ensayos funcionales in vivo para determinar la implicación en virulencia y otros fenotipos. Asimismo, también se realizarán mutantes de aquellos genes que resulten interactores de CheA, indagando así en la función de dichos genes. Este trabajo está financiado a través del proyecto RTI2018-095222-B-I00. M. Munar-Palmer es beneficiario del contrato FPI-PRE-2019-087521.

PC1.7. Detección de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* viable mediante qPCR mejorada

P. Sabuquillo*, J. Cubero

Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA).

E-mail: mpssc@inia.es

Xanthomonas es un grupo de bacterias asociadas a plantas y agentes causales de importantes enfermedades que afectan a un gran número de cultivos de importancia económica. Dentro del género *Xanthomonas*, el patógeno *Xanthomonas arboricola arboricola* pv. *pruni* (Xap), recientemente clasificado como organismo regulado no cuarentenario por la comisión europea, es el agente causal de la mancha bacteriana de la fruta de hueso y el almendro. El impacto económico de la enfermedad se debe a la imposibilidad de comercialización de los frutos afectados y a la reducción de la productividad de los árboles debilitados por la enfermedad, así como el incremento de los costos de producción sobre todo en materiales de propagación.

El control eficiente de Xap así como sus estudios epidemiológicos requieren herramientas de detección de la bacteria sensibles y fiables. Este objetivo generalmente se aborda mediante la utilización de estrategias de PCR a partir de ADN. Sin embargo, estas metodologías son cuestionables porque no siempre revelan la presencia de células bacterianas viables con carácter realmente infeccioso, lo cual implica a veces, tanto en estudios epidemiológicos como en el diagnóstico rutinario, una sobrestimación de la población bacteriana relevante. Para evitar este problema se ha desarrollado un protocolo de qPCR modificado mediante la utilización de agentes fotoactivables que teóricamente bloquean la amplificación de ADN no contenido en células integrales. Se evaluaron distintas concentraciones de los agentes intercalantes: monoazida de etidio (EMA), monoazida de propidio (PMA) y su estructura mejorada PMAxx, en cultivos bacterianos vivos o inactivados. Estos agentes se agregaron antes del proceso de extracción de ADN para su posterior amplificación por qPCR. Mediante la utilización de estos compuestos se comprobó que efectivamente las técnicas de PCR detectaban Xap no viables y que el tratamiento con los compuestos antes referidos disminuía la posibilidad de sobrestimar las poblaciones de Xap viables. Entre los compuestos, PMAxx mostró un mejor efecto de discriminación que EMA y PMA entre células viables y muertas de Xap y se presenta como la mejor opción para el estudio de Xap en planta, tanto en el diagnóstico rutinario como en los estudios de interacción de la planta con la bacteria.

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Ciencia e Investigación, proyecto RTI2018-096018-R-C32 y cofinanciado por FEDER.

PC1.8. Resistencia a los fungicidas SDHI boscalida y fluopiram en *Podosphaera xanthii* proveniente de campos comerciales de cucurbitáceas en España.

A. Vielba-Fernández*, A. de Vicente, A. Pérez-García y D. Fernández-Ortuño.

*Instituto 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
E-mail: avielba@uma.es*

El óidio provocado por *Podosphaera xanthii* es una enfermedad devastadora de las cucurbitáceas en todo el mundo y una de las enfermedades más importantes que afectan a estos cultivos en España. La aplicación de fungicidas es la principal práctica de control para el manejo de *P. xanthii*; sin embargo, recientemente se han reportado aislados resistentes a múltiples clases de fungicidas específicos de sitio en la población española del óidio de cucurbitáceas. Los inhibidores de succinato deshidrogenasa (*succinate dehydrogenase inhibitor*, SDHI) constituyen una clase relativamente nueva de fungicidas para el control del óidio que representan nuevas alternativas para los agricultores. En este trabajo se utilizaron 27 aislados de *P. xanthii* para determinar la concentración efectiva que reduce el crecimiento micelial en un 50% (EC50) a boscalida y fluopiram, registrados en 2008 y 2015 en España, respectivamente. Gracias a los datos obtenidos, se determinó la dosis discriminadora para ambos fungicidas y se realizó una monitorización de la resistencia a estos dos fungicidas SDHI en 270 aislados de *P. xanthii* recolectados de varios campos comerciales de cucurbitáceas en España durante 2018-2019. Se observaron tres patrones de resistencia a SDHI, que incluyen los patrones I (resistencia a boscalid), II (resistencia a fluopiram) y III (resistencia a boscalid y fluopiram). También se examinaron los cambios de aminoácidos asociados con estos patrones de resistencia en la proteína Sdh. Se detectaron dos cambios aminoacídicos relacionados con dos patrones de resistencia: resistencia a boscalida, y resistencia a boscalida y fluopiram. Según nuestros resultados, los fungicidas SDHI son buenas alternativas para el control del óidio de las cucurbitáceas, aunque deben aplicarse con precaución.

PC1.9. Caracterización de la diversidad metabólica de aislados de *Xylella fastidiosa* mediante fenotipado de alto rendimiento

M. Román-Écija*, J.A. Navas-Cortés, B.B. Landa

Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba.

E-mail: mromanecija@ias.csic.es

La bacteria fitopatógena *Xylella fastidiosa* (*Xf*), habitante del xilema, es una de las principales amenazas a nivel mundial para la sanidad vegetal, ya que puede infectar más de 500 especies vegetales, y causar enfermedades severas en muchas de ellas. Esta bacteria se caracteriza por un crecimiento lento (fastidioso) y restringido al xilema que es la causa, en parte, de la dificultad para su aislamiento. A pesar de los importantes esfuerzos para conocer su diversidad genética y la patogenicidad de las nuevas cepas de la bacteria identificadas en Europa, la información disponible sobre su caracterización fenotípica es escasa, lo cual es fundamental para poder establecer posibles diferencias entre cepas que permitan explicar la infección diferencial sobre determinadas plantas huésped. El genoma de esta bacteria es muy pequeño, y se ha demostrado recientemente mediante la combinación de un modelo metabólico a escala genómica y fenotipado, que su red metabólica está completa, pero es sorprendentemente minimalista y carece de robustez.

En este trabajo se ha determinado la diversidad metabólica de siete cepas de *Xf* pertenecientes a tres subespecies (*fastidiosa*, *multiplex*, *pauca*), aisladas de almendro, olivo, vid y acebuche, procedentes de España, Italia y Estados Unidos, mediante un sistema de fenotipado de alto rendimiento. Este sistema permite caracterizar la capacidad metabólica de las cepas estudiadas y establecer diferencias en el aprovechamiento de distintas rutas metabólicas, lo que contribuirá a complementar la información obtenida del genoma completo circularizado de estas cepas ya disponible.

Para ello, se utilizaron microplacas de fenotipado (PM 1 a 5) de Biolog, que contienen una serie de compuestos que pueden ser usados como fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y suplementos nutricionales. El crecimiento de cada cepa se estimó diariamente mediante medidas de la absorbancia a 600 nm con un lector de microplacas. El análisis de las curvas de crecimiento generadas para cada compuesto indicó diferencias entre las cepas de *Xf* en las distintas placas utilizadas. Las mayores diferencias entre cepas se obtuvieron para algunos de los compuestos usados como fuente de carbono y de nitrógeno, y la cepa de *Xf* subsp. *pauca* 'De Donno', aislada del foco epidémico de *Xf* en Italia que presentó un perfil metabólico más diferenciado respecto a las cinco cepas aisladas en los focos en España de *Xf* subsp. *fastidiosa* y subsp. *multiplex* y una cepa americana de *Xf* subsp. *fastidiosa*.

Financiación: Proyectos 727987 XF-ACTORS H2020-UE y E-RTA2017-00004-C06-02 de AEI-INIA Spain, the Spanish olive oil Interprofesional and European Social Fund.

PC.2.1. Selección y caracterización de bacterias asociadas a plantas con actividad antagonista frente a *Erwinia amylovora*

S. Barbé^{*1}, A. Figàs-Segura², M. Benada^{1,3}, I. Navarro-Herrero¹, T. M. Sampaio¹, E. G. Biosca², E. Marco-Noales¹

¹*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). España.*

²*Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de València. España.*

³*Faculty of Natural Sciences, Earth and the Universe. 8 Mai 1945 University of Guelma. Algeria.*

E-mail: barbe_sil@gva.es

Erwinia amylovora, agente causal del fuego bacteriano de las rosáceas, es una bacteria de fácil diseminación que coloniza especies vegetales de gran importancia económica, como manzano, peral, níspero y membrillero, y que es difícil de controlar mediante prácticas de cultivo y agroquímicas. La búsqueda de estrategias de gestión alternativas que sean eficaces y eco-sostenibles ha llevado a la utilización de microorganismos para establecer programas de control biológico. En el presente trabajo se recogen los resultados de la búsqueda de microorganismos con actividad antagonista frente a *E. amylovora*, como una primera fase de un programa de selección de potenciales agentes de biocontrol de esta bacteria patógena, preferentemente en níspero. Para ello se muestrearon diversas especies vegetales de varios orígenes geográficos, empleando medios generales de laboratorio, y se obtuvo una colección de 196 aislados bacterianos cultivables, representativos de diferentes morfotipos coloniales. Se evaluó su actividad frente a *E. amylovora* en condiciones *ex vivo*, en frutos inmaduros de peral y níspero, e *in vitro*, en medio de cultivo pobre en nutrientes. Se seleccionaron diez aislados que mostraron la capacidad de reducir en gran medida los síntomas del fuego bacteriano en los frutos y con una notable actividad antagonista en placa contra *E. amylovora*. Estos aislados fueron caracterizados fenotípicamente. Ninguno de ellos provocó una reacción de hipersensibilidad en tabaco, la mayoría produjeron varios enzimas hidrolíticos, sintetizaron sideróforos y fueron capaces de solubilizar fosfatos, características que pueden tener relación con el biocontrol o la promoción del crecimiento de la planta. La identificación de los aislados mediante la secuenciación del ARNr 16S reveló que las cepas pertenecen a las especies *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *P. azotoformans*, *Rosenbergiella epipactidis* y *Serratia plymuthica*, la mayoría de las cuales nunca antes se habían asociado con antagonismo frente a *E. amylovora*. En este trabajo, por tanto, hemos podido realizar un cribado y una selección de cepas en una primera etapa de un programa de desarrollo de agentes de control biológico, y las cepas seleccionadas se estudiarán más a fondo en lo que respecta a su supervivencia y eficacia en la planta contra *E. amylovora*, su interacción con el resto de la microbiota y con las condiciones ambientales.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2015-00087-C02-01 y RTA2015-00087-C02-02, cofinanciados por el INIA, el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y los Fondos FEDER.

