

Exploring the quinoa endophytic microbiome: possible implications for resilience and productivity under drought stress

Isaac Maestro-Gaitán¹, Miguel Redondo-Nieto¹, Sara González-Bodí^{2,3,4}, Laura Rodríguez-Casillas^{2,3}, Javier Matías⁵, Luis Bolaños¹, María Reguera¹

¹Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid.

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

³ Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC), Campus de Montegancedo UPM, Pozuelo de Alarcón, Madrid.

⁴Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, UPM.

⁵Agrarian Research Institute “La Orden-Valdesequera” of Extremadura (CICYTEX) Badajoz.

Contacto: isaac.maestro@uam.es

In the context of climate change, the expected increase in the frequency and severity of drought episodes underscores the need for agricultural diversification to include crops that make more efficient use of water resources while enhancing the food nutritional quality, thereby contributing to food security. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) is one of these promising crops due to its remarkable tolerance to abiotic stresses and high nutritional seed quality. These traits are influenced by the plant genotype, environmental conditions, and, most likely, the plant-associated microbiome. This study aims to analyse the endophytic bacterial composition associated with quinoa, focusing on two genotypes with contrasting responses to water deficit, under different environmental conditions (control and drought stress), and in different tissue types (maternal seed endophytes, and endophytic communities of root and offspring seeds compared to the rhizosphere associated bacteria). In addition, the effects of different bacterial infusions from agronomic and non-agronomic soils on the quinoa endophytic microbiome were assessed. Comprehensive analyses identified distinct bacterial communities associated with quinoa, a topic that has received limited attention in the literature. The results of this study provide a detailed characterisation of the quinoa microbiome, highlighting dynamic and conserved bacterial taxa and exploring the heritability of specific bacterial communities in offspring seeds. In particular, quinoa seeds and roots were identified as a reservoir of interesting bacterial taxa, including potential plant growth-promoting bacteria (PGPB) with putative roles in salinity and drought stress tolerance. This study advances our understanding of plant-microbiome interactions in quinoa, providing valuable insights into its microbiota and implications for improving crop resilience and productivity under rainfed conditions.

Unveiling plant growth-promoting potential in *Gordonia* species through comparative genomics

Manel Z. Bellouti¹, Khaoula Bouznada¹, Atika Meklat¹, Margarita Lopez-Fernandez², Mohamed L. Merroun²

¹Microbial Systems Biology laboratory ENS KOUBA, Algeria.

²University of Granada, Microbiology Department, Granada, Spain.

Contacto: belloutimanel@correo.ugr.es

The genus *Gordonia* includes versatile actinobacteria known for their environmental adaptability and metabolic diversity. However, their role in plant growth promotion (PGP) has received limited attention. This study explores the genomic features of four *Gordonia* strains isolated from plant-associated environments: *G. polyisoprenivorans* herm_1, *G. rhizosphaera* NBRC 16068, and *G. sedimidis* AMA120 from the rhizosphere, and *G. oryzae* RS15-1S from the phyllosphere.

The genomes of these strains were retrieved from the public NCBI database and subjected to genomic annotation using Prokka. Subsequently, their plant growth-promoting traits (PGPT) were analyzed utilizing PLABase, a comprehensive web resource for exploring the PGP potential of plant-associated bacteria.

The analysis revealed that all strains possess genes linked to PGP traits, with the rhizospheric strains showing a higher abundance of such genes: *Gordonia sedimidis* (2,968 genes), *G. rhizosphaera* (2,752 genes), and *G. polyisoprenivorans* (1,749 genes). In comparison, the phyllospheric strain *G. oryzae* exhibited 2,230 genes. These differences highlight plant colonization as a major component of their PGP potential. *G. sedimidis* exhibited the highest colonization potential, contributing 29% of its total PGP potential and 47 unique genes, while *G. oryzae* displayed the lowest, at 25%, with only one unique gene associated with plant-derived glycoside utilization.

In stress control and biocontrol, *G. polyisoprenivorans* showed the highest potential, with 31 unique genes primarily linked to neutralizing abiotic stress and 38 unique genes associated with competitive exclusion mechanisms, particularly quorum sensing responses. All strains demonstrated similar capabilities in bioremediation, biofertilization, phytohormone synthesis, and plant signal production, Each of these traits accounting for 11–15% of their total PGP-associated genes. The trait related to plant immune response stimulation was the least represented across all strains, with percentages around 1%.

In conclusion, the genomic analysis highlights the potential of *Gordonia* strains, particularly rhizospheric ones, as promising candidates for PGP applications, warranting further functional validation.

Weaponizing CRISPR-Cas9-loaded nanoparticles for targeted antibacterial defence against plant pathogens

Alejandro Arce-Rodríguez

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

Contacto: aarce1@us.es

In a world with an ever-increasing population, intensive agriculture has become the cornerstone of our food production system, enabling us to meet the increasing demand for food. However, this mode of production often relies on the extensive use of toxic pesticides to protect crops from plant pathogens. This practice has led to significant challenges, including the emergence of pesticide-resistant organisms and widespread environmental contamination from these chemicals. To address these issues, it is paramount to conceive targeted approaches for pest control, treating the pathogen without significantly altering the plant/soil microbiome. In this context, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)–CRISPR-associated proteins (Cas) have emerged as a transformative technology with considerable potential for the precise eradication of specific microorganisms. This precision is afforded by the single guide RNA (sgRNA), which directs the Cas9 nuclease to a specific site in the pathogen’s genomic DNA, where it induces a lethal double-strand break. Despite all these promises, a major hurdle in applying CRISPR-based treatments is the efficient delivery of the Cas9/sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex into the target cells. In this study, we propose the use of bacterial membrane vesicles (MVs) as a novel nanocarrier for the delivery of the Cas9/sgRNA RNP complex. MVs are lipid-based nanoparticles naturally released from bacterial membranes, capable of encapsulating a range of biomolecules. By leveraging genetic engineering and active cargo packaging mechanisms, we aim to load the Cas9/sgRNA RNP complex into these nanocarriers. Once delivered, MVs can fuse with the membranes of target pathogens, releasing their cargo and enabling the Cas9/sgRNA complex to precisely target and eliminate the intended microorganism(s). This approach offers a promising alternative to conventional, environmentally harmful pesticides, as it provides a highly specific means of controlling bacterial populations without disrupting the broader microbiome of the crop ecosystem

Interspecific plant interaction alters the tomato rhizosphere bacterial community and improves seedlings fitness

Muhammad Khashi u Rahman¹, Paula García-Fraile^{1,2}

¹Microbiology and Genetics Department & Institute for Agrobiotechnology Research (CIALE), University of Salamanca.

²Associated Research Unit of Plant-Microorganism Interaction, University of Salamanca-IRNASA-CSIC.

Contacto: khashiurahman@usal.es

Interspecific plant interactions are shown to alter the growth of adjacent plants however the involved mechanisms are poorly understood. In this study, we investigated whether interaction with the heterospecific neighbor of *Allium* spp. affects tomato plant fitness via modulation in its root-associated bacterial community. First, in a greenhouse pot experiment, we found that coculturing with two *Allium* spp. cultivars promoted tomato biomass and altered its rhizosphere bacterial community composition differently. In the second pot experiment, we co-cultivated tomato alone or with the superior *Allium* sp. cultivar with or without inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – fungus that causes *Fusarium* wilt in tomato. Results showed that cocultivation with *Allium* sp. reduced the disease incidence and biomass loss of tomato as compared to pathogen-inoculated tomato monoculture. 16S rRNA gene sequencing revealed that the tomato rhizosphere bacterial community was different in all four plantation types. Then, we isolated culturable bacteria from the rhizosphere of pathogen-infected tomato rhizosphere cultivated with *Allium* sp. Besides the positive results in various plant growth promotion-related in vitro assays, all isolated bacterial strains belonging to the genus *Pseudomonas* were able to inhibit pathogen growth in vitro. Moreover, the selected most efficient strain was also able to decrease disease incidence and tomato biomass loss in greenhouse pot experiments using natural soil. Finally, inoculation of tomato with GFP-labeled *Pseudomonas* sp. P829 using a split root system showed that the presence of *Allium* sp. stimulated tomato to recruit beneficial bacteria to suppress tomato disease. This study revealed an indirect mechanism of neighboring plants affecting adjacent heterospecific neighbors by altering their rhizosphere bacterial assembly.

Acknowledgment: We acknowledge the support of the European Commission under Marie Skłodowska-Curie grant agreement number 101034371.

***Bacillus halotolerans* B16: una alternativa microbiana para el control sostenible de plagas agrícolas**

Amalia Roca Hernández^{1,2}, Inmaculada Sampedro Quesada^{1,2}, Inmaculada Llamas Company^{1,2}

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

²Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Granada.

Contacto: amaliaroca@ugr.es

Los cambios en la normativa actual sobre el uso de fertilizantes y pesticidas químicos en la agricultura, junto con los problemas medioambientales y de salud que conlleva su empleo, conducen a la necesidad de buscar alternativas sostenibles. Entre éstas, el uso de bacterias asociadas a plantas con propiedades biofertilizantes y biopesticidas se presenta como una opción prometedora. En este estudio, se han analizado las propiedades de biocontrol de *Bacillus halotolerans* B16, una cepa halotolerante aislada del suelo rizosférico de la planta halófila *Arthrocaulon* sp., localizada en el Saladar El Margen (Granada). Los ensayos de antagonismo *in vitro* han demostrado que esta cepa inhibe el crecimiento de una alta diversidad de fitopatógenos fúngicos (ej. *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gibberella zeae*, *Verticillium dahliae*, etc.) y bacterianos (ej. *Dickeya solani*, *D. dadantii*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. tomato, etc.) de alta relevancia agronómica. La caracterización bioquímica de la cepa B16 mostró su capacidad para producir enzimas hidrolíticas tales como xilanasas, celulasas, pectato-liasas, amilasas, proteasas y lipasas, que se vincularon a su capacidad de biocontrol. Además, el análisis del sobrenadante de la cepa B16 mediante ensayos de antagonismo *in vitro* reveló la presencia de diferentes metabolitos bioactivos frente a los fitopatógenos bacterianos y fúngicos. Asimismo, se detectó su capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica, que resultaron efectivos frente a fitopatógenos de gran importancia agrícola. La secuenciación y el análisis *in silico* del genoma de la cepa B16 permitió identificar taxonómicamente esta cepa, así como distintos conjuntos biosintéticos responsables de la síntesis de metabolitos secundarios, incluyendo sideróforos, péptidos de síntesis no ribosomal y policétidos. Los resultados de este trabajo avalan el potencial de *B. halotolerans* B16 como agente de biocontrol en estrategias de agricultura sostenible.

Financiación: RYC2019-026481-I, PID2019-106704RB, PID2023-146281NB-I00 y PID2023-150154OB-I00 financiados por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).

El potencial del desierto aplicado a la agricultura

Marina García-Gómez^{1,2}, Zaki Saati-Santamaría³, Monica Majo-Cuervo^{1,2}, Esther Menéndez^{1,2,4},
Lorena Carro^{1,2,4}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

²Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE), Villamayor de la Armuña, Salamanca.

³Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Praga, República Checa.

⁴Unidad Asociada Planta-Microorganismo, Universidad de Salamanca -IRNASA-CSIC.

Contacto: marinagarcia Gomez@usal.es

Los desiertos áridos son entornos con condiciones extremas donde siempre han sido considerados un desafío para la vida. Sin embargo, la biodiversidad microbiana de estos ecosistemas ofrece un potencial considerable para mejorar los cultivos en áreas afectadas por el cambio climático, gracias a los mecanismos que han desarrollado para sobrevivir en estas condiciones. Este estudio tiene como objetivo explorar el microbioma de los desiertos de Atacama (Chile) y el Sahara (África), comparándolo con el microbioma de un clima templado (Salamanca, España), para identificar microorganismos con potencial para promover el crecimiento de plantas en condiciones de estrés abiótico. Se tomaron muestras de suelo, rizosfera y tejido vegetal de plantas de *Astragalus* y fueron analizadas genómicamente mediante el estudio de las regiones ARNr 16S e ITS. En particular, se utilizaron los datos de la secuenciación completa del gen ARNr 16S (PacBio) para identificar taxones microbianos diferenciales entre los desiertos y el clima templado, seleccionando aquellos que estaban significativamente asociados a los desiertos. Aislamientos específicos de las muestras de desierto permitieron la obtención de algunos de estos aislados pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium*, *Massilia*, y *Sphingomonas*, que han sido evaluados respecto a su capacidad para promover el crecimiento vegetal (PGP) y su tolerancia al estrés salino y por sequía *in vitro*. Tras la secuenciación de los genomas de las cepas se ha analizado su información y capacidades a nivel genómico con relación a su interacción con las plantas. Los resultados preliminares de los ensayos experimentales en condiciones de estrés sugieren que algunas de estas cepas tienen alto potencial para mejorar el rendimiento de cultivos en condiciones extremas.

Este trabajo fue financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la “European Union Next GenerationEU/PRTR” mediante el proyecto TED2021/-129160B-100. MGG agradece la cofinanciación por parte de la Consejería de Educación y del Fondo Social Europeo Plus (FSE +).