PC2.2. Componentes de la matriz extracelular y metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* implicados en la interacción beneficiosa con la planta

M.V. Berlanga-Clavero^{1*}, C. Molina-Santiago¹, A.M. Caraballo-Rodríguez², A. Pérez-García¹, A. de Vicente¹, P.C. Dorrestein² & D. Romero¹

1 Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga.

Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071, Málaga.

2 Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center. University of California San Diego. La Jolla, CA 92093, USA.

E-mail: mvictoriaberlanga@uma.es

El uso de microorganismos con actividades promotoras del crecimiento de plantas o de protección frente a enfermedades microbianas está considerado una estrategia eficaz y prometedora a incluir en programas de producción y protección sostenibles. *Bacillus subtilis* NCIB 3610 es una cepa bacteriana presente en la rizosfera y con capacidad de formar *biofilms*, comunidades donde las células se encuentran embebidas en una matriz extracelular (ECM) de producción propia compuesta principalmente por proteínas, exopolisacáridos y ácidos nucleicos. La formación de estas comunidades favorece la interacción beneficiosa con las plantas de dos formas complementarias: facilitando la colonización de la misma y contribuyendo a una eficiente secreción de metabolitos secundarios con importante papel en la ecología bacteriana.

En este trabajo se ha evaluado el papel del *biofilm* de esta cepa en la capacidad promotora del crecimiento a nivel de semilla mediante el uso de mutantes en los diferentes componentes de la ECM y en metabolitos secundarios. Estudios de colonización, persistencia y de promoción del crecimiento de la radícula nos han permitido distinguir dos grupos de moléculas: i) aquellas con un papel estructural que permiten el mantenimiento de la población sobre los tejidos de la semilla y ii) las que median la comunicación química con la planta, entre las que destacan la proteína amiloide TasA y el lipopéptido fengicina. Los ensayos de interacción proteína-proteína realizados sugieren que el mecanismo de la primera implicaría la unión con proteínas estructurales de las vesículas de almacenamiento de lípidos de las semillas, mientras que el efecto de la fengicina podría estar ligado a su capacidad intrínseca para interaccionar con membranas. Como consecuencia de estos efectos, ocurre una alteración en el perfil metabólico de la radícula que destaca por cambios en la composición lipídica. Además, el hecho de que ambos componentes presenten mecanismos de acción diferentes podría explicar la distinta perduración en el tiempo de la actividad beneficiosa sobre la planta; mientras que TasA promueve el crecimiento de la radícula en estadios post-germinativos, fengicina además induce un mayor crecimiento de la planta adulta, así como protección frente a patógenos aéreos.

Nuestros resultados ayudan a comprender cómo se produce la actividad beneficiosa de *B. subtilis*, proponiendo un mecanismo de acción que estaría directamente influenciado por la estructura interna y composición lipídica de la semilla.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2016-78662-R y PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación y la European Research Council Starting Grant (BacBio 637971). M.V. Berlanga-Clavero posee un contrato predoctoral (FPU17/03874) del Programa FPU del Ministerio de Universidades.

PC2.3. *In silico* characterization and phylogenetic distribution of extracellular matrix components in the model rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* F113 and other pseudomonads

E. Blanco-Romero*, D. Garrido-Sanz, R. Rivilla, Miguel Redondo-Nieto, M. Martín

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2, 28049 Madrid, Spain.
E-mail: esther.blanco@uam.es*

Biofilms are complex structures that are crucial during host-bacteria interaction and colonization. Bacteria within biofilms are surrounded by an extracellular matrix (ECM) typically composed of proteins, polysaccharides, lipids, and DNA. Pseudomonads contain a variety of ECM components, some of which have been extensively characterized. However, neither the ECM composition of plant-associated pseudomonads nor their phylogenetic distribution within the genus has been so thoroughly studied. In this work, we use *in silico* methods to describe the ECM composition of *Pseudomonas fluorescens* F113, a plant growth-promoting rhizobacteria and model for rhizosphere colonization. These components include the polysaccharides alginate, poly-N-acetylglucosamine (PNAG), and levan; the adhesins LapA, MapA, and PsmE; and the functional amyloids in *Pseudomonas*. Interestingly, we identified novel components: the *Pseudomonas* acidic polysaccharide (Pap), whose presence is limited within the genus; and a novel type of Flp/Tad pilus, partially different from the one described in *P. aeruginosa*. Furthermore, we explored the phylogenetic distribution of the most relevant ECM components in nearly 600 complete *Pseudomonas* genomes. Our analyses show that *Pseudomonas* populations contain a diverse set of gene/gene clusters potentially involved in the formation of their ECMs, showing certain commensal versus pathogen lifestyle specialization.

Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto RTI2018-093991-B-I00. E B-R es receptora del contrato FPU16/05513.

PC2.4. Caracterización de regiones funcionales en el núcleo amiloide de TasA y su importancia estructural y ecológica para el proceso de polimerización e interacción con la planta

J. Cámara-Almirón^{*1}, N. El Mammeri², A. de Vicente¹, A. Loquet², D. Romero¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"-Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur, 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071 Malaga, Spain.*

²*L'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-Objets (CBMN), Unité Mixte de Recherche (UMR) 5248, University of Bordeaux, Pessac, France*

Bacillus subtilis es un agente de control biológico con capacidad para producir una batería de metabolitos secundarios. En paralelo, se ha demostrado que la capacidad de formación de biofilm sobre la superficie de la planta contribuye positivamente a dicha actividad de biocontrol. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado el papel del amiloide funcional TasA, principal componente proteico de la matriz extracelular (MEC) del biofilm, en la persistencia, adhesión y colonización por parte de *Bacillus* de la filosfera, por una doble función estructural y celular.

Con el objetivo de definir los dominios dentro de la proteína relevantes en el proceso de polimerización de TasA, hemos llevado a cabo un estudio sobre la caracterización de variantes estructurales de esta proteína. Un primer análisis bioinformático indicó la presencia de regiones con tendencia a la agregación y una repetición aminoacídica imperfecta dentro del núcleo amiloide de la proteína (definido previamente), dos atributos importantes en el proceso de amiloidogénesis. Los resultados que hemos obtenido demuestran cómo ciertos aminoácidos específicos de las repeticiones imperfectas, están involucrados en la formación de biofilm y en la función estructural de TasA, permitiendo la correcta localización de la proteína en la MEC. Además, el estudio de las regiones amiloidogénicas mediante el uso de péptidos sintéticos corroboran la importancia de estas regiones para el proceso de agregación, demostrando la importancia del núcleo amiloide para la función estructural de TasA. La caracterización biofísica de estas variantes estructurales mediante distintas técnicas (microscopía electrónica de transmisión, unión a colorantes específicos, estudios de agregación o estructura secundaria, etc.) revelan que estas versiones mutadas de TasA están alteradas en su capacidad para formar fibras, dando lugar a filamentos que pierden características típicamente asociadas a las proteínas amiloides.

En conclusión, este trabajo demuestra la importancia que tienen regiones y aminoácidos específicos dentro del núcleo amiloide de TasA en el proceso de polimerización y, por consiguiente, en el papel ecológico que desempeña esta proteína en la interacción de *Bacillus* con la planta.

Este trabajo está financiado por los proyectos: AGL2016-78662-R y PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación; y la European Research Council Starting Grant BacBio 637971.

PC2.5. Mejora genética de *Bacillus amyloliquefaciens* UMAF6639 para aumentar su capacidad de biocontrol

M. Grifé-Ruiz*, D. Vela-Corcía, J. Hierrezuelo-León, A. Pérez-García, A. de Vicente, D. Romero

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Email: montsegrife@uma.es

El uso de microorganismos para hacer frente a las distintas enfermedades de las plantas causadas por fitopatógenos ha surgido en las últimas décadas como una de las mejores alternativas en el desarrollo de una agricultura sostenible, reduciendo el uso indiscriminado de compuestos químicos y con ello, disminuyendo los efectos negativos que éstos presentan tanto en el medio ambiente como en el desarrollo de resistencias de los patógenos a los tratamientos empleados hasta la fecha.

Las cepas englobadas dentro del grupo de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* son bacterias Gram positivas asociadas a plantas, reconocidas como agentes de biocontrol que destacan por su actividad antagonista frente a distintos patógenos (tanto fúngicos como bacterianos), así como por la liberación de sustancias capaces de estimular el crecimiento y la respuesta inmune de las plantas.