Heat stress alters microbiota diversity and metabolite profiles in tomato plants: implications for microbial inheritance and plant resilience

Joana do carmo Gomes¹, Inês Rebelo Romão¹, Amadeus Pendl¹, Lucas Amoroso Lopes de Carvalho^{1,2}, André Sousa¹, Juan Ignacio Vílchez¹

¹Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB)-NOVA, iPlantMicro Lab. Oeiras, Lisboa.

²Laboratory of Bioinformatics, Department of Agricultural, Livestock and Environmental Biotechnology, School of Agricultural.

Contacto: jgomes@itqb.unl.pt

Climate change, particularly extreme heat waves, poses a critical threat to agricultural productivity, particularly for heat-sensitive crops, such as tomatoes. Elevated temperatures jeopardize tomato reproductive processes and resilience, leading to reduced fruits and inconsistent maturation. On the other hand, inheriting specific microbiota is being hypothesized to be essential to enhanced crop tolerance, but our knowledge remains limited. Here, we evaluated the impact of heat stress on microbiota diversity and metabolite composition in Micro-Tom tomato plants, with a specific focus on vertical microbial transmission and inheritance processes. By examining flowers to seeds microbial patterns, this research sheds light on how heat stress influences microbial communities and their role in plant adaptation. Metagenomic analyses revealed decreased diversity in flowers but increased diversity in seeds derived from heat-stressed flowers, corroborated by culturomics. Proteobacteria and Bacteroidetes decreased in flowers while increasing in seeds, whereas Actinobacteria showed the opposite trend. Firmicutes, including stress-resilient genera like *Bacillus* and *Neobacillus*, remained stable, indicating their potential role in stress adaptation. Candidates for microbiota inheritance were identified, including *Dyella* sp. and *Neobacillus drentensis*, found in both flowers and seeds, with *Paenibacillus pabuli* exclusive to seeds from heat-stressed flowers. These findings highlight the selective pressures of heat stress on microbial inheritance. Moreover, metabolomic profiling revealed significant changes in metabolites like lactate, xylose, and gluconate, which were downregulated, while glutamine was upregulated under heat stress. Correlations between metabolites like maleic acid and succinate and bacterial phyla like Bacteroidetes suggest a symbiotic interplay that supports stress-related metabolic pathways. In conclusion, this study opens a new frame in how heat stress shapes microbiota diversity and metabolite profiles, favoring specific microbial populations and metabolic adaptations. These findings offer insights into enhancing our knowledge in microbial transmission and crops resilience, providing strategies to address the challenges of climate change and safeguard tomato production.

Arbuscular mycorrhizal fungi modulate the response of grape berry composition to climate change conditions

Daria Kozikova, Johann Martínez-Lüscher, M. Carmen Antolín, Nieves Goicoechea, Inmaculada Pascual

Instituto de Biodiversidad y Medioambiente (BIOMA), Universidad de Navarra

Contacto: dkozikova@alumni.unav.es

The increase in atmospheric CO₂ concentration and temperature will likely accelerate in the coming decades, affecting negatively the grape composition. Finding adaptation strategies is a priority for wine growers worldwide. The potential of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to improve plant tolerance to abiotic stresses has long been recognised. This work aimed to evaluate whether the association of young grapevines with AMF can mitigate the impact of climate change on berry composition. An experiment with two-year-old Cabernet Sauvignon plants grafted onto R110 rootstock was conducted in 2022. Treatments consisted in plants, either inoculated (+M) or not (-M) with a consortium of AMF, exposed from fruit set to maturity to two CO₂ levels (ambient CO₂, CA or 700 ppm, CE), and two temperatures (ambient temperature, TA, or ambient temperature elevated by 4 °C, TE) in a factorial design (2x2x2). Plants under TE experienced 5 heatwaves and 25 days with maximum temperatures above 40 °C (2 heatwaves and 4 days above 40 °C in TA). Both TE and CE reduced total soluble solids (TSS); the differences being less pronounced in +M plants. Inoculation with AMF tended to enhance the effect of TE reducing acidity at maturity. +M plants showed higher concentrations of total amino acids and amino acid aroma precursors, especially under ambient conditions (CATA). +M plants maintained similar yeast-assimilable nitrogen levels regardless of the temperature and CO₂ regime. TE decreased total anthocyanins in the later stages of berry ripening, but differences between temperature regimes were slightly attenuated in +M plants. Inoculation with AMF did not alter the anthocyanin profile. Only TE increased the proportion of malvidin and acylated anthocyanins. In conclusion, AMF modified the berry must amino acidic composition of young grapevines. With a lesser direct effect, AMF slightly modulated the effects of temperature on TSS, acidity and anthocyanins.

Diversidad de hongos endófitos radiculares de colza (*Brassica napus*) y su relación con las condiciones edafoclimáticas y de manejo agrícola en la submeseta norte

Tamara Sánchez-Gómez, Irene Zunzunegui, Jorge Poveda, Óscar Santamaría, Jorge Martín-García

Grupo de Investigación Reconocido AGROBIOTECH, UIC-370 (JCyL), Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR), Universidad de Valladolid.

Contacto: tamara.sanchez@uva.es

La agricultura europea afronta un escenario complejo caracterizado por condiciones climáticas adversas y por el desafío de incrementar su productividad de manera sostenible. En este contexto, la Estrategia De la Granja a la Mesa establece como metas para 2030 una reducción del 50% en el uso de fitosanitarios químicos, del 20% en fertilizantes y alcanzar un 25% de superficie en ecológico. Para contribuir a la consecución de dichos objetivos, nuestro proyecto plantea el uso de la colza (*Brassica napus*), junto con su microbioma, como cultivo precedente mejorante. Las brasicáceas tienen la capacidad de sintetizar glucosinolatos (GSL), metabolitos de defensa que actúan como biocidas contra adventicias y hongos patógenos durante su propio cultivo y el posterior. Además, algunos de los hongos endófitos asociados a sus raíces, como es el caso del género *Trichoderma*, son capaces de estimular la producción de dichos metabolitos. El primer paso de nuestro estudio fue un muestreo de 24 parcelas de colza, representativas de diferentes condiciones edafoclimáticas. Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento de los endófitos asociados a las 120 raíces recogidas, y su identificación molecular a nivel de género. Se obtuvieron un total de 176 taxones distintos, destacando los géneros *Fusarium* y *Alternaria* por su abundancia y ubicuidad, y la presencia de otros interesantes como el ya mencionado *Trichoderma* o *Beauveria* (entomopatógeno). La correlación entre los endófitos aislados y las condiciones edafoclimáticas y de manejo agrícola de cada parcela revelará las técnicas agronómicas a implementar para optimizar los procesos productivos. Los próximos pasos incluirán análisis metabólicos de los hongos aislados y la evaluación de su capacidad antagonista frente a adventicias y patógenos fúngicos. Si bien aún queda camino por recorrer, los hongos endófitos podrían ser el punto de partida para el desarrollo de nuevas alternativas biológicas a los fertilizantes y fitosanitarios de síntesis.

Molecular responses of chestnut to *Phytophthora cinnamomi* infection

Saleta Rico Santos¹, Jesús M Vielba Villegas¹, Beatriz Cuenca Valera², Nieves Vidal González¹, Conchi Sánchez Fernández¹

¹MBG, sede Santiago, CSIC

²Vivero de Maceda, TRAGSA

Contacto: conchi@mbg.csic.es

European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is significantly affected by ink disease, caused by *Phytophthora cinnamomi*. Resistance to ink disease is a crucial factor in the survival and productivity of chestnuts, and the analysis of molecular responses to infection will provide relevant information for developing tools for its control. This study focuses on understanding the genetic responses of two chestnut genotypes (CS12 and PO11) with different levels of resistance to *P. cinnamomi*, and to identify key genes and signaling pathways involved in defense against this pathogen. CS12 is a pure *C. sativa* clone and is highly sensitive to infection, while PO11, a hybrid *C. sativa* x *C. crenata*, is resistant. Using Next Generation Sequencing (NGS), transcriptomes of inoculated plantlets were analyzed in comparison with the transcriptomes of non-inoculated plantlets. We identified differentially expressed genes in response to infection including genes related to signal transduction, transcription factors and pathogenesis-related genes. Our findings provide insights into the molecular mechanisms underlying plant immune responses and stress adaptation, potentially contributing to the development of effective strategies for ink disease management in chestnut.

Estrategias adaptativas de PGPR en la rizosfera

Cristina Lomas Martínez, María Antonia Molina Henares, Manuel Espinosa Urgel

Estación Experimental del Zaidín. CSIC

Contacto: manuel.espinosa@eez.csic.es

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son de gran interés por su potencial aplicación en agricultura sostenible y adaptación al cambio global. A la hora de seleccionar cepas PGPR para la formulación de bioinoculantes es necesario analizar y combinar otras características, aparte de sus posibles propiedades beneficiosas: tolerancia a estrés, capacidad de colonizar la superficie radicular, competitividad y persistencia, y compatibilidad con la planta. Distintas evidencias indican que tanto las condiciones ambientales como las propias plantas ejercen una presión selectiva sobre las comunidades microbianas, de manera que determinados genotipos podrían estar favorecidos en la rizosfera. Sin embargo, los trabajos a nivel evolutivo en bacterias rizosféricas son hasta ahora relativamente limitados. Presentamos resultados de un proyecto dirigido a analizar las estrategias adaptativas de dos cepas PGPR: *Pseudomonas alloputida* KT2440 y *Stutzerimonas stutzeri* MJL19. Mediante un diseño de “selección natural acelerada” en la rizosfera de plantas de maíz en condiciones control y de elevada salinidad, se han obtenido variantes de KT2440 con mayor eficiencia competitiva. Se han secuenciado los genomas de 8 variantes, para determinar los cambios genéticos seleccionados. En los clones aislados de condiciones salinas, se han podido identificar dos rutas evolutivas que podrían estar asociadas a esta mejora. Actualmente estamos analizando en detalle estos resultados y completando experimentos similares con *S. stutzeri*. En esta bacteria se han analizado además los cambios en la expresión génica en rizosfera en respuesta a salinidad.

Este trabajo cuenta con financiación de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P21_00293 / CA20251)

Riborregulación en la simbiosis de *Sinorhizobium fredii* HH103 con leguminosas

Francisco Fuentes-Romero¹, Sabina K. Guedes-García², Natalia I. García-Tomsig², Francisco-Javier Ollero¹, Francisco-Javier López-Baena¹, José Ignacio Jimenez-Zurdo², José-María Vinardell¹, Sebastián Acosta-Jurado¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

²Structure, Dynamics and Function of Rhizobacterial Genomes (RhizoRNA Lab), Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, Spain.

Contacto: ffuentesr@us.es

Sinorhizobium fredii HH103 es un rizobio de rápido crecimiento con un amplio rango de hospedadores, incluyendo soja, de alta relevancia agronómica. La simbiosis requiere un intercambio complejo de señales moleculares entre bacteria y planta, incluyendo Factores Nod inducidos por flavonoides como la genisteína, proteínas efectoras del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) y polisacáridos superficiales, como EPS, KPS, LPS y GC.

La regulación de estas señales simbióticas ha sido ampliamente estudiada, centrándose en el papel de las proteínas reguladoras transcripcionales, donde NodD1 es el regulador principal [1-4]. Sin embargo, el papel de los small RNAs (sRNAs) como reguladores postranscripcionales está emergiendo como un nuevo nivel de control [5,6]. En este estudio, se completó la secuenciación del genoma de HH103, cerrando gaps en el plásmido simbiótico, e identificando sitios de inicio y terminación de transcripción mediante Cappable-seq y Term-seq.

Se identificaron seis sRNAs candidatos con alta expresión específica en *Glycine max* o *Glycyrrhiza uralensis*. El sRNA F6, regulado por NodD1, mostró alta expresión en bacteroides de *G. uralensis*. Su mutación no afectó la simbiosis con soja, sugiriendo una posible función específica en la interacción con *G. uralensis*. Este trabajo profundiza en el papel regulador de F6 y establece bases para la caracterización de otros candidatos.

Reference:

- [1] Pérez-Montaña F, et al. *Scientific Reports*. 2016; 6: 31592.
- [2] Acosta-Jurado S, et al. *Environmental Microbiology*. 2019; 21 (5): 1717–39..
- [3] Acosta-Jurado S, et al. *Environmental Microbiology*. 2020; 22 (3): 1104–24.
- [4] Navarro-Gómez P, et al. *Frontiers in Plant Science*. 2023; 14: 1322435.
- [5] García-Tomsig NI, et al. *mBio*. 2021; 13 (1): e0357621.
- [6] García-Tomsig NI, et al. *mBio*. 2023; 14 (6): e0200323.

Funding:

Trabajo financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AEI) con el proyecto de investigación: PID2022-141156OB-I00; y por la Junta de Andalucía (PAIDI/FEDER/EU) con la beca predoctoral: P20_00185.