La capacidad de colonización de las distintas superficies de la planta y la organización en comunidades complejas (biofilms), así como la formación de endosporas como estructuras de resistencia, plantea a estos microorganismos como una buena opción para la formulación de preparados comerciales que puedan ser utilizados para frenar la infección de las plantas por parte de microorganismos fitopatógenos. Estudios previos en el grupo de investigación han demostrado como estas bacterias, en concreto la cepa *B. amyloliquefaciens* UMAF6639, presentan una gran capacidad de biocontrol derivada principalmente de la producción de lipopéptidos (fengicinas, surfactinas e iturinas), actuando como antagonistas de distintos microorganismos sobre todo en plantas de la familia de las cucurbitáceas.

Por ello, el principal objetivo de este trabajo se centra en la mejora genética de dicha cepa para obtener mutantes con mayor actividad antimicrobiana. La obtención de estos mutantes se ha realizado utilizando técnicas de mutagénesis aleatoria, que nos permitan poder comercializar dichos microorganismos en el marco legal actual. Una vez identificados los derivados con mayor actividad antimicrobiana, se está realizando su caracterización para determinar los cambios genéticos que justifican el aumento de su capacidad de biocontrol, profundizando así en los distintos mecanismos responsables de la actividad antagonista de dichas cepas.

Este trabajo ha sido financiado por el contrato 8.06/60.4086 financiado por la empresa biotecnológica KOPPERT B. V. (Países Bajos).

PC2.6. Actividad y efecto de nanopartículas de óxido de cobre frente a bacterias fitopatógenas.

I. Ramírez-Novillo^{*1,2}, I. Navarro-Herrero², E.J. Carrasco-Correa¹, E.F. Simó-Alfonso¹, E. Marco-Noales².

¹ Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València, Burjassot, Valencia, España.

² Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). España.
E-mail: iciar.ramirez@uv.es

En las últimas décadas, la Nanotecnología se ha convertido en una de las disciplinas más revolucionarias en el desarrollo de nuevos materiales. Debido a su pequeño tamaño (1-100 nm), las nanopartículas (NPs) presentan diversas propiedades, biológicas y físico-químicas, diferentes a los materiales a nivel macroscópico, lo que las dota de especial interés para muchos sectores como la industria farmacéutica, alimenticia, la biomedicina o las ciencias medioambientales.

Una de las problemáticas más importantes a las que se enfrenta el sector agrario es la creciente resistencia a los productos fitosanitarios y su efecto nocivo para el medioambiente. Las NPs metálicas y de óxido de metal se presentan como una de las alternativas más prometedoras debido a su efecto antibacteriano y antifúngico, obteniéndose una mayor eficiencia de control a dosis más reducidas que producen una menor contaminación medioambiental. En este trabajo se estudia el efecto de NPs de óxido de cobre (CuONPs), que tienen la ventaja adicional de su sencilla y económica síntesis, frente a diversas bacterias fitopatógenas de gran interés como son *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. arboricola* pv. *pruni* y *Xylella fastidiosa*. En primer lugar, se sintetizaron y caracterizaron morfológicamente las CuONPs. Una vez definidas sus características físico-químicas, se analizó la viabilidad y la cinética de crecimiento de seis cepas de las especies bacterianas seleccionadas frente a un rango de concentraciones de CuONPs. Se observó una drástica disminución del crecimiento en todos los casos, si bien a concentraciones de NPs significativamente diferentes en función de la cepa ensayada. Se determinó entonces la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se estableció entre 24 y 32 ppm para las diferentes cepas de *X. fastidiosa* (similar entre cepas de diferentes subespecies), en 45 ppm para la cepa de *X. arboricola* pv. *pruni* y en 59 ppm para la de *X. citri* subsp. *citri*; de modo destacado, la CMI de la cepa de *E. amylovora* fue casi 10 veces mayor que la de *X. fastidiosa*, situándose en torno a 210 ppm. Ya que una posible explicación a la inhibición del crecimiento por parte de las NPs es la interacción directa con la superficie de la membrana externa de las bacterias, y la formación de especies reactivas del oxígeno derivada de la presencia de estos óxidos, se va a hacer un seguimiento del efecto de las NPs en la morfología de las células bacterianas mediante microscopía electrónica de transmisión. Además, se van a iniciar ensayos *ex planta* e *in planta* aplicando concentraciones de NPs superiores a las CMIs mediante pulverización y evaluando su capacidad de penetración en el tejido.

Agradecimientos

I. Ramírez-Novillo, E.J. Carrasco-Correa y E.F. Simó-Alfonso agradecen el soporte financiero RTI-2018-095536-B-100 otorgado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU).

PC2.7. Promoción del crecimiento vegetal y biocontrol de fitopatógenos por la actividad de tres cepas de los géneros *Peribacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*

M. Rodríguez^{1,2*}, I. Llamas^{1,2}, V. Béjar^{1,2}, I. Sampedro^{1,2}

¹Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada

²Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Granada

E-mail: mrodriguez@ugr.es

La creciente demanda de alimentos de origen vegetal obliga a los productores a emplear métodos que aumenten la producción y eviten las pérdidas por fitopatógenos. Durante años se han utilizado sistemas de fertilización inadecuados que terminan por contaminar las aguas subterráneas y acidificar el suelo, haciéndolo inservible para posteriores cultivos. Recientemente se han utilizado bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*plant growth promoting bacteria*, PGPB) como una alternativa a estos tratamientos, puesto que ejercen efectos beneficiosos para las plantas. Por su parte, muchos fitopatógenos bacterianos regulan la producción de factores de virulencia mediante sistemas de comunicación dependientes de densidad celular que están mediados por moléculas de tipo *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs), un fenómeno conocido como *quorum sensing* (QS). Por ello, el uso de microorganismos que realicen una degradación enzimática de AHLs o *quorum quenching* (QQ), supone una alternativa muy prometedora al uso de antibióticos.

El grupo de investigación BIO-188 de la Universidad de Granada trabaja en el estudio de una alternativa ecológica y sostenible para combatir las infecciones por fitopatógenos basada en el empleo de bacterias procedentes de ambientes hipersalinos que tengan tanto actividad promotora del crecimiento vegetal como la capacidad de inhibir la virulencia de los fitopatógenos más relevantes en agricultura mediante QQ. Partiendo de una colección de más de 300 aislados de estos ambientes, se analizaron dichas actividades y se seleccionaron tres cepas por su elevada actividad promotora del crecimiento vegetal y *quorum quenching in vitro*: *Peribacillus* sp. N3, *Pseudomonas* sp. P6, *Staphylococcus* sp. EN21.

Con el fin de estudiar la actividad PGP de las tres cepas *in vivo*, se realizaron ensayos de *biopriming* en semillas de tomate, de bacterización de plantas de tomate, y ensayos relacionados con la colonización de la raíz de plantas de tomate. Por su parte, la actividad QQ se caracterizó mediante ensayos de degradación *in vitro* de AHLs procedentes de extractos de cultivos de los fitopatógenos más relevantes en agricultura, utilizando técnicas de difusión en placa. También, se realizaron ensayos de infección en frutos, raíces, tubérculos y plantas con cocultivos de cada una de las cepas y los fitopatógenos *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, para determinar su capacidad de interferir en la patogenicidad de éstos.

Los resultados obtenidos mostraron que las tres cepas tienen una gran actividad promotora del crecimiento tanto en semillas como en plantas de tomate, así como la capacidad de colonizar la raíz de las plantas. Igualmente, se observó una elevada versatilidad para interferir en la virulencia de diversos fitopatógenos en frutos, raíces, tubérculos y planta. Por tanto, estos resultados demuestran el potencial de estas tres cepas para ser utilizadas en agricultura, constituyendo así una prometedora alternativa al uso excesivo de fertilizantes y antibióticos en los cultivos de plantas.

PC2.8. Aplicación foliar de ARN exógeno: una nueva herramienta para el silenciamiento génico en *Podosphaera xanthii*

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

Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC)
E-mail: laura110493@uma.es

Los oídios son hongos fitopatógenos biotrofos obligados que infectan hojas, tallos, flores y frutos de plantas económicamente importantes, llegando a ser uno de los grupos de patógenos de plantas de mayor relevancia en el sector hortofrutícola. En España y en las principales áreas productoras del mundo, el cultivo de las cucurbitáceas se ve afectado, entre otros problemas, por *Podosphaera xanthii*, identificado como el principal agente causal de oídio en estos cultivos. A pesar de los esfuerzos invertidos en programas de mejora genética, la aplicación de fungicidas sigue siendo la principal práctica para el manejo de esta enfermedad tan importante para las cucurbitáceas. No obstante, la eficacia del control químico se ha visto condicionada por la facilidad con la que *P. xanthii* desarrolla resistencias. El desarrollo de nuevas estrategias de control requiere una buena comprensión de la biología del agente patógeno responsable. En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en descifrar las bases moleculares de la patogénesis de *P. xanthii*. Se han obtenido datos de secuencias como los transcriptomas epífitico y haustorial y del genoma, y desarrollado herramientas específicas para el análisis funcional de genes como protocolos de transformación y de silenciamiento génico. En este estudio, nos hemos centrado en la puesta a punto de un ensayo silenciamiento génico basado en la aplicación de ARN de doble cadena (dsRNA) sintetizado *in vitro* sobre la superficie foliar del huésped, con objeto de provocar la degradación del ARN mensajero del gen diana y, en consecuencia, atenuar el crecimiento del hongo si el gen es relevante para la interacción. La aplicación foliar de dsRNA dirigido a los genes fúngicos esenciales β -tubulina (*PxTUB2*) y eburicol 14 α -demetilasa (*PxCYP51*) desencadenó una notable reducción del crecimiento fúngico. Desde nuestra perspectiva, la aplicación directa de dsRNA exógeno es el método de silenciamiento génico más sencillo en *P. xanthii* y probablemente será una herramienta muy útil para el análisis funcional de genes en otras especies de oídios.

Este trabajo ha sido financiado por una ayuda de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) (AGL2016-76216-C2-1-R), cofinanciada con fondos FEDER (EU). Laura Ruiz Jiménez es beneficiaria de un contrato predocotral (BES-2017-080414) para la formación de doctores del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

PC2.9. Estudios de compatibilidad entre distintas cepas de *Pseudomonas chlororaphis* asociadas a raíz de aguacate**R. Villar Moreno*, E. Arrebola, A. de Vicente y F. M. Cazorla***Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga**Email: Cazorla@uma.es*

El aguacate (*Persea americana*) es un frutal tropical de gran rentabilidad económica, localizado principalmente en el sur de España. Desde el punto de vista fitosanitario, uno de los factores limitantes en su cultivo, y que provoca importantes pérdidas económicas, es la enfermedad denominada podredumbre blanca radicular producida por el hongo de suelo *Rosellinia necatrix*, que afecta a las raíces del árbol llegando a provocar su muerte. Previamente, se ha obtenido una colección de bacterias aisladas desde la rizosfera de aguacates sanos en zonas con *R. necatrix*, en la que se observa una elevada frecuencia de aislados pertenecientes a la especie *Pseudomonas chlororaphis*, especie que posee actividades beneficiosas para las plantas. Entre ellas destacan tres cepas de *P. chlororaphis* (PcPCL1606, PcPCL1601 y PcPCL1607), y que presentan actividad de control biológico frente a *R. necatrix* y otros hongos fitopatógenos, así como la producción de diferentes metabolitos secundarios antimicrobianos, como fenazinas o 2-hexil, 5-propil resorcinol (HPR).

Como objetivo principal, se pretende profundizar en las interacciones que tienen lugar entre las distintas cepas de *P. chlororaphis* en el hábitat rizosférico, con la planta y con los patógenos de suelo, para poder dilucidar las bases de la prevalencia de esta especie en la rizosfera de aguacate. Para ello, se llevará a cabo una estrategia que simplifique la complejidad de las comunidades microbianas, desarrollando un consorcio viable con las 3 rizobacterias seleccionadas de *P. chlororaphis* PcPCL1606, PcPCL1601 y PcPCL1607.

Este estudio se inició con análisis bioinformáticos de comparativa genómica y de enriquecimiento metabólico de estas cepas, que muestran un número de genes únicos que determinarían sus fenotipos diferenciales. Por otro lado, se han llevado a cabo los trabajos para determinar la compatibilidad de las 3 cepas y su comportamiento de forma individual y conjunta en relación con fenotipos potencialmente implicados en la capacidad de biocontrol. Entre otros, se ha evaluado la compatibilidad entre cepas en placa, la competitividad en medio líquido, la formación de biofilm y el movimiento tipo swarming de las cepas en solitario y combinadas, así como la determinación del fenotipo dominante en las posibles combinaciones entre las 3 cepas. Estos ensayos permitirían la construcción de un consorcio microbiano constituido por las cepas estudiadas, para después estudiar sus distintas propiedades relacionadas con el control biológico y otras actividades beneficiosas para la planta.

PC2.10. Un método no invasivo para el estudio de interacciones microbianas y dinámica de biofilms.

C. Molina-Santiago¹, J. R. Pearson², A. I. Pérez-Lorente^{1*}, M. V. Berlanga-Clavero¹, A. de Vicente¹, D. Romero¹.

¹ Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071, Málaga, España.

² Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología, BIONAND, Málaga, España
E-mail: perezlorente@uma.es

En la naturaleza las bacterias se encuentran frecuentemente formando comunidades bacterianas, de la misma o diferentes especies, conocidos como biofilms. Estas comunidades representan una ventaja ecológica para las bacterias que lo constituyen, ya que les confiere protección frente a agresiones externas y facilitan la captación y uso eficiente de los recursos nutricionales disponibles. Las interacciones de tipo cooperativas o competitivas inter o intra-específicas pueden alterar notablemente la estructura de la comunidad y por tanto la forma en que se relaciona con el entorno, un hecho de vital importancia en ecología microbiana. Hasta ahora, la mayor parte de la información sobre este tipo de interacciones se ha obtenido mediante técnicas microbiológicas clásicas centradas en cambios macroscópicos. En los últimos años, la utilización de diferentes técnicas microscópicas ha permitido indagar en aspectos como la comunicación celular bacteriana o la heterogeneidad de la población. Sin embargo, nuestra capacidad para el estudio a nivel celular procesos como el crecimiento bacteriano, la dinámica de los biofilms y la visualización de estas estructuras en 2D y 3D *in vivo* es aún limitada.

En este trabajo presentamos el desarrollo de una metodología no invasiva que permite estudiar la evolución-progresión de la formación de biofilms o la dinámica de las interacciones bacterianas que tienen lugar en estas comunidades. Igualmente, mostramos el uso de un innovador script de procesamiento de imágenes (BacLive, <https://github.com/BacLive>) para poder analizar los datos obtenidos a partir de estudios de microscopia de fluorescencia de alta resolución de una forma rápida y sencilla empleando Fiji/ImageJ. BacLive ofrece al usuario una estimación del movimiento de la población durante su crecimiento para calcular las variaciones de posición en el eje Z a lo largo del tiempo. De esta forma, sólo se adquieren las secciones en el plano Z correspondientes a las zonas donde hay crecimiento microbiano y no aquellas secciones sin información útil, lo que reduce significativamente el número de datos almacenados y el procesamiento posterior para generar una imagen 3D.

Esta metodología se ha empleado para estudiar la evolución de la interacción entre la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* y la bacteria beneficiosa *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, analizando el efecto inhibidor de FZB42 en dicha interacción. Análogamente, hemos utilizado BacLive para estudiar el desarrollo y evolución de las distintas subpoblaciones existentes en un biofilm de *Bacillus subtilis* NCIB3610 mediante la utilización de fusiones transcripcionales con proteínas fluorescentes. Con estos ejemplos confirmamos la utilidad de BacLive en la generación de imágenes en 2D y 3D de forma simple y eficiente y su empleabilidad en estudios de ecología microbiana.

PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación y la ERCouncil StG (BacBio 637971). A.I. Pérez-Lorente (FPU19/00289) y beca iniciación investigac. UMA

PC3.1. *Rhizobium laguerreae* mejora del contenido nutricional de *Lactuca sativa* L. bajo condiciones de estrés salino

M. Ayuso-Calles ^{*1}, I. García-Estévez², A. Jiménez-Gómez¹, J. D. Flores-Félix¹, M. T. Escribano-Bailón², R. Rivas¹

¹Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca. ²Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. E-mail: miguelac96@usal.es

Uno de los mayores impactos que previsiblemente tendrá el actual cambio climático será la modificación en los patrones agrícolas vigentes. Los usos del suelo y los cultivos utilizados se verán desplazados o reemplazados debido a cambios en el régimen de precipitaciones y a una modificación de los parámetros edáficos. Así, se está viendo un incremento de las zonas sometidas a condiciones de sequía y salinidad, reduciéndose a su vez, la superficie agraria óptima para desarrollar la agricultura en condiciones adecuadas. Además, se prevé que para el año 2050 la población mundial alcance los 9.000 millones de personas. Este aumento de la población mundial y su demanda asociada de consumo de alimentos, hacen necesario el desarrollo de técnicas que permitan el incremento del nivel productivo y el crecimiento de cultivos en condiciones de estrés. En este sentido, una de las alternativas con más potencial para asegurar la productividad y sostenibilidad de los cultivos se basa en el uso de biofertilizantes, formados por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), capaces de mejorar el desarrollo y el contenido nutricional de las plantas con las que se asocian.

Este trabajo analiza el empleo de una cepa bacteriana, aislada del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., e identificada como *Rhizobium laguerreae*, tras la amplificación y secuenciación de gen ribosómico 16S y los genes *housekeeping atpD* y *recA*. La caracterización fenotípica de este aislado mostró su elevado potencial como PGPR, al presentar varios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, tales como: solubilización de fosfato, producción de sideróforos y de ácido indolacético. Del mismo modo, el análisis *in silico* del genoma de esta cepa indicó la presencia de importantes genes relacionados con la interacción planta-microorganismo, la calidad nutricional y desarrollo vegetal.

Su potencial fue evaluado mediante ensayos en cámara iluminada, en los que se observó la capacidad de este aislado para colonizar el sistema radicular de la lechuga y para mejorar su crecimiento durante los primeros estadios vegetales. Asimismo, un experimento bajo condiciones de invernadero permitió determinar que la inoculación con esta cepa de *R. laguerreae* provocaba incrementos en diferentes variables de interés para el crecimiento vegetal, como el número de hojas o el peso húmedo y seco de la parte aérea, tanto en plantas crecidas bajo salinidad (100 μ M NaCl) como en condiciones normales. El análisis de las hojas de las lechugas desarrolladas en invernadero determinó que la inoculación con esta cepa mejoraba su contenido nutricional, al aumentar la concentración de diversos compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, como ácidos fenólicos y flavonoides.

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos AGL2015-70510-R del MINECO (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España) y VA2I / 463AC06 de la Diputación de Salamanca y Programas de Investigación Estratégica para Unidades de Excelencia de la Junta de Castilla y León (CLU-2018 -04).

PC3.2. Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* a diferentes hospedadores.