Papel del diguanilato cíclico en la regulación de diversos procesos celulares en *Sinorhizobium fredii*

María del Carmen Sánchez Aguilar, Juan Aranda Pérez, Ana María Cutiño Gobeia, Francisco Pérez Montaña, Carlos Medina Morillas

Departamento de microbiología. Facultad de biología. Universidad de Sevilla

Contacto: mari.san.ag@gmail.com

La concentración de diguanilato cíclico intracelular (di-GMP-c) está implicada en cambios en el estilo de vida de numerosas bacterias que interaccionan con eucariotas, entre ellas los rizobios. El aumento de la concentración de este metabolito, mediado por diguanilato ciclasas (DGC), está relacionado con condiciones de sesilidad y formación de biofilms, mientras que su disminución llevada a cabo por fosfodiesterasas (PDE), se asocia con la movilidad y virulencia en bacterias. La regulación de los genes implicados en estos cambios de estilo de vida cobra una especial importancia en los rizobios, que desarrollan parte de su ciclo de vida como saprófitos en la rizosfera y otra parte en el interior de las leguminosas donde fijan nitrógeno en condiciones simbióticas. Además, esta compleja regulación está imbricada con los mecanismos de Quorum Sensing (QS) utilizado por las bacterias que, en base a una determinada densidad celular, coordinan la expresión de diversos genes implicados en el proceso de nodulación, la formación de biofilms y/o la producción de exopolisacáridos entre otras funciones. Estudios recientes han puesto de relieve la complejidad de los sistemas QS en rizobios, revelando numerosas moléculas de señalización y vías reguladoras que garantizan un control preciso sobre las interacciones simbióticas.

Este proyecto plantea la alteración sintética de las concentraciones intracelulares de di-GMP-c en diversos rizobios, y el análisis de la relación de estas alteraciones con la producción de acil-homoserina-lactonas (AHLs), la expresión de genes implicados en la nodulación o procesos implicados en la comunicación entre poblaciones bacterianas y con su entorno mediados por los diferentes sistemas de secreción de proteínas presentes en los rizobios. Estos procesos en muchos casos dan lugar al cambio de estilo de vida de las poblaciones bacterianas, dando lugar a comunidades móviles o sésiles que podrán iniciar un proceso de nodulación.

Unravelling plant cellular targets for the *Sinorhizobium fredii* HH103 Type III Secretion System Effector NopP

Diego García-Rodríguez¹, Sandy Anabelle Garay-Flores¹, Saul Burdman², Jacinto Gandullo³, Carlos Medina¹, Francisco Javier Ollero¹, José María Vinardell¹, Irene Jiménez-Guerrero¹, Francisco Javier López-Baena¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla

²Hebrew University of Jerusalem

³Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla

Contacto: dgrodriguez@us.es

Sinorhizobium fredii HH103 is a nitrogen fixing bacterium able to nodulate a broad range of legume plants, with soybean (*Glycine max*) being its natural host. Bacterial Nod factors, surface polysaccharides and secretion systems, such as the Type III Secretion System (T3SS), are involved in the establishment of this symbiosis. Like several other Gram-negative plant-pathogenic and symbiotic bacteria, *S. fredii* HH103 utilizes a T3SS to deliver proteins, called effectors (T3Es), directly into their plant host cells. In rhizobia, the T3SS and nodulation genes are co-regulated. Moreover, the T3SS proteins play key roles in host-range determination, suppression of plant defences and nodulation efficiency.

In this study we focus on the T3E NopP, which is specific to rhizobia and involved in blocking nodulation in Rj2 soybean cultivars. Using an immunoprecipitation (IP) assay, we previously identified cyclophilin CYP40 as a potential target of NopP. CYP40 is involved in the facilitation of the assembly of the RNA-induced silencing complex (RISC). In this work we show that NopP colocalizes with CYP40 in transient expression assays in *Nicotiana benthamiana* leaves, where nopP and Cyp40 were fused to the RFP and YFP encoding genes, respectively, and analyzed by confocal imaging. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays were also performed to confirm the interaction between these two proteins in plant cells.

Funding: Grant PID2022-1411560 funded by MICIU/AEI/ 10.13039/501100011033. Diego García Rodríguez is recipient of a predoctoral contract funded by the University of Seville (VII-PPI US).

Plant communication in the rhizosphere: who is there, who is listening?

Javier Lidoy, Luis España Luque, Elena Boutazakht, Andrea Ramos Molina, Olena Nesterenko, Juan Manuel García, María José Pozo, Juan Antonio López Ráez

Department of Soil and Plant Microbiology, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada (Spain)

Contacto: juan.lopezraez@eez.csic.es

The high demand for food in the growing world population is causing an overexploitation of natural resources and a massive use of chemical fertilizers and pesticides in agriculture, generating an enormous environmental impact, contaminating soils and aquifers, and accentuating climate change. Therefore, there is an urgent need to find more sustainable and environmentally friendly alternatives. An increasingly demanded strategy by the agri-food sector is the use of beneficial soil microorganisms as biostimulants, which can act as biofertilizers and/or bioprotection agents. However, despite its potential its implementation in agriculture is still a challenge due to the variability of results in the production systems. The establishment and functioning of plant-microbe symbioses and, consequently, their benefits require a high degree of communication and coordination between the two 'partners'. The plant-microbe molecular dialogue begins with the production and exudation to the rhizosphere of signalling molecules (strigolactones, flavonoids, ...) by the host plant as 'cry for help' signals during the pre-symbiotic phase. These compounds are 'listened' by the microorganisms present in the rhizosphere, responding by producing other signal molecules (chitin-related compounds, cutin monomers, ...), that are recognized by the plant.

Understanding this inter-kingdom symbiotic communication is essential to establish and promote the use of biostimulants (probiotics) in modern and sustainable agriculture. In the presentation, we will focus on the biosynthesis and regulation of plant-derived signaling molecules under different stresses, as well as their potential as key prebiotic molecules for the establishment of beneficial interactions in production systems.

This research has been funded by the grants MCIN/AEI/ PDC2022-133600-C21, PID2021-124813OB-C31, "ERDF A way of making Europe" by the European Union, and grant P20_00400 funded by Junta de Andalucía.

Pósteres

Diseño integrado de comunidades sintéticas bacterianas para la mejora de cultivos en rotación

Daniel Espinosa-Saiz^{1,2}, Kataryna Czanova¹, Pedro F Mateos^{1,2,3}, Zaki Saati-Santamaria⁴, **Esther Menendez**^{1,2,3}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca.

²Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE), Villamayor, Salamanca.

³Unidad Asociada de Investigación en Interacción Planta-Microorganismo, USAL-CSIC (IRNASA), Salamanca.

⁴Instituto de Microbiología de la Academia Checa de Ciencias, Vídeňská, Praga, República Checa.

Contacto: esthermenendez@usal.es

Los biofertilizantes bacterianos basados en una sola cepa en numerosas ocasiones no presentan buenos resultados en condiciones de campo. Esto puede deberse a factores como la competición con el microbioma nativo o a factores ambientales, entre otros. Los biofertilizantes basados en comunidades sintéticas (SynComs) son una gran alternativa, ya que incorporan diferentes comunidades microbianas imitando en parte el entorno funcional microbiano y a su vez, son adaptables a multitud de condiciones. Nuestro objetivo es el diseño y aplicación de SynComs a partir del conocimiento de la composición y funcionalidad de los microbiomas asociados a diferentes cultivos en rotación. Para ello, diseñamos y evaluamos SynComs compuestos por aislados seleccionados mediante criterios como la composición del bacterioma core, aislados de suelo, endosfera y rizosfera con potencial PGP y la abundancia relativa de taxones entre muestras. Los resultados revelan que la inoculación de SynComs diseñadas en base al bacterioma core de suelos de parcelas con diferentes cultivos presente y/o predecesores durante el periodo de muestreo, presentó mayor espectro de acción, mejorando significativamente su crecimiento vegetal. La inoculación de la SynCom conteniendo bacterias endofíticas de colza con potencial PGP mejoró significativamente tanto el crecimiento vegetal como la producción de este cultivo. Las cepas que componen esta SynCom no se detectaron en rizosfera de la rotación trigo-colza, lo que sugiere que son endófitos verdaderos. Sin embargo, mediante un ensayo combinatorio factorial, observamos que no todas las cepas y combinaciones promueven el crecimiento vegetal de igual manera. Éstos y futuros estudios expandirán las posibilidades de aplicación de SynComs como biofertilizantes adaptados a diferentes cultivos y prácticas agrícolas.

Este trabajo está financiado por PID2022-138373NA-I00 / AEI/10.13039/501100011033/ FEDER, UE y por EUROPEAN UNION'S HORIZON 2020 Marie Skłodowska-Curie Actions (GA nº 897795).

Optimizing seed surface sterilization to study seedborne microbiota: enhancing maize resilience to drought stress

Inês Rebelo Romão, Joana do carmo Gomes, André Sousa, Daniel Silva, Millia McQuade, Sandra Rincón, Juan Ignacio Vílchez

Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB)-NOVA, iPlantMicro Lab. Oeiras, Portugal

Contacto: ines.rromao@itqb.unl.pt

Maize, a crucial crop for human consumption, animal feed, and economic development, faces growing challenges due to harsh weather conditions. Innovative treatments involving microorganisms, including bacteria found in seeds, offer promise in enhancing plant growth and combating stress, thanks to their co-evolved traits for plant survival. Seed surface sterilization is essential for isolating seedborne microbiota, yet standardized methods specific to different seed types are lacking. This study aimed to identify the optimal sterilization method for studying maize seedborne microbiota while preserving endophytic bacterial communities. Three sterilization protocols—70% ethanol, 10% bleach, and a combination of both—were tested across five exposure times (3, 5, 7, 10, and 15 minutes). The most effective treatment was 70% ethanol for 5 minutes, which preserved the highest population and diversity, maintaining as well a high germination rate. Following this method, we evaluated seed microbiota of different maize varieties, isolating and analyzing their populations by metagenomic and culturomics approaches. The strains *Niallia circulans* and *Niallia nelsonii* were selected as the most promising candidates after biochemical determinations of plant beneficial traits. These strains were tested as bioinoculants for field trials with two irrigation systems (100% and 50%). Here, despite all phenotypic parameters recorded decreased under restrictive irrigation conditions, plants treated with the selected candidates showed significant improvements in growth and productivity compared to untreated plants, regardless of the irrigation system. Specifically, plant height increased by 23% and 15%, plant weight by 27% and 57.5%, cob weight by 28% and 49%, and grain weight by 29.9% and 40.5%, under regular and restrictive irrigations, respectively. No significant differences were found between the two candidates. These results highlight the potential of studying and use of seedborne strains for improving crop resilience and agricultural productivity in response to climate change.

Analysis of the type VI secretion system in pea nodulating rhizobia

Nassim Chafiqi^{1,2}, Lucía Domingo-Serrano², Bruna FS De Sousa², José M Palacios^{2,3}, Mustapha Misbah El Idrissi¹, Luis Rey^{1,3}

¹Centre de Biotechnologies végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat.

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC), Campus de Montegancedo, Madrid.

³Departamento Biotecnología-Biología Vegetal, E. T. Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain.

Contacto: nassim.chafiqi@um5r.ac.ma

Rhizobia are bacteria that play an essential role in biological nitrogen fixation by forming symbiotic relationships with leguminous plants, making it crucial to understand the mechanisms underlying this symbiosis. The bacterial type VI secretion system (T6SS) is a molecular nanosyringe capable of injecting effector proteins directly into prokaryotic or eukaryotic cells. *Rhizobium* T6SS has been reported to influence symbiosis with legumes in positive, neutral or negative ways (Salinero-Lanzarote *et al.*, 2019). *Rhizobium ruizarguesonis* UPM1134, a strain capable of effectively nodulating pea, lentil and vetch, harbors a T6SS gene cluster. Despite this, the lack of detection of Hcp, a conserved structural component of T6SS, in the supernatant of free-living cells and in pea bacteroids suggests that the system is inactive.

In contrast, *Rhizobium leguminosarum* Norway, a strain that induces ineffective nodules in pea, lathyrus, vetch and bean although effective in lentils, displays an active T6SS under free-living conditions since it is possible to immunodetect Hcp in the supernatant of free-living conditions. Notably, the T6SS structural organization and sequence of Norway strain closely resembles that of UPM1134.

The purpose of this work is to elucidate the differences in the regulation of T6SS expression in the two strains and the relevance of T6SS in the efficiency of nodulation with different legume hosts.

Reference: Salinero-Lanzarote *et al.*, 2019. 10.1093/femsec/fiz054

Funding: LR, JMP and BFSS were financed by MICINN-Spain PID2021-124344OBI00. NC is supported by Erasmus Program K107 and LD-S by Ministerio de Ciencia e Innovación (PRE2019-091327). We thank Macarena A Marin for providing the RI Norway strain.

Harnessing soil microbiomes through plant-soil feedback to induce resistance against insect pests in tomato

Guadalupe Zitlalpopoca Hernandez¹, Pablo Manuel Rodríguez Blanco¹, María Gloria González Holgado², Iván Manuel Fernández López¹, Ainhoa Martínez Medina¹

¹Molecular Agroecology Laboratory (MOLECOLAB), Department of Soil and Plant Microbiology, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

²Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC).