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

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

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 ahora en bacteroide, fija nitrógeno y lo cede a la planta a cambio de compuestos carbonados. El resultado global del sistema simbiótico rizobio-leguminosa es el mismo independientemente del macrosimbionte, el intercambio del nitrógeno a cambio de los compuestos carbonados de la planta; sin embargo, está envuelto en matices derivados de diferencias en el entorno ofrecido por la planta. 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 reveló la existencia de diferencias en la expresión de un número significativo de proteínas codificadas en distintas partes del genoma bacteriano. Entre las proteínas bacterianas de expresión diferencial se han identificado proteínas de respuesta a estrés, un regulador transcripcional de tipo GntR, y otras proteínas que podrían tener un papel en el metabolismo de C/N en el bacteroide (una posible diaminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa o DABA-AT codificada por el gen *rlvc_00189* localizado en el plásmido simbiótico).

El análisis funcional de la proteína C189 codificada por el gen *rlvc_00189* se ha abordado estudiando: i) el fenotipo simbiótico de mutantes defectivos en este gen y cepas de sobreexpresión, ii) la actividad DABA-AT y γ -aminobutirato aminotransferasa (GABA-AT) de extractos celulares, bacteroides y proteína purificada iii) el crecimiento en vida libre en diferentes fuentes de nitrógeno, y iv) el efecto de la expresión de C189 en otra cepa de *Rlv* carente de actividad GABA-AT. Los resultados sugieren que C189 es una enzima con actividad DABA-AT de expresión simbiótica.

También se ha estudiado la regulación de la expresión de *rlvc_00189* fusionando su promotor a un gen delator. En vida libre no se ha observado expresión en medios de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno evaluadas. En simbiosis se expresa notablemente más en nódulos de guisante que en los de lenteja, incluso cuando se introduce este sistema en otra cepa de *Rlv* carente de este gen.

Puesto que este gen parece ser importante para la simbiosis con guisante, pero no con lenteja, queremos saber cómo de representado está este gen en rizobios aislados de plantas de guisante y lenteja inoculadas con suelos de la zona de Tierra de campos. Para ello se está estudiado su presencia en los aislados mediante PCR y *Southern blot*. El análisis de estas poblaciones de rizobios nos va a permitir también obtener inoculantes eficaces que aumenten la productividad de leguminosas reduciendo el uso de fertilizantes, a partir de la microbiota autóctona del lugar.

PC3.3. Efecto de los Sistemas de Secreción Tipo VI (T6SS) de rizobios en la simbiosis con leguminosas

B. F. S. De Sousa^{1*}, L. Tighilt^{1,2}, Lucía Domingo-Serrano¹, Alvaro Salinero-Lanzarote¹, J. M. Palacios¹, L. Rey¹

¹*Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal (ETS de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas) y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid.*

²*Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, 06000 Bejaia, Argelia.*
E-mail: bruna.sdesousa@alumnos.upm.es

Los rizobios son bacterias simbióticas capaces de fijar nitrógeno atmosférico y aportarlo a su leguminosa hospedadora. La asociación se establece a través de interacciones con señales muy específicas, como los factores Nod, exopolisacáridos y secreción de proteínas producidos por los rizobios. El sistema de secreción tipo VI (T6SS) actúa como una nanojeringa capaz de inyectar proteínas (efectores) al espacio extracelular o a otras bacterias o a eucariotas, generando una ventaja adaptativa a la bacteria que lo posee. Muchos efectores tienen actividad antibacteriana como DNAsas, amidasas, peptidasas y proteínas formadoras de poros. A pesar de que más del 60% de los rizobios codifican un T6SS en su genoma, su función no se conoce bien. Nuestros modelos son *Rhizobium etli* bv. *mimosae* Mim1 (ReMim1)/*Phaseolus vulgaris* y *Bradyrhizobium* sp. A16 (Br.A16)/*Lupinus angustifolius*. Estos rizobios presentan un T6SS y se están caracterizando posibles efectores que podrían tener relevancia en la simbiosis. Recientemente hemos demostrado que el T6SS de *R. etli* Mim1 tiene un papel positivo en la simbiosis ya que mutantes que no tienen un T6SS funcional indujeron menos nódulos y resultaron en una menor acumulación de peso seco en la planta que la cepa parental. En esta cepa se han obtenido dos mutantes en posibles efectores: un mutante defectivo en el gen *re482* que codifica una proteína con dominio DNasa; y otro portador de una delección de cuatro genes (*re484-489*) de función desconocida. Comparadas con las inoculadas con cepa parental, las plantas de judía inoculadas con las cepas mutantes acumularon mayor biomasa en la parte aérea y produjeron un mayor número de nódulos. Estos datos sugieren que estos posibles efectores de ReMim1 no tienen un papel beneficioso en la simbiosis, y que por tanto podrían existir otros efectores no identificados que sí lo tuvieran.

En *Bradyrhizobium* sp. A16 se han obtenido dos mutantes en genes del T6SS: un mutante afectado en el gen estructural *vgrG*, y otro en el gen *bra16.3894*, que codifica para una proteína con un motivo metiltransferasa. La inoculación de *L. angustifolius* con la cepa *vgrG*⁻, carente de T6SS funcional, produjo plantas con una reducción en el peso seco en la parte aérea y con nódulos blancos, lo que indica que el sistema T6SS de esta cepa contribuye a la efectividad de la simbiosis. El mutante en el gen *bra16.3894* originó también una disminución en la acumulación de peso seco de la planta, así como alteraciones en el tamaño de los nódulos, lo que sugiere que este gen podría corresponder a un efector del T6SS con un papel positivo en la simbiosis.

PC3.4. Estudios *in silico* e *in vivo* del sistema de secreción de tipo VI de *Sinorhizobium fredii* USDA257

N. Moreno-de Castro*, A. Sánchez-Reina, I. Jiménez Guerrero, F. Pérez-Montaño, P. Bernal.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

E-mail: natmorde1@alum.us.es

El sistema de secreción de tipo VI (T6SS) es una maquinaria bacteriana usada para inyectar toxinas/efectores al interior de células dianas. La principal función de este sistema es la competencia interbacteriana (toxinas), aunque también está involucrado en patogénesis, ya que algunas de las proteínas translocadas tienen como diana células eucariotas (efectores). El T6SS es un complejo multiproteico formado por trece constituyentes principales (TssA-M) que se ensamblan formando tres partes: el complejo de membrana, la placa base y la cola. Esta última está formada por un tubo interno (formado por anillos de la proteína Hcp), que acaba en punta (trímero de VgrG coronado por la proteína PAAR). Los efectores/toxinas se transportan asociados a algunas de estas tres estructuras del T6SS y pueden aparecer fusionados en el extremo C-terminal de las mismas; en este caso, las proteínas estructurales se denominan evolucionadas (Hcp_e, VgrG_e o PAAR_e).

El objetivo de este estudio es caracterizar el T6SS de *Sinorhizobium fredii* USDA257 para conocer su papel en la nodulación y la fijación de nitrógeno en leguminosas. USDA257 es una estirpe de crecimiento rápido aislada por primera vez de nódulos de soja salvaje. Este rizobio es un excelente modelo para estudiar el papel de este sistema en simbiosis, ya que cuenta con amplio rango de hospedador y posee un T6SS completo.

En este trabajo identificamos, mediante análisis bioinformático, los genes que codifican las proteínas estructurales necesarias para ensamblar un T6SS funcional en *S. fredii* USDA257. Además, identificamos potenciales efectores de interacción con plantas. Entre ellos destacamos la proteína codificada por el gen USDA257_c28470 (Tre2) con homología estructural con la enzima GH74, que posee actividad hidrolasa con un dominio de unión a xiloglucanos (componente principal de la hemicelulosa), capaz de hidrolizar la pared vegetal. Además, el dominio Ct de VgrG_e de USDA257 tiene homología con un dominio que se encuentra en proteínas pertenecientes a la superfamilia FhaB con capacidad de unirse a carbohidratos, concretamente celulosa y ácido poligalacturónico. Estos resultados sugieren que estos efectores podrían estar involucrados en la degradación de la pared celular vegetal y por tanto en el proceso de simbiosis, ayudando a la bacteria en la formación del tubo de infección.

Para esclarecer las condiciones en las que se activa el T6SS de USDA257, se realizaron ensayos de expresión de los promotores del T6SS en diferentes medios y fases de crecimiento. Los resultados muestran que el sistema se induce en medios de cultivo menos ricos, así como en fase de crecimiento estacionaria. Por último, para conocer la función del T6SS de USDA257 en simbiosis, llevamos a cabo ensayos de nodulación usando distintas especies y cultivares de plantas leguminosas. En varias de las leguminosas ensayadas, las plantas inoculadas con un mutante estructural del T6SS (*tssA*) mostraron un número menor de nódulos y un menor desarrollo de la parte aérea que aquellas inoculadas con la estirpe silvestre. Estos resultados preliminares sugieren que el T6SS de este rizobio juega un papel positivo en la nodulación.

PC3.5. Cepas de *Trichoderma* endófitas de trigo incrementan la tolerancia de esta planta al estrés hídrico.

A. Pedrero-Méndez*, M. Illescas, V. Hernández-Ruiz, R. Hermosa, E. Monte.

Departamento de Microbiología y Genética. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca
E-mail: alberto.pedrerom@usal.es

Trichoderma es un género de hongos filamentosos que incluye especies destacadas como agentes de control biológico de fitopatógenos de interés agrícola. Algunas cepas, poseen la capacidad de colonizar la rizosfera de las plantas con efectos positivos sobre las mismas, tales como promoción del crecimiento y activación de defensas frente a estreses bióticos y abióticos. Entre estos últimos, la sequía es una de las principales limitaciones en la producción de cultivos. En este trabajo se han incluido, en ensayos de invernadero, cuatro cepas de *Trichoderma* endofíticas, aisladas a partir de raíces de plantas de trigo procedentes de un ensayo de campo realizado en la campaña 2019-2020 bajo condiciones de no riego, para evaluar su efecto sobre el crecimiento de plantas de trigo de la variedad Basileo y su capacidad para incrementar la tolerancia del trigo a la sequía. Inicialmente, las cepas se identificaron molecularmente como *T. harzianum* T136, *T. simmonsii* T137, *T. afroharzianum* T138 y *T. harzianum* T139. Estas cepas se aplicaron al sustrato de crecimiento de las plantas, tanto individualmente como en forma de mezcla, y el estrés hídrico, establecido como ausencia de riego durante 2 semanas, se inició a las 3 semanas de la siembra. Los análisis de datos relativos a parámetros fisiológicos, obtenidos en plantas de 5 semanas de edad, muestran que las cepas T137 y T139 son capaces de aumentar significativamente el crecimiento de las plantas en ausencia de estrés, pero también incrementaron la tolerancia de las plantas a la sequía. A tenor de los resultados, se está utilizando el material vegetal recogido de los ensayos para explorar los mecanismos moleculares implicados en estos efectos.

Agradecimientos: Junta de Castilla y León (contrato puente de Alberto Pedrero en el proyecto Escalera de Excelencia CLU-2018-04 de la Unidad de Producción Agrícola y Medio Ambiente AGRIENVIRONMENT) y Ministerio de Ciencia e Innovación (RTI2018-099986-B-I00) a través de FEDER.

PC3.6. Análisis del Potencial de Aislados del Género *Rhizobium* como Biofertilizantes de Trigo Duro (*Triticum durum*)

E. Peral-Aranega*; P. García-Fraile; R. Rivas.

Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

E-mail: epa@usal.es

El desafío de alimentar a una población creciente nos impulsa a desarrollar métodos para mejorar el rendimiento de los cultivos agrícolas. Los cereales suponen la mayor fuente de carbohidratos, proteínas, vitamina B y minerales en la alimentación humana, destacando entre ellos el maíz, el trigo y el arroz. Los biofertilizantes formulados con bacterias han demostrado ser de gran utilidad para mejorar la producción y calidad de las cosechas, entre ellos destaca el género *Rhizobium*. Su papel como nodulador de legumbres, y los beneficios obtenidos de su aplicación sobre estos cultivos están ampliamente descritos, pero recientes estudios indican que también pueden actuar como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGP) de hortalizas y cereales.

Por este motivo, en este proyecto se decidió aislar endófitos de nódulo de raíz de lenteja procedente de la I.G.P. de La Armuña, variedad reconocida por la alta calidad nutricional de sus semillas. Estos aislados fueron analizados con la técnica MALDI-TOF y mediante la secuenciación del gen ribosómico 16S, identificándose tres cepas diferentes pertenecientes al género *Rhizobium*. Estos aislados se caracterizaron fenotípicamente para determinar su potencial PGP, para ello se emplearon medios específicos en los que se comprobó la capacidad de las mismas para solubilizar fosfatos y potasio, sintetizar sideróforos y producir celulosa. También se analizó la capacidad de estas cepas para producir *biolfims*, sintetizar auxinas y para intervenir en la ruta del etileno, a través de la síntesis de la enzima ACC-desaminasa.

Posteriormente, se evaluó la efectividad de nodulación de las cepas mediante un ensayo *in planta* con el objeto de comprobar la capacidad de las cepas para asociarse al cultivo. Otro parámetro que se consideró de relevancia fue el efecto de las mismas en los primeros estadios de crecimiento del cultivo, por lo que fueron inoculadas en plántulas de trigo pregerminadas, y se analizó el efecto sobre las mismas a lo largo del tiempo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó la cepa con mejor potencial PGP para continuar con los ensayos en trigo. El genoma de esta cepa fue secuenciado y analizado en búsqueda de genes relacionados con el desarrollo vegetal y su posible influencia sobre la calidad del grano. También, se evaluó la capacidad de colonización de la raíz de trigo mediante el marcado de la cepa con una proteína fluorescente, inoculación en plántulas y posterior visualización al microscopio a diferentes tiempos.

Finalmente, la cepa fue inoculada en plántulas de trigo y de lenteja, las cuales se dejaron crecer hasta la madurez en invernadero, recolectándose el total la parte aérea de la misma. La parte aérea fue pesada y medida, mientras que las semillas fueron recolectadas, contadas y pesadas, posteriormente se analizaron físico-químicamente para evaluar su calidad. Se obtuvieron resultados prometedores tanto en los aspectos de producción como de calidad de la semilla.

Los autores agradecen a la Diputación de Salamanca los fondos para llevar a cabo esta investigación a través del proyecto 18VB2I/463AC06 de la III Convocatoria de Proyectos de Investigación orientados a ofrecer soluciones al sector primario “VIII Centenario” de la Universidad de Salamanca.

PC3.7. Bacterias endofíticas aisladas del interior de zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott) para la promoción del crecimiento vegetal

R. Roca Couso*; J. D. Flores Félix; P. García Fraile; R. Rivas.

Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

rocioroca@usal.es

La agricultura es una actividad fuertemente ligada al desarrollo de la población humana. Sin embargo, el crecimiento exponencial de la humanidad ha provocado una reducción en la disponibilidad de alimentos. En este sentido, la agricultura deberá hacer frente en los próximos años al desafío de alimentar a una población cada vez mayor, a la vez que mantiene los recursos disponibles del planeta y respeta el medioambiente. Así, en los últimos años han surgido los llamados biofertilizantes, una alternativa sostenible que ayudaría a incrementar la producción de los cultivos (García-Fraile et al., 2015).

El objetivo del trabajo es la búsqueda de nuevas bacterias endofíticas aisladas del interior de zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott) con capacidad de promoción del crecimiento vegetal (PGP-*Plant Growth Promoting*). Para ello se evaluó la producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético (IAA) y fijación de nitrógeno. A continuación, se seleccionaron aquellas cepas que proporcionaron mejores resultados y se procedió al estudio de sus efectos en plántulas.

Los microorganismos fueron aislados del interior de muestras de tallo y raíz de individuos de zarzamora. Se obtuvieron 70 aislados cuya diversidad taxonómica fue evaluada mediante las técnicas MALDI-TOF, RAPD y secuenciación del 16S identificándose especies como *Neorhizobium galegae*, *Bacillus subtilis* y *Arthrobacter crystallopoietes*. A continuación, la producción de sideróforos fue estudiada con el medio M9-CAS-Agar dando que el 30,6% de las cepas eran productoras. La solubilización de los fosfatos fue estudiada con los medios PKVII, PKVIII y NBRIP, obteniéndose resultados positivos en el 34,6%, el 12% y el 1,3%, respectivamente. La producción de IAA se evaluó con el medio JMM para *Rhizobium* o medio JMM-DF sales para endófitos, añadiéndole triptófano a una concentración de 0,165 g/L. Por último, la fijación de nitrógeno fue evaluada de manera presuntiva con el medio JMM-DF sales sin añadir ninguna fuente de nitrógeno. A mayores, se estudió la capacidad de las cepas para colonizar tejidos vegetales. Para ello se hicieron ensayos en placas, en medios suplementados con los diferentes polisacáridos presentes en las células vegetales, la celulosa, el xilano y el almidón. Se obtuvo que el 54%, el 23% y el 76% eran capaces de hidrolizar estos componentes, respectivamente. Tras el análisis de los resultados, se seleccionaron 9 cepas para la inoculación de semillas esterilizadas en superficie. Las semillas pregerminadas en medio Agar-Agua fueron trasladadas a placas con medio Rigaud & Puppo, donde fueron inoculadas con cada una de las cepas seleccionadas. Las placas se incubaron en cámara iluminada, a temperatura y ciclos de luz controlados. Tras 7 y 14 días de incubación, se hicieron mediciones de la longitud de la parte aérea, radicular y del número de raíces secundarias, y se compararon con los resultados obtenidos de las plantas control.

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto PID2019-109960RB-100 y a los Programas de Investigación Estratégica por la Unidad de Excelencia de la Junta de Castilla y León (CLU-2018-04).

Referencias: Garcia-Fraile et al., 2015. AIMS Bioeng.2, 183–205.

PC3.8. Identificación de una tioesterasa de *Sinorhizobium meliloti* implicada en la síntesis del infoquímico 2-tridecanona.

L. M. Bernabéu-Roda¹, G. Rivera-Hernández², V. Cuéllar¹, C. Sohlenkamp², O. Geiger², I. M. López-Lara², M. J. Soto^{1*}.

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín. CSIC, Granada. ²Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca. México.
E-mail: mariajose.soto@eez.csic.es

El estudio de un mutante *fadD* de *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti* caracterizado por mostrar mayor movilidad en superficie que la cepa silvestre pero menor capacidad de formar biofilm y de colonizar raíces de alfalfa, reveló que *S. meliloti* produce metilcetonas volátiles y que la acil-CoA ligasa FadD contribuye a regular sus niveles. La acumulación en el mutante *fadD* de la metilcetona 2-tridecanona (2-TDC) permitió demostrar que este compuesto actúa como infoquímico en bacterias siendo capaz de alterar comportamientos bacterianos asociados a superficie y de dificultar el establecimiento de interacciones planta-bacteria tanto mutualistas como patogénicas. El objetivo de este trabajo ha sido identificar la ruta de síntesis de 2-TDC en *S. meliloti*.