Contacto: zitlalpopocahz@gmail.com

Plants shape soil microbial communities through root exudates, creating a microbial legacy that impact the growth of future plants. Known as plant-soil feedback (PSF), this mechanism offers a promising strategy for enhancing plant health. However, the effects of PSF are highly variable, and the impact of PSF on crop resistance to herbivory remain unclear. In this study, we applied the concept of PSF for managing soil microbiomes with the aim of explore whether it can be applied for inducing tomato pest resistance. We further explore to what extent PSF-resistance functions are modulated by plant genotypes and soil management. We steered microbiomes from three differently-managed soils from the Dehesa ecosystem: an undisturbed plot, a plot devoted to extensive grazing, and a plot under monoculture management. To steering the microbiomes we grow for four months in the different soils four wild grasses: *Lolium perenne*, *Agrostis stolonifera*, *Dactylis glomerata* and *Festuca rubra*, in monoculture and a mixed community. The different microbiome legacies were tested for their ability to induce tomato resistance against the herbivore *Spodoptera exigua*. We found that PSF processes enhanced tomato pest resistance, still PSF-resistance functions were strongly conditioned by the plant genotype and the soil management. Remarkably, the strongest PSF resistance-related effects were observed in systems involving mixed communities, and undisturbed soils. By analyzing microbiome (bacterial and fungal communities) composition and diversity, we aim to link specific resistance-related functions of the microbiome legacies, with specific microbial taxa. Overall, our results indicate that managing the residing soil microbiomes by applying the concept of PSF is an effective approach for enhancing plant protection, and that plant genotypes and soil management history are pivotal in influencing the outcomes of PSF in tomato plants.

Our research was funded by PID2021–128318OA-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A Way of Making Europe

Decoding the plant-microbe interactions of *Vreelandella* sp. in maize plants growth enhancement under salt-stress: an omics approach

André Sousa¹, Tatiana Gil¹, Lucas Amoroso Lopes de Carvalho^{1,2}, Juan Ignacio Vílchez¹

¹Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB)-NOVA, iPlantMicro Lab, Oeiras, Lisboa, Portugal

²Laboratory of Bioinformatics, Department of Agricultural, Livestock and Environmental Biotechnology, School

Contacto: asousa@itqb.unl.pt

Soil salinization threatens agricultural productivity by limiting plant nutrient and water uptake, adversely affecting staple crops, such as maize, essential for human and animal nutrition. Additionally, maize cultivation in key agricultural areas, including Lezíria Grande (Ribatejo, Portugal), faces severe challenges from soil salinization due to the advance of the salt wedge from surrounding rivers. In recent studies, the use of halotolerant microbiota as bioinoculants has emerged as a promising and sustainable strategy to improve crop resilience to salinity. Furthermore, halotolerant bacteria inhabit diverse saline environments, such as saltpans, many of which remain underexplored. Culturomics of these environments has led to the discovery of numerous novel species, which contain diverse genomic and functional traits. Notably, *Vreelandella* sp. DE, a novel species isolated from the San José saltpan (Torredonjimeno, Jaén - Spain), has demonstrated to enhance maize growth under salt-stress conditions. This study aimed to elucidate the mechanisms by which *Vreelandella* sp. DE confers salinity tolerance to maize using genomic and transcriptomic approaches of the strain and host plants, respectively. So far, functional genomic analysis revealed that 45% of *Vreelandella* sp. DE genes are associated with plant growth-promoting traits, including nutrient solubilization, phytohormone production, and biofilm formation. Abiotic stress control genes, comprising important osmoprotectants, antioxidants, ion transporters, and chaperones, were also identified. It's particularly interesting the presence of the *suf* system, linked to nitrogenase biosynthesis under stress, as this strain demonstrated to fix nitrogen even under saline conditions. Complementary transcriptomic analysis of maize revealed that *Vreelandella* sp. DE treatment significantly upregulated genes associated with growth, such as growth-regulating factors and phytohormones, DNA replication and repair, protein translation, stress response compounds (osmoprotectants), and antioxidant systems under salt stress. These findings provide valuable insights into beneficial interactions between *Vreelandella* sp. DE and maize, supporting development of novel bioinoculants to enhance crop productivity in saline soils.

Construction of a c-di-GMP biosensor for Rhizobiaceae

Pedro José Pacheco Márquez¹, Marta Maldonado Moreno¹, Elizaveta Krol^{2,3}, Anke Becker^{2,3}, SJuan Sanjuán Pinilla¹, Daniel Pérez Mendoza¹

¹Soil and Plant Microbiology Department, Zaidin Experimental Station

²Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO), Philips-Universität Marburg

³Department of Biology, Philips-Universität Marburg

Contacto: pedro.pacheco@eez.csic.es

Rhizobia-legume symbiosis is agronomically and environmentally relevant mainly due to the biological nitrogen fixation carried out by rhizobia. This process enables to reduce the supply of nitrogen fertilisers to the soil, thereby promoting sustainable agriculture. In this context, the bacterial second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) is key in the transition from free-living to a symbiotic state. However, elucidating all the c-di-GMP-dependent molecular pathways is an intricate task. Advancing the understanding of c-di-GMP signaling in bacteria requires genetically encoded biosensors capable of monitoring real-time, dynamic changes in c-di-GMP levels.

In this work, the development of a biosensor able to detect c-di-GMP in *Ensifer meliloti* is proposed. This biosensor relies on the interaction of the transcriptional regulator CuxR with a specific promoter, *Puxs1*, which was previously fused to the gene encoding the enhanced green fluorescent protein (*Puxs1*-EGFP)[1]. When CuxR binds *Puxs1*, a fluorescent signal is produced, with its intensity reflecting the intracellular c-di-GMP levels.

To assess the sensitivity of our biosensor, we tested three distinct genetic backgrounds with different c-di-GMP concentrations and compared the results with those obtained from a commercial c-di-GMP quantification ELISA Kit. We evaluated these genetic backgrounds, each harbouring the biosensor (*Puxs1*-EGFP), with or without a second plasmid carrying the activator *cuxR* gene under the control of a lac promoter. The results suggest that, in *E. meliloti*, the expression of *cuxR* is insufficient for optimal biosensor sensitivity under physiological c-di-GMP conditions. However, when *cuxR* was constitutively expressed, the sensitivity of our system improved significantly. Based on these findings, we propose that constructing the complete biosensor *Puxs1*-EGFP + *Plac-cuxR* in a single plasmid would enhance the reliability of the system. This approach would also facilitate its application across other taxonomic groups, creating a universal and versatile tool for c-di-GMP detection.

References:

[1] Schäper, S. *et al.* (2017). *PNAS* 114, E4822-E4831.

Funding: This research was funded by the European Union Next Generation EU/PRTR project TED2021-129640B-I00

***Trichoderma* mediates wheat plant responses to water stress and rehydration**

Julio Ascaso, Alberto Pedrero-Méndez, David Mendoza-Salido, Enrique Monte, Rosa Hermosa

Institute for Agribiotechnology Research (CIALE), Department of Microbiology and Genetics,
University of Salamanca.

Contacto: JulioAscaso@usal.es

Trichoderma is a globally distributed genus of ascomycete fungi with notable agricultural relevance, particularly as a biocontrol agent against plant pathogens. These fungi colonize the rhizosphere, establishing symbiotic associations with host plants and enhancing their tolerance to biotic and abiotic stresses. Among these, drought is one of the most significant stress factors limiting global crop production, with its detrimental effects increasingly intensified by climate change. In this work, we assessed the ability of *T. asperellum* T25 (isolated from soil) and *T. simmonsii* T137 (isolated from root endosphere of healthy wheat plants) to enhance wheat tolerance to drought and facilitate recovery from water stress. *Trichoderma* strains were applied to the plant growth substrate, and three irrigation conditions were considered: optimal irrigation, water stress, and rehydration. Wheat seedlings were subjected to water stress treatment by withholding irrigation for nine days, followed by a three-day rehydration phase. Samples were collected at the end of the water stress period and after rehydration for physiological (fresh and dry weights, relative water content) and biochemical (H₂O₂ content, antioxidant enzymatic activities, osmolyte accumulation) analyses. *Trichoderma*-inoculated plants exhibited reduced ROS damage and increased antioxidant activity compared to non-inoculated plants under water stress conditions. Results showed that both *Trichoderma* strains improved wheat tolerance to water stress and enhanced recovery after drought. These findings underscore the potential of *Trichoderma* strains to mitigate the adverse effects caused by water scarcity and highlight its role as a valuable tool in protecting crops against drought.

Funding: This research was supported by grants co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER) and the governments of Spain (MCIN/AEI PID-2021-126575OB-I00) and Castilla y León (SA192P23).

Acknowledgments: J.A. acknowledge the support of his predoctoral contract by Regional Government of Castilla y León

Efecto fisiológico de *Trichoderma* spp. en el cultivo de *Solanum lycopersicum*

Andrea Fadón Alberca, Álvaro Iglesias Ganado, Jorge Martín García, María Isabel Pozo Romero, Jorge Poveda Arias, Oscar Santamaría Becerril

Universidad de Valladolid

Contacto: jorge.poveda@uva.es

El uso de microorganismos beneficiosos en agricultura constituye una tecnología al alza, sin embargo, gran parte de sus mecanismos de actuación están aún por descifrar. El género *Trichoderma* se presenta como uno de los principales tratamientos biológicos debido a su capacidad de controlar fitopatógenos, actuar como bioestimulante y mejorar la absorción de nutrientes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio ha sido profundizar en los mecanismos de interacción de *Trichoderma* y *S.lycopersicum* a través de su respuesta fisiológica y bioquímica. Para ello, se analizaron parámetros fisiológicos como la actividad del fotosistema II, la conductancia estomática, la transpiración y la actividad de la cadena transportadora de electrones. Estos parámetros nos proporcionan información sobre la utilización eficiente de la energía solar, la capacidad de la planta para mantener el equilibrio hídrico y en general, del estado de salud general de la planta. De forma paralela, también se evaluaron parámetros bioquímicos a través del método Rainbow que permite el análisis de los pigmentos fotosintéticos, azúcares libres, aminoácidos libres, almidón, MDA fenoles y flavonoides. Todos ellos compuestos clave en el metabolismo de la planta. Con estos datos podremos tratar de comprender parte de los mecanismos de interacción *Trichoderma-S. lycopersicum*, contribuyendo a la búsqueda de estrategias más eficientes en la producción agrícola.

Selección de complejos leguminosa-rizobio-PGP con potencial para la fitoextracción de Cu y Zn de suelos contaminados.

José-María Barcia-Piedras¹, María del Carmen Montero-Calasanz¹, María Teresa Cubo², María del Rosario Espuny², María Camacho¹

¹Área de Recursos Naturales y Forestales, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Alcalá del Río.

²Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

Contacto: josemariabarcia Piedras@gmail.com

La sobreexplotación de los ecosistemas para satisfacer la actual demanda alimentaria genera graves problemas medioambientales, entre ellos la acumulación de metales, como cobre o zinc, debido al uso masivo de insumos agrícolas (abonos, plaguicidas, etc.).

Entre las posibles actuaciones para solventar la acumulación de estos metales está la fitorremediación (uso de plantas y microorganismos asociados a ellas para descontaminar el medio ambiente), una técnica económica y sostenible. Gracias a estudios previos, se conoce que plantas del género *Medicago* son capaces de acumular Cu o Zn; y que este proceso se facilita con la presencia de bacterias promotoras del crecimiento (PGPBs) [a]. Además, se han descrito rizobios asociados a *Medicago* con un alto potencial para interactuar en suelos contaminados con estos metales [b]. Por ello, en este trabajo se evaluó (I) el mejor tándem, entre tres especies del género *Medicago* (*sativa*, *polymorpha* o *truncatula*) y dos rizobios del género *Ensifer* (USDA1047 o SF3.41), en ambientes contaminados con Cu o Zn y, (II) el efecto de una PGPB (cepas P13 –*Bacillus*- o P14 –*Pseudomonas*-) en la tolerancia a estos metales, mediante ensayos en jarros de Leonard con Cu o Zn (50 y 200 ppm, respectivamente).

Los resultados mostraron que, en ambientes con un exceso de cobre, la combinación con mayor capacidad fitoextractora fue la formada por *M. sativa* junto al consorcio USDA1047-P13. Sin embargo, en una solución contaminada con zinc, la mejor opción fue *M. polymorpha* inoculada con USDA1047 independientemente de la presencia de la PGPB.

Referencias:

[a] Paredes, C., *et al.* 2024. Phytoremediation of copper and zinc-contaminated soils through the combined use of *Medicago* spp and associated bacteria. Abstracts-book XIX-SEFIN-Congress, p.38.

[b] Montero-Calasanz, M., *et al.* 2024. Deciphering the metabolic potential of *Ensifer* spp. in bioremediation. Abstracts-book XIX-SEFIN-Congress, p.15.

Financiación:

Estudio realizado gracias al proyecto TED2021-130122B-I00/AEI/10.13039/501100011033/ Unión Europea Next GenerationEU/PRTR.