En plantas de tomate silvestre, la síntesis de 2-TDC y otras metilcetonas requiere la participación de la tioesterasa MKS2 (Methyl Ketone Synthase 2), enzima clave que actúa sobre intermediarios de la síntesis de ácidos grasos. Un análisis *in silico* del proteoma de *S. meliloti* desveló que SMc03960, anotada como teórica proteína conservada de función desconocida, muestra homología con MKS2 y con tioesterasas bacterianas YbgC. Para investigar si SMc03960 presenta actividad tioesterasa, se ha sobre-expresado el gen en *Escherichia coli* y se han analizado los extractos lipídicos de cultivos mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS). Los resultados han revelado que la sobre-expresión de *smc03960* en *E. coli* da lugar a la formación de 2-TDC y otras metilcetonas, además de provocar la acumulación de ácidos grasos libres. Ensayos enzimáticos realizados con la proteína purificada demuestran que SMc03960 es una tioesterasa de amplia especificidad de sustrato, con preferencia por cadenas acilo de 14C.

Para conocer el papel de *smc03960* en *S. meliloti*, se han obtenido cepas derivadas de la estirpe silvestre y mutante *fadD* en las que el gen *smc03960* se ha inactivado o sobre-expresado en *trans*. La inactivación del gen reduce la capacidad de la bacteria de moverse en superficie pero no afecta su capacidad de establecer simbiosis con alfalfa. El análisis de metilcetonas presentes en el volatilo y extractos lipídicos de las distintas cepas ha revelado que la pérdida de función de SMc03960 no tiene efectos significativos en la producción de metilcetonas. Por el contrario, la sobre-expresión del gen provocó un incremento en los niveles de 2-TDC tanto en la cepa silvestre como en el mutante *fadD*. Estos resultados demuestran que SMc03960 contribuye a la producción de 2-TDC en *S. meliloti*, utilizando al menos intermediarios de la síntesis de ácidos grasos. No obstante, el hecho de que la inactivación de *smc03960* no afecte a la producción de 2-TDC es un indicativo de que en *S. meliloti* hay genes adicionales que participan en la producción de ésta y otras metilcetonas.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos BIO2013-42801-P y PGC2018-096477-B-I00 (MCIU/AEI/FEDER, UE) y por UNAM-PAPIIT (IN200819)-México.

PC4.1. La atenuación de la microbiota del xilema modifica la reacción de resistencia de un clon de olivo silvestre a la infección por *Verticillium dahliae*

M. Anguita-Maeso^{1*}, J. Luis Trapero¹, C. Olivares-García¹, D. Ruano-Rosa¹, E. Palomo-Ríos², R. M. Jiménez-Díaz^{1,3}, J. A. Navas-Cortés¹ and B. B. Landa¹

¹*Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas*

²*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora",
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Málaga.*

³*Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba.*

E-mail: manguita@ias.csic.es

El uso de cultivares o portainjertos de olivo resistentes a *Verticillium dahliae* (Vd) es la medida más práctica y eficiente para el control de la Verticilosis en olivar. Sin embargo, el papel de las comunidades microbianas del xilema en la reacción de resistencia del olivo a Vd no ha sido explorado hasta la fecha. Este trabajo se centra en dilucidar si la propagación *in vitro* de las plantas de olivo puede alterar la diversidad y composición de la microbiota habitante del xilema y si esos cambios pueden modificar la reacción de resistencia en un clon de olivo silvestre al patotipo defoliante (D) altamente virulento de Vd. Los resultados indicaron diferencias en las comunidades microbianas entre los diferentes métodos de propagación, aunque los mayores cambios ocurrieron en respuesta a la inoculación con Vd, independientemente de si la planta fue infectada o no por el patógeno y que resultó en un aumento significativo en la diversidad bacteriana en el xilema de plantas inoculadas con Vd. Por otro lado, se observó que las plantas de olivo micropropagadas en condiciones *in vitro* (alta asepsia) desarrollaron una reacción susceptible al patotipo D de Vd, caracterizada por síntomas severos de marchitez y una incidencia de infección vascular máxima. Asimismo, las plantas micropropagadas *in vitro* mostraron una disminución en el número total de OTUs en el xilema en comparación con el observado en el de las plantas propagadas en condiciones no asépticas. Globalmente, se identificaron 10 géneros bacterianos clave independientemente de la inoculación por Vd y el procedimiento de propagación de las plantas (*in vitro* frente a vivero), siendo *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Anoxybacillus*, *Staphylococcus*, *Methylobacterium*, *Methylobacterium* y *Bradyrhizobium* los más abundantes, en ese orden. *Pseudomonas* fue el género bacteriano predominante en plantas micropropagadas y *Anoxybacillus* se posicionó como una bacteria clave en plantas inoculadas con Vd independientemente de su forma de propagación. Nuestros resultados muestran por primera vez la rotura de la resistencia a Vd en un clon de olivo silvestre, que posiblemente esté asociada con una modificación del microbioma xilemático, lo que contribuye a un mejor conocimiento sobre el papel del microbioma del xilema puede tener en la estabilidad de la resistencia de olivo a Vd, lo que puede ser de utilidad para un manejo más eficiente de las enfermedades vasculares del olivo.

Estudio financiado por los proyectos XF-ACTORS 727987 (EU-H2020) y AGL2016-75606-R (MICINN y FEDER-EU).

PC.4.2. Análisis del metiloma de *Pseudomonas syringae*

N. López-Pagán^{1*}, M. A. Sánchez-Romero², G. Gutierrez², C. Spröer³, B. Bunk³, J. Casadesus², J. Ruiz-Albert¹, C. R. Beuzón¹

¹*Instituto 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.*

²*Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Avenida de la Reina Mercedes, 6, 41012, Sevilla, Spain.*

³*Central Services Microorganisms, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstr. 7 B, 38124 Braunschweig, Germany*

La metilación del ADN es el fenómeno epigenético mejor estudiado en bacterias. Su papel depende de la acción de metilasas de ADN que transfieren el grupo metilo desde S-adenosil-L-metionina (SAM) hasta el ADN. En función del nucleótido metilado pueden ser de tipo *dam* o *dcm* si transfieren el grupo metilo a un residuo de desoxiadenosina o desoxicitosina, respectivamente. Generalmente, reconocen secuencias específicas del ADN también denominadas motivos de metilación. En *E. coli* y *Salmonella* la metilación en motivos GATC llevada a cabo por Dam controla ciertos mecanismos de relevancia en bacterias, como el inicio de la replicación del cromosoma, la reparación del ADN o la expresión génica. En este último, el control viene dado por diferencias de metilación en los motivos presentes en las zonas promotoras de ciertos genes. De tal manera, los elementos que intervienen en la transcripción pueden reconocer patrones de metilación específicos y activar o reprimir su expresión. Se han identificado múltiples factores de transcripción cuya función se ha visto modulada por la presencia de patrones de metilación que, en última instancia, generan diferencias de expresión a nivel celular. Estas diferencias de expresión célula a célula pueden generar diferencias fenotípicas en la población sin originar cambios en el ADN, un fenómeno conocido como heterogeneidad fenotípica. En *P. syringae* nuestro laboratorio ha observado que tanto el sistema de secreción tipo III (T3SS) como el flagelo muestran heterogeneidad fenotípica durante la colonización del tejido vegetal. Para indagar en el posible control epigenético de este fenómeno, hemos secuenciado el metiloma de *P. syringae* e identificado sus motivos de metilación. Nuestro análisis también ha identificado los genes candidatos a presentar un mecanismo de control epigenético de su expresión.

PC4.3. Estudio del perfil de quimiorreceptores en microbiomas asociados a cultivos.

C. Sanchis-López^{*1}, S. Santamaría-Hernando¹, L. Pokorny¹, Jaime Huerta-Cepas¹, E. López-Solanilla^{1,2}.

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.*

²*Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Madrid.*

E-mail: c.sanchisl@upm.es

El papel de los quimiorreceptores es fundamental en la supervivencia de las bacterias asociadas a plantas. A pesar de su importancia, el repertorio de quimiorreceptores presente en el suelo y las hojas de los cultivos está escasamente estudiado. Los estudios recientes en metagenómica revelan que el 99-85% de la biodiversidad microbiana funcional y taxonómica es aún desconocida, lo que probablemente incluya un alto número de quimiorreceptores sin caracterizar. Este trabajo se centra en realizar análisis a gran escala del metagenoma presente en el suelo y la filosfera, enfocándose en el estudio de las proteínas quimiorreceptoras, también conocidas como proteínas aceptoras de metilo o MCPs (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins).

Para ello, en primer lugar se realizará la construcción de un catálogo de quimiorreceptores basado en datos metagenómicos públicos, lo que permitirá estudiar la distribución ecológica y filogenética de los quimiorreceptores de manera global. Este catálogo ampliará el conocimiento actual de estas proteínas, siendo el primer estudio de MCPs que incluya bacterias no cultivables y con información ecológica y filogenética asociada.

Con estos datos se diseñará un kit de captura, que permitirá extraer las secuencias de los quimiorreceptores de diferentes muestras de microbiomas. En este proyecto, esta tecnología será aplicada a los microbiomas presentes en el suelo y la filosfera de cultivos como el tomate y la patata. Esto permitirá analizar los microorganismos existentes en su microbioma y el repertorio de proteínas quimiorreceptoras que presentan. Posteriormente, en el análisis bioinformático del catálogo de las MCPs extraídas se pondrá especial atención a los quimiorreceptores aún desconocidos, así como a los relacionados con la patogénesis de estos cultivos.

La puesta a punto de esta tecnología y los resultados esperados en este proyecto pueden ser un primer paso para el diseño de kits de diagnóstico mediante la caracterización de perfiles de MCPs que revelen información sobre el estado fitosanitario de los cultivos. Además, la aplicación de kits de captura en un ámbito metagenómico, y particularmente en filosfera de cultivos, es una aproximación novedosa que no ha sido realizada previamente, poniendo en valor los resultados de los análisis de este proyecto. El desarrollo de este trabajo está financiado a través del proyecto RTI2018-095222-B-I00. C. Sanchis-López es beneficiaria del contrato FPU-19/06635.

Movilización conjugativa de los plásmidos de virulencia de *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335

M. Añorga¹, C. Ramos^{2,3}, y J. Murillo^{1*}

¹IMAB, Universidad Pública de Navarra, Mutilva Baja, Navarra, ²Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, ³Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga

Email: jesus.murillo@unavarra.es

La mayoría de los aislados de *P. syringae* contienen plásmidos nativos que portan un variado arsenal de genes implicados en patogenicidad y adaptación al medio. *P. syringae* pv. savastanoi NCPPB 3335 es el agente causal de la tuberculosis del olivo y contiene tres plásmidos nativos completamente secuenciados: pPsv48A (pA), 80 kb; pPsv48B (pB), 45 kb, y pPsv48C (pC), 42 kb. Como parte de la caracterización de estos plásmidos y de su papel en el ciclo de vida de la bacteria, hemos abordado el estudio de su movilización conjugativa utilizando plásmidos marcados con un transposón y un derivado de NCPPB 3335 curado de plásmidos como cepa receptora. pB contiene un sistema de secreción tipo IVA completo y un origen de transferencia (*oriT*, 107 nt) funcional. Además, pC también contiene un *oriT* (146 nt) funcional homólogo al de pB, mientras que pA contiene un sistema de secreción tipo IVB incompleto y no posee *oriT*. En un medio de cultivo sólido pobre en nutrientes, pB se moviliza con muy alta frecuencia de transconjugantes por receptor ($9.7 \pm 1.1 \times 10^{-3}$), pC con frecuencia media ($6.2 \pm 1.1 \times 10^{-5}$), y pA con muy baja frecuencia ($8.1 \pm 2.3 \times 10^{-7}$) y como resultado de reorganizaciones con pB, lo cual es esperable porque *oriT* es esencial para la movilización conjugativa. *oriT* suele situarse adyacente al gen codificador de la relaxasa, proteína clave para la movilización que reconoce la secuencia de *oriT* realizando un corte en una de las cadenas, uniéndose a su extremo 5' y dirigiéndola al pilus conjugativo para su transferencia. Mientras que pB contiene un gen de relaxasa (*mobB_B*, tipo MOB_{P1}), pC contiene dos (*mobB_C*, tipo MOB_{P1}, y *traA*, tipo MOB_Q). A pesar de la divergencia entre los *oriT* (57% id.) y relaxasas MobB de pB y pC (86.6% id.), hemos demostrado mediante mutagénesis dirigida que el plásmido C se moviliza con una frecuencia similar mediante MobB_B ($7.7 \pm 0.9 \times 10^{-4}$) y MobB_C ($4.2 \pm 0.8 \times 10^{-4}$). Sin embargo, la movilización de pB es cuatro órdenes de magnitud más frecuente mediada por su propia relaxasa ($9.5 \pm 1.3 \times 10^{-3}$) que por la de pC ($4.3 \pm 4.3 \times 10^{-7}$). Además, pC puede ser movilizado con menor frecuencia por la relaxasa TraA ($0.5 \pm 0.2 \times 10^{-4}$), que pertenece a un sistema de secreción de tipo IV filogenéticamente distinto del presente en pB. Esto sugiere que pC contiene dos orígenes de transferencia conjugativa y que ambos pueden ser movilizados con eficiencia por la maquinaria de conjugación de pB. El plásmido B se transfiere entre bacterias epifitas en hojas de judía; asimismo, pB es transferible a cepas de las siete genomoespecies de *P. syringae* evaluadas (1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8). Por último, un derivado de NCPPB 3335 con una mutación en el gen *virB4* de pB no transfiere ninguno de los tres plásmidos de virulencia. Utilizando derivados silvestres y mutantes *virB4* marcados con el gen de selección negativa *sacB*, hemos demostrado que la capacidad de conjugar de pB aumenta en un orden de magnitud su estabilidad. Además, la cepa deficiente en *virB4*, junto con derivados curados de uno o más plásmidos, nos permitirá evaluar el papel de cada uno de los plásmidos de virulencia en supervivencia epifítica y en competitividad.

Financiado por el proyecto AGL2017-82492-C2-2-R (MINECO-FEDER).

Comparative genomics of the *Pseudomonas corrugata* subgroup reveals high species diversity. Reclassification proposal of *Pseudomonas fluorescens* F113 as *Pseudomonas ogarae* sp. nov., nom. rev, type strain F113.

D. Garrido-Sanz^{1,2,*}, M. Redondo-Nieto¹, M. Martín¹, R. Rivilla¹.

¹*Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2, 28049 Madrid, Spain.*

²*Department of Fundamental Microbiology, Université de Lausanne, CH – 1015 Lausanne, Switzerland*

E-mail: daniel.garridosanz@unil.ch

Pseudomonas corrugata constitute one of the phylogenomic subgroups within the *Pseudomonas fluorescens* species complex and includes both PGPR and plant pathogenic bacteria. Previous studies suggest that the species diversity of this group remains largely unexplored together with frequent misclassification of strains. Using more than 1,800 sequenced *Pseudomonas* genomes we identified 121 genomes belonging to the *P. corrugata* subgroup. Intergenomic distances obtained using the Genome-to-Genome Blast Distance (GBDP) algorithm and the determination of digital DNA-DNA hybridization values were further used for phylogenomic and clustering analyses, revealing 29 putative species clusters, among which only five correspond to currently named species within the subgroup. Comparative and functional genome-scale analyses also support the species status of these species clusters. The search for PGPR and plant pathogenic determinants showed that approximately half of the genomes analyzed could have a pathogenic behavior based on the presence of a pathogenicity genetic island, while most of the genomes possess PGPR traits. This information together with the characterization of phenotypic traits, allows the reclassification proposal of *Pseudomonas fluorescens* F113 as *Pseudomonas ogarae* sp. nov., nom rev., type strain F113^T (=CECT 30235^T), which is substantiated by genomic, functional genomics and phenotypic differences with their closest type strains.

Cambios provocados por la presencia del plásmido pME6863, portador de un gen lactonasa, en *Ensifer meliloti* SVQ747

M. Murillo-Torres, C. Alías-Villegas, M. C. Sánchez-Aguilar, T. Cubo, M. R. Espuny*

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla
E-mail: espuny@us.es

El *quorum sensing* (QS) es un proceso de comunicación intercelular en el que las bacterias producen constitutivamente moléculas señal, autoinductores (AI), que, cuando alcanzan una concentración crítica por incremento de la densidad celular, entran en las células actuando como reguladores transcripcionales de algunos genes, lo que desencadena respuestas coordinadas entre las células de la población. Las señales más utilizadas por bacterias Gram-negativas son de tipo *N*-acil homoserina lactona (AHL). El QS está muy extendido entre las bacterias y tiene una alta incidencia entre aquéllas que establecen relaciones patogénicas o simbióticas con organismos superiores. Éste es el caso de los rizobios, donde el QS está implicado en procesos como la transferencia de plásmidos, la producción de exopolisacáridos (EPS), la movilidad, la formación de *biofilms*, la nodulación o la fijación del nitrógeno.

El análisis del genoma de *E. meliloti* SVQ747 detectó un gen de síntesis de AHL del tipo *sinI*, implicado en la producción de AHL de cadena larga, asociado al regulador *sinR*. A diferencia de lo que ocurre en otras cepas de *E. meliloti* como Rm41 o Sm1021, se detectó un gen *expR* completo, lo que justifica el fenotipo extremadamente mucoso de SVQ747. Para conocer el papel del QS en esta bacteria, se introdujeron por conjugación los plásmidos pME6863, que contiene el gen de la lactonasa, y pME6000, vector donde está clonado. Tras comprobar la funcionalidad de la lactonasa mediante ensayos de difusión en placas con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZRL4), se estudiaron algunas propiedades de las nuevas cepas generadas frente a la silvestre. Así se observó que SVQ747 (pME6863) presentó una ligera mayor movilidad de tipo *swimming* pero decayó la mucosidad de sus colonias, con un aspecto más compacto y seco, lo que podría explicarse por la menor activación de *ExpR* por la ausencia de AHL y su posterior efecto sobre la regulación de los genes de síntesis de EPSII.

La carencia de AHL no afectó a la eficiencia de simbiosis de SVQ747 con *M. sativa*, ya que no se observaron diferencias significativas ni en el peso seco de la parte aérea, ni en el número de nódulos formados, aunque se apreció una tendencia a mejorar el peso seco de la parte aérea por la bacteria carente de AHL. Sin embargo, se observó una mayor capacidad competitiva por la nodulación de SVQ747 (pME6863) que SVQ747 y, sorprendentemente, también de SVQ747 (pME6000). Este último resultado podría ser debido a la presencia de un gen *tetR* en pME6000. TetR pertenece a una familia de reguladores transcripcionales, generalmente negativos, muy extendidos entre procariotas que regulan resistencia a antibióticos, frecuentemente regulando la expresión de bombas de eflujo, pero también otros mecanismos reguladores, entre ellos el QS, por lo que su presencia parece tener efectos en la simbiosis.