Migración de vesículas extracelulares de *Escherichia coli* a través del sistema vascular de plantas para su uso a nivel biotecnológico para el tratamiento de fitopatógenos

Rubén Izquierdo Fernández¹, Francisco José Mancebo Pascual¹, Miriam Simó-Esquivel^{2,3}, Inmaculada Navarro Herrero³, Ester Marco Noales³, Gaspar Pérez Martínez¹

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

²Tragsa, Empresa de Transformación Agraria, Delegación de Valencia

³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada (Valencia)

Contacto: ruben.izquierdo@iata.csic.es

Existen estudios sobre la capacidad de algunas partículas, como nanopartículas o vesículas extracelulares vegetales, para desplazarse a través de los tejidos vegetales, abriendo nuevas posibilidades de aplicaciones biotecnológicas en la agricultura. Sin embargo, la migración de vesículas extracelulares (VEs) de origen bacteriano en plantas es un campo poco explorado. Este estudio investiga por primera vez la capacidad de las VEs de *Escherichia coli* (*E. coli*) para distribuirse y migrar dentro de tejidos vegetales. Con este propósito, se realizaron ensayos en los que inocularon VEs de *E. coli* marcadas con un fluoróforo en brotes de alfalfa (*Medicago sativa*) y plantas jóvenes de vid (*Vitis vinifera*). Se emplearon distintos métodos de aplicación, incluyendo la incubación de brotes en una solución que contenía VEs en el caso de la alfalfa, y la inyección directa o aplicación mediante hidrogeles en la vid. La microscopía de fluorescencia reveló que las VEs se localizan principalmente en tejidos conductores, con una mayor acumulación en zonas próximas al sitio de aplicación, aunque se detectaron hasta 6 cm de distancia. Todos los métodos de aplicación facilitaron eficazmente la absorción de las VEs. Adicionalmente, análisis moleculares mediante qPCR confirmaron la capacidad de las VEs para migrar a través del sistema vascular. Estudios complementarios, como inmunoensayos, están en desarrollo para validar su localización específica en los tejidos. Este enfoque podría abrir nuevas posibilidades para el uso de VEs bacterianas en la entrega dirigida de cargas moleculares, como compuestos antibacterianos para el control de fitopatógenos.

Harnessing soybean genetic diversity to understand and enhance nitrogen-fixing symbiosis

María López Beltrán¹, Ana María Cutiño¹, Zhu Jianan², María Camacho³, Jose María Vinardell¹, Francisco Javier Lopez Baena¹, Pablo del Cerro¹, **Catherine Nancy Jacott¹**

¹Universidad de Sevilla

²Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences

³IFAPA-Las Torres

Contacto: cjacott@us.es

To meet the EU's demand for sustainable soybean proteins, efforts are focused on boosting domestic production while reducing reliance on nitrate fertilizers. Rhizobia offer a sustainable approach to enhance soybean yields through symbiotic nitrogen fixation, but the genes controlling rhizobia compatibility remain poorly understood.

Many rhizobia use a Type III Secretion System to deliver effector molecules that suppress plant defense responses to promote nodulation. However, some soybean genotypes possess Resistance proteins that detect these effectors, triggering immunity and limiting colonization. Thus, depending on the host's genetic background, rhizobial effectors can either facilitate or restrict nodulation. Understanding these interactions is crucial to optimizing nitrogen-fixing relationships in agricultural soybeans.

To identify soybean genes involved in rhizobia compatibility, we are conducting Genome-Wide Association Studies (GWAS) using a panel of genetically diverse soybean cultivars and rhizobial effector mutants. This analysis combines phenotype and genotype data to pinpoint candidate genetic loci associated with nodulation. Our collection includes over 600 globally diverse, SNP-genotyped soybean cultivars, many of which are unexplored in nodulation studies and are highly relevant to European agriculture.

From this set, we selected 210 cultivars based on our analysis of population structure, phylogenetics, and preliminary nodulation data. We are performing full genome sequencing of these cultivars to enhance the resolution of our analysis. Novel variant (SNP) discovery and large-scale greenhouse nodulation assays underway.

In addition to uncovering the genetic interplay between rhizobia and soybeans, this fully sequenced, genetically diverse population will provide a valuable resource for our future basic and applied research including soybean traits beyond symbiotic compatibility.

Mejora de la capacidad de promoción del crecimiento mediante el uso de coproductos de la industria azucarera bajo condiciones de estrés salino en plantas de guisante

David Correa Galeote, Álvaro Bayo-Martínez, Jesús González López

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

Contacto: dcorrea@ugr.es

El uso de fertilizantes químicos ha impulsado la producción de alimentos ampliamente; sin embargo, la sociedad actual busca que la producción de productos agropecuarios tenga una mayor sostenibilidad. Por tanto, es necesario desarrollar fertilizantes amigables con el medio ambiente a partir de residuos industriales mediante su transformación en coproductos con valor añadido. Recientemente, los residuos generados en la industria azucarera se han propuesto como enmiendas orgánicas que pueden promover el crecimiento vegetal; sin embargo, la capacidad de estos coproductos para prevenir los daños causados por el estrés salino no se ha establecido todavía. Para ello, se evaluó el efecto bioestimulante y el papel osmoprotector del condesado soluble de melaza obtenido tras la fermentación etanólica de melazas de caña de azúcar y remolacha en plantas de guisante (*Pisum sativum*) cultivadas en solución hidropónica de Rigaud y Puppo durante 28 días. De este modo, se determinó el desarrollo vegetativo, la capacidad fotosintética y el contenido en C y N en plantas crecidas en condiciones control (ausencia del coproducto) y en plantas suplementadas (1% v/v) con el coproducto tanto en no salinidad (0 mM NaCl) como en salinidad (25 mM de NaCl) en una cámara de cultivo. Interesantemente, la producción de biomasa aérea se incrementó significativamente en las plantas suplementadas con el coproducto en comparación a las plantas control tanto en condiciones en no estrés como en estrés salino. Además, el estado fotosintético y el contenido de C y N de las plantas mejoraron cuando las plantas fueron suplementadas con el condesado soluble de melaza, independientemente de la concentración de NaCl. Por lo tanto, estos resultados indican que el coproducto es un bioestimulante vegetal que mejora el crecimiento de las plantas, incluso cuando los cultivos son sometidos a una elevada salinidad debido a su capacidad para reducir los daños derivados del estrés salino.

Phylogenetically related *Bacillus* species differentially modulate seed-driven metabolic reprogramming and adaptation of adult plants

María Luisa Carrégalo Ríos¹, Carlos Alberto Molina Santiago¹, María Victoria Berlanga Clavero¹, Mónica Pineda Dorado², Juan Manuel Alba Cano³, Antonio de Vicente¹, Matilde Barón Ayala², Pieter C Dorrestein⁴, Diego Francisco Romero Hinojosa¹

¹Universidad de Málaga.

²Estación Experimental del Zaidín-CSIC.

³IHSM-CSIC-UMA.

⁴UCSD.

Contacto: luisacarregalo@uma.es

Plant-beneficial microbes provide multifaceted traits that contribute to plant health. *Bacillus* species, frequently found within the plant holobiont, are known to enhance seed germination, promote plant growth, and bolster defense mechanisms against phytopathogens, although the molecular shifts underlying these processes remain unstudied. We have previously shed light on the topic, concluding that seed treatments lead to metabolic changes in adult plants. In this process the extracellular matrix component of *Bacillus subtilis*, TasA, and fengycin, a secondary metabolite, play crucial roles[1]. In this study, we hypothesize that this metabolic reprogramming at seed level is conserved among closely related *Bacillus* species, while differences may arise from variations in secondary metabolite production. To evaluate this, we conducted an in-depth analysis of the metabolome of whole plants emerging from seeds treated with *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis*. Despite showing a slower development at radicle level after seed treatment with *B. velezensis*, final adult plants display similar phenotypes to all plant groups studied. This effect occurs in a dose-dependent manner, while *B. subtilis* consistently promotes plant growth regardless of dose. Both bacterial species drive distinct metabolic profiles in plants, with leaves showing the greatest divergence. *B. subtilis* treatment promotes the accumulation of tryptophan alkaloids and phenolic compounds, whereas *B. velezensis* treatment leads to a shift in the pool of lipids, highlighting their unique metabolic imprints. Eventually, these metabolic shifts differentially support plants under stress conditions. *Bacillus*-treated plants exhibit improved resilience to hydric stress and increased protection against biotic stressors. These findings underscore the complex, dose-dependent roles of *Bacillus* species in shaping plant growth, metabolic pathways, and ecological resilience through seed inoculation.

[1] Berlanga-Clavero, M. V., et al. (2022). *Nature Microbiology*, 7(7), 1001–1015. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01134-8>

This work was supported by grants from ERC Starting Grant (BacBio 637971), the Spanish Government (PID2019-1077242GB-I00) and Junta de Andalucía (P20_00479).

Polyamines, new players in the microbe-induced pest resistance

Iván Manuel Fernández López¹, Sara Comerón Tabernero¹, Ana Isabel González Hernández², Gemma Camañes Querol³, Víctor Flors³, Ainhoa Martínez Medina¹

¹Molecular AgroEcology Laboratory (MOLECOLAB), Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

²Superior Polytechnic School of Zamora, University of Salamanca.

³Biochemistry and Biotechnology Group, Universitat Jaume I.

Contacto: ivan.fernandez@csic.es

Polyamines are molecules involved in plant development and defense responses against abiotic and biotic stresses, including insect pests. The biosynthesis of polyamines in tomato plants is mainly driven by arginine decarboxylase (ADC) and ornithine decarboxylase (ODC) enzymes. The beneficial soil fungus *Trichoderma harzianum* induces systemic resistance in different plant species, priming plant defenses against pathogens and pests. We hypothesized that polyamine metabolism is involved in *Trichoderma*-induced resistance in tomato plants against the foliar herbivore *Spodoptera exigua*. To test this hypothesis, we first explored the impact of *Trichoderma* inoculation on the polyamine-related response of tomato plants to herbivory. We found that *Trichoderma* primed specifically the ADC-biosynthesis pathway of polyamines, and also it enhanced the expression of genes related to the polyamine conjugates biosynthesis. By contrast, *Trichoderma* inoculation did not affect the ODC-biosynthetic pathway. Interestingly, by using the tomato lines SilADC (knock-down in arginine-decarboxylase) and SilODC (knock-down in ornithine decarboxylase) we found that *Trichoderma*-induced resistance in tomato against *S. exigua* requires both biosynthetic pathways.

Levaduras, miles de años facilitando la vida al ser humano

Carlos Lucena¹, Francis J. Ruiz-Castilla², Francisco J. Romera³, José Ramos²

¹Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3, Universidad de Córdoba.

²Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario de Rabanales (CeIA3), Universidad de Córdoba.

³Departamento de Agronomía (DAUCO), Unidad de Excelencia María de Maeztu 2021–2024, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3, Universidad de Córdoba.

Contacto: b42lulec@uco.es

Las levaduras son hongos unicelulares que el ser humano ha empleado para su alimentación desde comienzos de la civilización. Responsables de la fermentación necesaria para la elaboración de pan, vino o cerveza. Actualmente, con la intención de conseguir un mundo cada vez más ecológico y sostenible, se buscan microorganismos que faciliten la disponibilidad de nutrientes en las tierras de cultivo, para que las plantas sean productivas sin necesidad de abusar de los fertilizantes químicos y que a la vez tengan la capacidad de actuar como agentes de control biológico frente a ataques patógenos. Las levaduras toleran un amplio rango de condiciones abióticas y tienen un rápido crecimiento. Las hay resistentes a altas concentraciones de sal, como *Debaryomyces hansenii*, y también tolerantes a altas temperaturas, como *Hansenula polymorpha*. Nuestro grupo ha sido pionero en el análisis del papel que juegan ambas levaduras sobre la inducción de mecanismos de respuesta frente a deficiencias nutricionales en plantas de interés agronómico. Han demostrado ser eficaces en favorecer la solubilización y disponibilidad de los nutrientes, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo circunstancias de estrés nutricional. Además, su capacidad de producción de toxinas o de inducir resistencia, las habilita como potenciales agentes de biocontrol frente a ataques por patógenos en plantas. Trabajos previos del grupo han demostrado la capacidad de *Debaryomyces hansenii* como sistema de biocontrol frente a hongos filamentosos patógenos en plantas. La finalidad que persigue la comunicación es la de poner en valor el papel de las levaduras en la nutrición mineral de las plantas y en su protección. Los resultados obtenidos sugieren que su empleo podría minimizar el impacto medioambiental negativo que provoca el abuso de fertilizantes y de fitosanitarios de síntesis química en nuestros terrenos de cultivo, y convertirse en una alternativa más sostenible y respetuosa con el medioambiente.

Symbiotic microorganisms meet medicinal plants: accident or arrangement?

Bo Zhu^{1,2}, Yichun Zhu², Wenhua Chen², Luping Qin², Paula García Fraile¹

¹Microbiology and Genetics Department, University of Salamanca.

²School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University.

Contacto: zhubo@zcmu.edu.cn

In the long co-evolutionary history, like other plants, medicinal plants have maintained a mutually beneficial relationship with symbiotic microorganisms. Symbiotic microorganisms enhance the growth and development of medicinal plants, bolster their resistance to environmental stress, and improve their adaptation to changing conditions. As feedback, medicinal plants provide a stable and safe habitat for symbiotic microorganisms and offer them sufficient nutrients. However, did symbiotic microorganisms originate within seeds at the beginning of their emergence, or were they later recruited during environmental adaptation? During the past 18 years, we have systematically studied medicinal plants microbial communities, their biodiversity, secondary metabolites, and functions, as well as the beneficial effects on the host plant and the interaction mechanism. More than 20 medicinal plants of China, such as *Crocus sativus*, *Dendrobium nobile*, and *Atractylodes macrocephala* were included in the study. Several fungal and bacterial isolates were found to play crucial roles for plant development and fitness. Moreover, several biological fertilizers have been developed and applied to medicinal plants in the field. Our study provided scientific evidence and practical experience for the large-scale application of symbiotic microorganisms biotechnology in medicinal plants' field cultivation.

Keywords: Medicinal plants, symbiotic microorganisms, cross talk, biological fertilizer.

Acknowledgements: The study was supported by Zhejiang Chinese Medical University.

Desarrollo de herramientas microbianas para control de cultivos estratégicos

Clara Izquierdo Jiménez¹, Sergi Maicas Prieto², Cecilia Recuero García¹, Inmaculada del Castillo Madrigal¹

¹SEIPASA.

²Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universitat de Valencia.

Contacto: cizquierdo@seipasa.com

Los efectos del cambio climático sobre los sistemas agrarios representan un problema de vital importancia respecto a la calidad de la producción agrícola del futuro, haciendo necesaria una transición hacia prácticas sostenibles que permitan mejorar el comportamiento de los cultivos, disminuyendo las consecuencias de condiciones climáticas extremas sobre la fertilidad y la calidad del suelo. Este proyecto nace como respuesta a una demanda directa del sector agrario de herramientas sostenibles frente a una regulación cada vez más restrictiva en el uso de productos químicos. El objetivo principal de este proyecto es, por tanto, el desarrollo de bioestimulantes a partir de microorganismos aislados desde cultivos de interés.

Con el propósito de cumplir nuestro objetivo se tomaron muestras de suelo de cuatro cultivos estratégicos para Seipasa (naranja, patata, olivo y maíz), para los cuales se desean desarrollar herramientas específicas de biocontrol y bioestimulación, y se seleccionaron los momentos fenológicos de muestreo, atendiendo a la actividad metabólica de las plantas (floración y formación del fruto). Los diferentes microorganismos se aislaron en función de criterios morfológicos y se caracterizaron en base a varias propiedades de promoción del crecimiento vegetal. Además de esto, se realizó un estudio comparativo en cuanto a las características fisicoquímicas del suelo y la diversidad bacteriana obtenida en cada uno de los suelos y de los momentos fenológicos estudiados. Con este trabajo se pretende ampliar la colección de microorganismos propia de Seipasa, mejorando su capacidad de respuesta para el desarrollo de productos agrícolas basados en organismos beneficiosos exclusivos, caracterizados en base a su capacidad para ser formulados de manera efectiva, permitiendo su uso como herramientas para los agricultores. Este enfoque mejora la posibilidad de obtener productos finales que cumplan con los requisitos precisos para su escalabilidad y estabilidad, de forma que permitan su registro y comercialización.

Agradecimientos: Ayuda DIN2022-012519 financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033

Extracellular vesicles facilitate communication between legume plants and rhizobia in nodules: protein trafficking analysis

Paula Ayala-García¹, Irene Herrero-Gómez¹, Irene Jiménez-Guerrero¹, Viktoria Otto², Natalia Moreno de Castro¹, Mathias Müsken³, Lothar Jänsch⁴, Marco van Ham⁴, José-María Vinardell¹, Francisco Javier López-Baena¹, Francisco Javier Ollero¹, Francisco Pérez-Montañó¹, José Manuel Borrero-de Acuña¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

²Institute of Microbiology, Technische Universität Braunschweig, Germany.

³Central Facility for Microscopy, Helmholtz Centre for Infection Research, Germany.

⁴Cellular Proteome Research, Helmholtz Centre for Infection Research, Germany.

Contacto: payala@us.es

Rhizobium-legume symbiosis is one of the closest bacterium-host relationships known to nature. This biological process involves a complex and specific exchange of signals that culminates in root nodule development, where rhizobia are internalized within plant cells and differentiated into bacteroids. The unrestricted interface between the bacteroid and the plant membranes is known as the symbiosome space. Although multiple molecular aspects of symbiosome interface have been extensively covered, the possibility of interdomain molecule trafficking by extracellular vesicles (EVs) in this intercell space has not been questioned so far. EVs are secreted by bacteria and eukaryotes into the surrounding environment to preserve and transport biomolecules such as metabolites, DNA, RNA, and proteins. Among their functions, EVs act as molecular vehicles for inter-kingdoms communication. In this work, we prove interdomain EV trafficking in the symbiosome space of nodules developed between different *Rhizobium*-legume symbiotic pairs using a novel isolation procedure. We further analyze the bacterial EVs-encased proteomes in the symbiosome space of the different partnerships, revealing both conserved and unique traits in each symbiotic system. Thus, we unveil EV-conveyed molecular players whose potential roles during symbiosis can be further explored and harnessed for the development of novel strategies of agro-economic value.

Funding: EMERGIA20_00048; PID2021-122395OA-I00, PID2020-118279RA-I00/10.13039/501100011033; PID2022-141156OB-I00; MCIN/AEI/10.13039/501100011033; FPU18/06248.

Radisei: un caso de éxito en el uso de bacterias bioestimulantes en el mercado

Inmaculada del Castillo, Clara M^a Izquierdo, Rubén Guijarro, Francisco Espinosa

Seipasa.

Contacto: idelcastillo@seipasa.com

Tras la entrada en vigor en 2022 del reglamento europeo sobre fertilizantes, desde el Parlamento Europeo se reconoce oficialmente la regulación de bioestimulantes, adoptándose en la norma una definición consensuada, así como una descripción de las funciones que deben aportar a los cultivos. De esta forma, desde las instituciones se reconoce el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y se le da una cobertura legal para su comercialización y aplicación al campo, promoviendo en la práctica que se extienda el uso de bioestimulantes en la agricultura.

Los bioestimulantes son productos que contienen sustancias o microorganismos que son capaces de estimular los procesos naturales que mejoren o benefician la absorción de nutrientes, la eficacia de estos nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo cuando se aplican a las plantas o al suelo.

Seipasa, empresa especializada en el desarrollo y fabricación de productos fertilizantes y fitosanitarios sostenibles, he desarrollado Radisei[®] como herramienta para la bioestimulación de los cultivos. Se trata de un producto desarrollado a partir de la cepa SEIBS23, con propiedades de promoción del crecimiento vegetal, y registrado en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y certificado en agricultura ecológica bajo normativa UNE. El registro de un producto bioestimulante supone además una garantía de su efecto sobre cultivos, puesto que el proceso requiere resultados estadísticamente significativos en diversos grupos de cultivo mediante ensayos en campo. El modo de acción de Radisei[®] se basa en la capacidad de la cepa SEIBS23 para desbloquear nutrientes en el entorno de la raíz y ponerlos a disposición de la planta, así como en su capacidad de colonizar la rizosfera. Desde una perspectiva industrial ha sido necesario el desarrollo de una formulación que vehiculizase a la cepa de interés, manteniendo estable el producto para permitir su transporte y almacenaje.

Bacterias metanotrofas contra el estrés hídrico en plantas

Nora Pamela Pacheco de la Cruz¹, Adoración Barros-Rodríguez¹, Vicente Perez-Tapia², Maximino Manzanera¹

¹Universidad de Granada.

²VitaNtech Biotechnology.

Contacto: manzanera@ugr.es

El metano (CH₄) es uno de los gases de efecto invernadero más perjudiciales y uno de los más abundantes generados por actividades humanas. En la actualidad, el cambio climático impulsado por los gases de efecto invernadero, como el metano, ha provocado importantes impactos climáticos, incluidos el aumento de las temperaturas y las variaciones en los patrones de precipitación. Una de las consecuencias más críticas de estos fenómenos es la sequía, que afecta negativamente la fisiología y bioquímica de las plantas, disminuyendo su rendimiento agrícola.

Las bacterias oxidadoras de metano (metanotrofas) pueden establecer relaciones simbióticas con otras bacterias del metabolismo del nitrógeno y con plantas, en un proceso en el que el metano, combinado con oxígeno, se transforma en dióxido de carbono y agua. Esta agua producida durante la oxidación del metano se integra en los tejidos de la planta, protegiéndola contra la sequía. Por otra parte, el dióxido de carbono es asimilado como parte del proceso fotosintético de la planta. En esta investigación, se aislaron comunidades de bacterias metanotrofas junto con bacterias implicadas en el metabolismo del nitrógeno y se evaluó su interacción con cultivos de trigo y pimiento en presencia de metano. Los resultados mostraron un impacto positivo en el crecimiento de las raíces y tallos de las plantas, junto con una significativa reducción del metano ambiental, destacando su potencial para mejorar la resistencia de las plantas al estrés hídrico.

A novel ANL tomato transcription factor regulates mycorrhiza induced resistance

Beatriz Romero-Rodríguez¹, Iván Manuel Fernández López¹, Francisco Colina¹, María J. Pozo², Ainhoa Martínez Medina¹

¹Molecular AgroEcology Laboratory (MOLECOLAB), Estación Experimental del Zaidín, (EEZ-CSIC).

²Department of Soil and Plant Microbiology, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

Contacto: beatriz.romero@eez.csic.es

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi establish an intimate mutualistic association - the AM symbiosis - with the majority of land plants. Among multiple benefits, AM fungi can boost plants' ability to cope with biotic stresses leading to mycorrhiza-induced resistance (MIR). MIR is commonly associated with primed activation of broad-spectrum immune responses leading to enhanced accumulation of plant defense-related compounds. MIR represent thus a highly promising biotechnological tool for controlling pests and diseases in the frame of sustainable agriculture. Still, the molecular mechanisms underlying MIR onset and display remain obscure. Here, we identified and characterize a novel ANL type transcription factor of tomato (SIANL), as a new player in MIR to pest's regulation. We used a biological system including tomato plants (*Solanum lycopersicum*), the AM fungi *Rhizophagus irregularis* and *Funneliformis mosseae*, and the chewing herbivores *Spodoptera littoralis* (generalist) and *Manduca sexta* (specialist). Untargeted and targeted transcriptomic analyses indicated a higher expression of SIANL in mycorrhizal plants upon herbivory, compared to non-mycorrhizal plants. Functional characterization of SIANL by overexpression with *Agrobacterium*, and silencing with VIGS, revealed a relevant role of SIANL in plant resistance to insect herbivory. Remarkably, SIANL is further regulated in shoots and roots under nitrogen starvation conditions, pointing to SIANL as node of convergence between these two processes: MIR and nitrogen deficiency responses. Understanding the role and functioning of SIANL in these critical processes for plant growth and survival is essential to optimize MIR application in agricultural systems.

Our research was funded by PID2021-128318OA-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and "ERDF A Way of Making Europe; and the ERC Consolidator Grant MIMIR_101124883 of the European Research Council.

***Trichoderma* isolates display different mechanisms to control *Fusarium* head blight on wheat plants**

Alberto Pedrero-Méndez¹, Marco Cesarini², Arianna Petrucci^{2,3}, Sabrina Sarrocco^{2,1}, Rosa Hermosa¹

¹Department of Microbiology and Genetics, Institute for Agrobiotechnology Research (CIALE), University of Salamanca.

²Department of Agriculture, Food and Environment, University of Pisa.

³Department of Plant and Environmental Sciences and Copenhagen Plant Science Centre, University of Copenhagen.

Contacto: alberto.pedrerom@usal.es

Fusarium head blight (FHB) is a disease that causes economic losses worldwide on wheat grain production. Several *Fusarium* species cause the disease, including *F. graminearum* (Fg), one of the most aggressive species [1]. The use of *Trichoderma* spp., multipurpose plant beneficial biocontrol agents, is an efficient sustainable option to manage this disease [2,3]. We evaluated in greenhouse assays the ability of three *Trichoderma* strains: *T. asperellum* T25 [4] and *T. harzianum* T136 and *T. simmonsii* T137, two strains previously isolated from the root endosphere of wheat plants [5,6], to control FHB caused by artificial inoculation of Fg in wheat plants spikelets. Plants previously treated with T25 or T136 showed a FHB disease index reduction compared to those inoculated only with Fg. Quantitative real-time PCR was used to analyse expression levels of plant defence-related genes. Upregulation of PR1 and PAL1, genes related to salicylic acid pathway, was associated with T25 and T136 treatments. Moreover, dual culture assays with *Trichoderma* strains and Fg showed differences in antagonistic properties among the three *Trichoderma* strains.

1. Petrucci *et al.*, 2023. *Eur. J. Plant Pathol.* 167, 453–476.
2. Sarrocco *et al.*, 2013. *J. Plant Path.* 1, 19–27.
3. Cesarini *et al.*, 2025. *Microbiol. Res.* 290, 127941.
4. Hermosa *et al.*, 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1890–1898.
5. Illescas *et al.*, 2020. *Front. Plant Sci.* 11, 575861.
6. Pedrero-Méndez *et al.*, 2021. *J. Fungi* 7, 1087.

This research was supported by grants co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER) and the governments of Spain (PID2021–126575OB-I00 and TED2021–130934B-I00) and Castilla y León (SA192P23). A.P.-M. acknowledges the support of his predoctoral contract by Regional Government of Castilla y León and the support of his mobility grant by University of Salamanca.

La percepción de ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos en *Dickeya dadantii* 3937 está mediada por un quimiorreceptor monomodular con diferentes sitios de unión

Santamaría-Hernando, S.^{1,2,3}, Cerna-Vargas, J.P.^{1,2}, Gil-Tejedor, G.^{1,2}, Rodríguez-Herva, J.J.^{1,2,3}, Krell, T.⁴, López-Solanilla, E.^{1,2,3}

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (UPM) .

²Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC).

³Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid .

⁴Departamento de Biotecnología y Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada.

Contacto: saray.santamaria@upm.es

Dickeya dadantii 3937 (Dd3937) es el agente causal de la podredumbre blanda en una amplia variedad de cultivos. La quimio percepción de compuestos derivados de la planta a través de proteínasceptoras de metilo (MCPs) gobierna procesos fundamentales durante la infección como la motilidad o el control de la expresión de factores de virulencia.

De las 47 MCPs, o quimiorreceptores (CRs), presentes en Dd3937, en este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica y funcional del quimiorreceptor DDA3937_RS00715. La expresión y purificación del dominio de unión a ligando (LBD) del quimiorreceptor permitieron realizar ensayos de unión a ligandos, los cuales mostraron afinidad del quimiorreceptor por los compuestos aromáticos gentisato y salicilato, y por los ácidos carboxílicos piruvato y citrato. Estudios de calorimetría indican que los compuestos aromáticos y el piruvato son reconocidos por la proteína en una zona diferente al citrato, indicando la existencia de dos sitios de unión. El LBD de este quimiorreceptor pertenece a la familia "four helix bundle" y está compuesto por un solo módulo estructural. Para nuestro conocimiento este estudio muestra el primer caso de múltiples sitios de unión en un dominio monomodular, sugiriendo un nuevo mecanismo para expandir el perfil de ligandos reconocidos por receptores.

La caracterización funcional del quimiorreceptor se realizó utilizando la cepa silvestre, el mutante DDA3937_RS00715 y la cepa complementada. Los resultados mostraron que Dd3937 presenta quimiotaxis activa hacia el piruvato y el citrato de sodio, mediada por el quimiorreceptor DDA3937_RS00715, mientras que no fue posible detectar quimioatracción hacia el gentisato y el salicilato. Sin embargo, los resultados positivos en la unión de estos compuestos, junto con un fenotipo diferencial de la cepa mutante en plantas con diferentes cantidades de salicilato, apuntan a un papel de la percepción de estos compuestos orgánicos en el control de la virulencia.

Financiación: PID2021-125673OB-I00. MCIN/AEI/10.13039/501100011033

Valorización de residuos vegetales domésticos como agentes de control de bacterias fitopatógenas

Silvia Estarriaga¹, Carmen Sanmartín¹, Daniel Plano^{1,2}, Nieves Goicoechea³

¹Universidad de Navarra. Facultad de Farmacia y Nutrición, Departamento de Ciencias Farmacéuticas.

²Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdisNA).

³Universidad de Navarra. BIOMA (Instituto de Biodiversidad y Medio Ambiente). Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas.

Contacto: sestarriagan@unav.es

En Europa se produce una gran cantidad de residuos en la cadena alimentaria [1]. Los residuos vegetales contienen principios activos con propiedades antimicrobianas [2], aunque la mayoría de los estudios han explorado su efecto en patógenos humanos. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto inhibitorio de residuos vegetales domésticos (peladuras de mandarina, limón, patata y plátano y hojas de berza), sobre el crecimiento de dos bacterias fitopatógenas: *Rhizobium radiobacter* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. La primera provoca tumores en un amplio espectro de plantas y la segunda causa podredumbre blanda en diversos cultivos. Los residuos se secaron a 40 °C, se molieron y se caracterizaron espectrofotométricamente determinando los niveles totales de terpenoides, fenoles, alcaloides y glucosinolatos. Los compuestos activos se extrajeron en metanol 70%, etanol o agua. Los posteriores ensayos de cinética bacteriana se realizaron en medio acuoso aplicando concentraciones que oscilaron entre 15 y 0,03 mg de residuo post-extracción/mL durante 24 h. Las mayores inhibiciones de *R. radiobacter* se lograron con extractos acuosos de mandarina, limón y berza y con extractos etanólicos de los cinco residuos probados, siendo más efectivas las concentraciones de 15 y 7,5 mg/mL. El crecimiento de *P. carotovorum* se inhibió aplicando extractos etanólicos de los cinco residuos, siendo 15 mg/mL la concentración más eficaz en todos los casos. Estos resultados permiten concluir que los residuos testados podrían utilizarse para frenar el desarrollo de ambas bacterias, aunque su eficacia depende del producto utilizado para extraer los compuestos activos y de la concentración de residuo aplicada. La eficacia mostrada por los extractos acuosos de mandarina, limón y berza frente a *R. radiobacter* abre posibilidades para su aplicación en campo.

1. Kircher *et al.* (2023). *EFB Bioeconomy Journal* 3: 100051.

2. Aqilah *et al.* (2023). *Molecules* 28(6): 2631.

Análisis comparativo de la interacción de *Lotus corniculatus* con sus diferentes endosimbiontes en la provincia de Salamanca.

Jose David Flores Felix¹, José Mariano Igual², Paula García Fraile¹

¹Universidad de Salamanca.

²IRNASA-CSIC.

Contacto: jdflores@usal.es

Lotus corniculatus ha sido considerado una leguminosa estricta, cuyos endosimbiontes han sido tradicionalmente identificados dentro del género *Mesorhizobium*. Sin embargo, los estudios realizados durante la última década han mostrado que esta leguminosa puede interactuar con una amplia variedad de endosimbiontes pertenecientes a diferentes géneros. En nuestro estudio, hemos comparado endosimbiontes de *L. corniculatus* aislados de la provincia de Salamanca a partir de dos zonas de bosque, una dominada por encina (*Quercus rotundifolia*) y otra por roble melojo (*Q. pyrenaica*). Los resultados mostraron que en la primera localización, los endosimbiontes se identificaban filogenéticamente dentro del género *Mesorhizobium*, mientras que en la segunda lo hacían en el género *Bradyrhizobium* en base a la secuencia de los genes *16S* y *atpD*. La inoculación con estos endosimbiontes generó nódulos con morfologías histológicas diferentes manteniendo la estructura de nódulo determinado. En el caso de los aislados pertenecientes a *Mesorhizobium* presentaban una distribución histológica similar a los observados al inocular la cepa tipo de *M. loti*, con una ocupación elevada de las células por los simbiosomas. Por el contrario, la inoculación con diferentes cepas de *Bradyrhizobium* mostró nódulos con una menor ocupación celular por simbiosomas y células con mayor tamaño vacuolar. Los resultados en condiciones axénicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros vegetativos analizados como peso y longitud aérea. Sin embargo, su inoculación en condiciones de microcosmos mostró una mayor eficiencia del género *Mesorhizobium* así como cambios en las poblaciones microbianas rizosféricas, aunque una respuesta positiva aumentado el número de nódulos cuando se inocula *Bradyrhizobium*. Estos resultados muestran que *L. corniculatus* puede interactuar con endosimbiontes de baja eficiencia para adaptarse al fondo genético disponible en el suelo.

Funding: Esta investigación ha sido financiada en el marco de Horizonte 2020 de la Unión Europea (acuerdo de subvención Marie Skłodowska-Curie nº 101034371).

Developing bacterial AI-designed proteins to increase rhizobia-legume symbiotic compatibility

Raquel Thuss¹, Ana María Cutiño¹, Adam Bentham², Catherine Nancy Jacott¹, Pablo del Cerro¹

¹Universidad de Sevilla.

²Durham University.

Contacto: raqthu@alum.us.es

The production and use of nitrogen fertilizers in agriculture contribute to 5% of the global greenhouse gas emissions. Nitrogen-fixing rhizobia offer a sustainable solution by enabling plants to utilize atmospheric nitrogen. Rhizobia can colonize plant roots and fix nitrogen within the root-nodule organs. However, the application of rhizobia in agriculture is limited due to their symbiotic host specificity, a phenomenon whereby certain rhizobia can colonize only certain legume hosts. Rhizobia establish symbiotic compatibility through a molecular dialogue with the host. Rhizobia produce strain-specific molecules (Nod Factors, NFs) which are specifically recognized by the plant NF receptors. The formation of the NF receptor complex (bound to the NF) leads to root colonization by rhizobia and the formation of the nodules.

To increase rhizobia-legume compatibility, we have utilized state-of-the-art AI and Protein design methods. We have successfully designed *in silico* protein binders with affinity for both intracellular domains of the NF receptors, with potential for assembling the receptor complex and inducing nodule organogenesis in absence of NFs. Additionally, we have determined whether these binders can be translocated from rhizobia to the host, using known Type III Secretion System (T3SS) signal peptides from *Pseudomonas syringae* and *Sinorhizobium fredii*.

Our next goal is to confirm the potential of these binders to trigger nodule organogenesis *in planta*. We will use *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation to express our binders in the model legume *Lotus japonicus* and observe the formation of nodule-like structures. Additionally, we will study the ability of a set of rhizobial strains, that are not symbiotically compatible with *Lotus japonicus*, to induce nodule organogenesis. For that, we will introduce the T3SS signalpeptide-binder constructs into these rhizobial strains and assess the presence of nodules via their translocation through the T3SS. These results could enhance rhizobia-legume compatibility and support the development of improved agricultural bioinoculants.

The essential role of the type VI secretion system of *Sinorhizobium fredii* USDA257 in the nodulation of *Glycine max* cv Pekin

Pedro José Reyes-Pérez, Irene Jiménez Guerrero, Ana Sánchez-Reina, Cristina Civantos, Natalia Moreno-de Castro, Francisco Javier Ollero, Jacinto Gandullo, Patricia Bernal, Francisco Pérez-Montaño

Universidad de Sevilla.

Contacto: ijimgue@us.es

The symbiotic relationship between rhizobia and legumes is critical for sustainable agriculture and has important economic and environmental implications. In this intricate process, rhizobial bacteria colonize plant roots and induce the formation of specialized plant organs, the nodules. Within these structures, rhizobia fix environmental nitrogen into ammonia, significantly reducing the demand for synthetic fertilizers. Multiple bacterial secretion systems (TXSS, Type X Secretion System) are involved in establishing this symbiosis, with T3SS being the most studied. While the Type 6 Secretion System (T6SS) is known as a "nanoweapon" commonly used by gram-negative bacteria for inter-bacterial competition and potentially manipulating eukaryotic cells, its precise role in legume symbiosis remains unclear.

Sinorhizobium fredii USDA257, a fast-growing rhizobial strain capable of nodulating diverse legume plants, possesses a single T6SS cluster containing genes encoding structural components and potential effectors that could target plant cells and/or act as effector-immunity pairs. Our research reveals that this T6SS can be induced in nutrient-limited conditions and, more importantly, is essential for successful nodulation and competitive colonization of *Glycine max* cv Pekin. Although the system did not demonstrate effectiveness in eliminating competing bacteria in vitro, its active presence within root nodules suggests a sophisticated role in symbiotic interactions that extends beyond traditional interbacterial competition.

Funding

P.B. and I.J-G are supported by the MICIU/AEI/10.13039/501100011033 Spanish agency through a Ramon y Cajal RYC2019-026551-I and a Juan de la Cierva Incorporación IJC2020-045968-I, respectively. This work was funded by two research grants from the State Subprogram for Knowledge Generation from the Spanish Minister of Science, Innovation and Universities (MICIU), the Spanish State Research Agency (AEI) and the European Union (UE) with reference PID2020-118279RA-I00 awarded to F.P-M and PID2021-123000OB-I00 (MICIU/AEI/10.13039/501100011033) awarded to P.B.

Estudio de las bases moleculares de la colonización de la rizosfera del aguacate utilizando la cepa modelo de control biológico *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606

Blanca Ruiz-Muñoz^{1,2}, José A. Gutiérrez-Barranquero^{1,2}, Sandra Tienda^{1,2}, Antonio de Vicente¹, Fransico M. Cazorla^{1,2}

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

²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", IHSM-UMA-CSIC, Málaga, España.

Contacto: blancar Ruiz_@uma.es

La rizosfera de las plantas está directamente influenciada por la secreción de los exudados radiculares, que proporcionan un entorno rico en nutrientes y que atrae selectivamente a la microbiota del suelo circundante. Algunos de estos microorganismos ejercen efectos beneficiosos sobre las plantas, fomentando su crecimiento o brindándoles protección frente a patógenos. Por tanto, la colonización bacteriana de la rizosfera es considerada como uno de los mecanismos principales para el establecimiento de las interacciones beneficiosas planta-bacteria, jugando un papel clave en la salud y la productividad de las plantas. Sin embargo, todavía existen muchos interrogantes sobre las bases moleculares que regulan esta interacción compleja.

Pseudomonas chlororaphis PCL1606 (PcPCL1606) es una cepa modelo de control biológico aislada de las raíces de la planta de aguacate que destaca por su capacidad para colonizar de forma eficaz la rizosfera. Con el objetivo de descifrar los determinantes genéticos responsables de la interacción de PcPCL1606 con su huésped natural durante la colonización de las raíces, se llevó a cabo la construcción de una librería de 10.000 mutantes mini-Tn5 de la cepa silvestre. La capacidad de colonización de estos mutantes se evaluó utilizando diferentes modelos vegetales como semillas de tomate y raíces de aguacate, seleccionando aquellos afectados en este proceso. Los mutantes seleccionados fueron caracterizados mediante el análisis de fenotipos relevantes relacionados con la colonización, como adhesión, formación de biopelículas y movilidad, además de su competitividad in vivo frente a la cepa silvestre. El análisis genético reveló genes asociados con el metabolismo de aminoácidos y el mantenimiento de la asimetría de la membrana externa, identificados como elementos clave en la colonización eficiente de la rizosfera. Estos hallazgos proporcionan información esencial sobre los mecanismos genéticos y biológicos que sustentan la colonización bacteriana de la rizosfera.

Financiación: PID2021-123713OB-I00, Proyectos Generación del Conocimiento 2021, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Las estrigolactonas actúan como moléculas señal en la interacción raíz-PGPR

Ricardo Aroca, Maricarmen Perálvarez, Sonia Molina, Juan Manuel Ruiz-Lozano, Juan Antonio López-Ráez

Estación Experimental del Zaidín (EEZ), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Contacto: raroa@eez.csic.es

Las estrigolactonas (SL) son compuestos terpenoides que funcionan como moléculas señal en las plantas superiores, cumpliendo diferentes funciones. Entre dichas funciones se encuentra su función facilitadora en el establecimiento de la simbiosis micorrízica-arbuscular, al ser exudadas por las raíces de la planta hospedadora. En el presente trabajo nos preguntamos si las SL también podrían tener un papel destacado en la colonización de las raíces por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Primero, mediante experimentos de “swarming” observamos que dos cepas distintas de bacterias PGPR (*Azospirillum* spp. y *Enterobacter* spp.) se desplazaban hacia una fuente de SL. Observamos el mismo efecto cuando la misma cepa de *Azospirillum* desplazándose hacia exudados de raíces de plantas crecidas en deficiencia de fósforo. A su vez, dicha cepa disminuyó drásticamente su capacidad de colonizar raíces de tomate deficientes en SL. Por último, la adición exógena de SL al medio de cultivo promovió el crecimiento de dicha cepa, siendo además más eficientes a la hora de colonizar raíces de plantas de tomate. Por lo tanto, las SL son cruciales a la hora de la colonización de la raíz por dicha cepa de *Azospirillum*, y a su vez promueven su crecimiento actuando como “priming” a la hora de colonizar las raíces de las plantas. Esta es una nueva función de las SL hasta ahora no descrita.

Unraveling the role of antisense RNAs in the regulation of nitrogen fixation genes in *Sinorhizobium meliloti*

Guedes-García, S.K., García-Tomsig, N. I., Jiménez-Zurdo, J.I.

Estación Experimental del Zaidín (EEZ), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Contacto: sabina.guedes@eez.csic.es

Massive sequencing of strand-specific cDNA libraries (RNAseq) has revealed the great complexity of prokaryotic transcriptomes, unveiling a huge number of small-sized non-protein-coding transcripts (sRNAs) [1]. Most sRNAs regulate extensive post-transcriptional networks that support almost every adaptive response of bacteria to environmental changes. Therefore, it is increasingly evident that no microbial process can be fully understood without considering the regulation of gene expression by sRNAs [2].

In this work, unconventional RNAseq protocols such as differential RNAseq (dRNAseq) or Term seq were used to determine transcripts boundaries genome-wide in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Simultaneously, new conventional RNAseq experiments carried out with RNA derived from nitrogen-fixing bacteroids allowed us to evaluate changes in the coding and non-coding transcriptome of *S. meliloti*, thereby identifying sRNAs with possible symbiotic function. Here, I present a primary characterization of the transcriptional regulation and regulatory activity of several antisense RNAs potentially involved in the post-transcriptional fine-tuning of nitrogen fixation during symbiosis between *S. meliloti* and *M. sativa*.

References

- [1] Hör, J *et al. Mol Cell*, (2018). 70, 785–799.
- [2] García-Tomsig, N.I. *et al. mBio*, (2021). 13(1), 1-22.

Funding: This work is part of project PID2020-114782GB-I00, funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Interacción *Trichoderma*-garbanzo: inducción de respuestas hormonales y metabólicas sistémicas para el control eficaz de la rabia (*Ascochyta rabiei*)

Jorge Poveda¹, Javier Morcuende¹, Irene Zunzunegui¹, Enrique Carrión-Molpeceres¹, Pablo Velasco², Tamara Sánchez-Gómez¹, Óscar Santamaría¹, Víctor M. Rodríguez², Jorge Martín-García¹

¹Universidad de Valladolid.

²CSIC.

Contacto: jorge.poveda@uva.es

El garbanzo (*Cicer arietinum*) es una leguminosa de gran importancia económica y agrícola en todo el mundo, cuyo cultivo se ve gravemente afectado por la rabia, causada por el hongo *Ascochyta rabiei*. Por otro lado, el género fúngico *Trichoderma* incluye varias especies ampliamente caracterizadas como eficaces agentes de control biológico contra patógenos de los cultivos. En primer lugar, se caracterizaron varias especies del género *Trichoderma* como potenciales agentes de control biológico de *A. rabiei* de forma directa (enfrentamiento *in vitro*) o indirecta en plantas de garbanzo (activación de la resistencia sistémica), seleccionando *T. harzianum* EN1 como la cepa más eficaz. Posteriormente, se probaron diferentes materiales como recubrimientos para aplicar los conidios de *T. harzianum* sobre semillas de garbanzo, determinando que la goma arábica al 1% de concentración era la que más promovía la germinación de conidios y semillas. La tercera fase del estudio se basó en la aplicación del recubrimiento y los conidios de *T. harzianum* sobre semillas de garbanzo y estudiar la supervivencia de la planta tras la infección con el patógeno *A. rabiei*, caracterizando la colonización de las raíces por *Trichoderma* y los cambios hormonales y metabólicos sistémicos relacionados con la inducción de defensas sistémicas. Se observó que el tratamiento de las semillas de garbanzo con goma arábica y conidios de *T. harzianum* aumentaba la colonización de las raíces por *Trichoderma* y mejoraba la supervivencia de las plantas. Se determinó que la causa de dicha protección era la inducción de una resistencia sistémica mediada por etileno y melatonina, que conducía a la acumulación de ácido nicotínico en los tejidos vegetales. Por lo tanto, *T. harzianum* aplicado como recubrimiento de semillas con goma arábica podría ser una buena estrategia de control biológico contra *A. rabiei* en garbanzo, debido a la inducción de resistencia sistémica.

Key role of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* ClpAP1S1 chaperone-protease system in the abiotic stress response and in symbiosis

Sofía Guzmán¹, Noemí Fernández¹, Belén Fernández¹, Germán Tortosa¹, M. Mercedes Lucas², Juan J. Cabrera¹, Socorro Mesa¹

¹Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC.

²Instituto Ciencias Agrarias, CSIC.

Contacto: socorro.mesa@eez.csic.es

Rhizobia-legume symbiosis establishment implies major physiological and metabolic changes of the bacteria from the free-living state in the soil to the symbiotic form in the oxygen-limiting environment of plant root nodules. Moreover, environmental stresses are limiting factors for an effective nitrogen-fixing symbiosis. Clp-type chaperone-proteases are conserved energy-dependent proteolytic systems that degrade unfolded or misfolded proteins, as well as specific substrates (1). They consist of an AAA+ ATPase-type chaperone, that recognizes and denatures the substrate, and a protease cylinder. Specific adapters also modulate their proteolytic activity. Clp-type proteins are involved in the bacterial response to several abiotic stresses, though a limited knowledge is available in the context of rhizobia in both free-living and symbiotic states (2).

Here, we investigated the role of the ClpAP1S1 chaperone-protease system of the soybean endosymbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens*. For this purpose, strains deficient in the chaperone ClpA and its adaptor ClpS1 were characterized, as well as a ClpP1 protease overexpressing strain. Our results indicated that while ClpA is required for tolerance to heat shock and acid pH, *clpS1* mutation enhances salt stress resistance, and the entire ClpAP1S1 system is involved in the tolerance to alkaline pH. Soybean plant infection assays showed that individual mutations in either *clpA* or *clpS1* impaired nitrogen fixation efficiency as well as the infection and nodulation processes. Taken together, these data unveil that the *Bradyrhizobium diazoefficiens* ClpAP1S1 system is involved in free-living stress adaptation, and in some stages of the symbiotic interaction with soybean.

1. Bittner *et al.*, 2016. *Biopolymers* 105:505-517.

2. Ogden *et al.*, 2019. *Journal of Bacteriology* 201:e00498-18.

This work was supported by grants PID2020-114330GB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and P18-RT-1401 (Junta de Andalucía, Spain). S.G. thanks the support from “Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil” (Junta de Andalucía and European Social Fund).

Identificación de una familia de quimiorreceptores para formato en bacterias de suelo y asociadas a plantas

Elizabet Monteagudo-Cascales¹ José A. Gavira² - Jiawei Xing³, Félix Velando¹, Miguel A. Matilla¹, Igor B. Zhulin⁴, Tino Krell¹

¹Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

²Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada.

³Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (EEUU).

⁴The Ohio State University (EEUU).

Contacto: elizabet.monteagudo@eez.csic.es

Las bacterias poseen múltiples familias de receptores que les permiten percibir señales ambientales con el fin de captar información del entorno y adaptarse eficientemente al mismo. En general, la unión de las señales ocurre a través de dominios sensores. Este reconocimiento resulta en la regulación de procesos como la quimiotaxis, la expresión génica o los niveles de segundos mensajeros. La bacteria fitopatógena *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 contiene 36 quimiorreceptores, de los cuales se desconoce la señal reconocida por la mayoría. En este trabajo, hemos identificado el quimiorreceptor PacF de SCRI1043 que reconoce y promueve la respuesta quimioatractiva específica hacia formato. La respuesta quimiotáctica se observó únicamente en condiciones de anaerobiosis, sugiriendo una regulación precisa de la expresión del quimiorreceptor. PacF presenta un dominio sensor bimodular de tipo dCache, cuyo módulo distal presenta homología con el dominio monomodular de tipo sCache de un quimiorreceptor de formato descrito recientemente en el fitopatógeno *Agrobacterium fabrum*. Estudios de mutagénesis puntual mostraron que PacF une formato a través de su módulo distal. Análisis *in silico* e *in vitro* permitieron identificar dos grandes familias de dominios sensores de tipo sCache y dCache que reconocen formato, las cuales están ampliamente distribuidas en bacterias. Análisis filogenéticos posteriores revelaron que los dominios sCache que reconocen formato podrían haber evolucionado a partir de la pérdida del módulo proximal de membrana de los dominios dCache. El análisis de las fuentes de aislamiento de las bacterias que contienen dominios sCache y dCache que unen formato reveló su predominio en ambientes edáficos y en bacterias asociadas a plantas, en los cuales el formato es empleado frecuentemente como aceptor de electrones.

Financiación: Este estudio se ha financiado a través de los proyectos 2024AEP062, P18-FR-1621, PID2020-112612GB-I00 y PID2023-146216NB-I00 a T.K., PID2019-103972GA-I00 y PID2023-146281NB-I00 a M.A.M., PID2020-116261GB-I00 a J.A.G. y R35GM131760 a I.B.Z.

Iron modulates the development and function of arbuscular mycorrhiza

Javier Lidoy, Víctor López-Lorca, Olga López-Castillo, M^a José Pozo, Concepción Azcón-Aguilar,
Nuria Ferrol

Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Contacto: nuria.ferrol@eez.csic.es

Iron (Fe) is an essential micronutrient for the correct development and survival of all organisms and influences the outcome of many cross-kingdom interactions. Despite being abundant in most soils, it is poorly available to plants. To cope with Fe deficiency, plants have evolved a suite of adaptive strategies aimed at increasing its acquisition. A widespread strategy engaged by plants to overcome nutrient deficiencies is the formation of a mutualistic symbiotic interaction, referred to as arbuscular mycorrhiza (AM), with certain soil-borne fungi belonging to the subphylum *Glomeromycotina* within the phylum *Mucoromycota*. Arbuscular mycorrhizal fungi are obligate biotrophs that colonize the root cortex and develop an external mycelium that overgrows the rhizosphere. This hyphal network represents, therefore, an adaptation strategy to increase the supply of mineral nutrients to the plant. Additionally, AM symbiosis enhances tolerance to pathogens by priming the plant's immune system, a phenomenon known as mycorrhiza-induced resistance (MIR). The aim of this work was to analyse the effect of AM on Fe homeostasis and the impact of Fe deficiency on AM establishment and function. Using the *Solanum lycopersicum-Rhizophagus irregularis* mycorrhizal system, we observed a decrease in the translocation of Fe from roots to shoots in mycorrhizal plants. This suggests that the AM fungus *R. irregularis* acts as an iron sink. Iron deficiency resulted in a reduction in AM colonization and symbiotic phosphate transport. Furthermore, Fe deficiency increased plant tolerance to *Botrytis cinerea* infection in non-mycorrhizal plants. We are currently analysing the impact of Fe nutrition on MIR to *B. cinerea*. The significance of Fe homeostasis in AM is being confirmed by using the Fe-inefficient mutants *fer* and *chloronerva* of tomato.

Acknowledgements: This work was supported by grant PID2021-1255210B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by "ERDF A way of making Europe", by the "European Union".

***Ralstonia solanacearum* genes expressed outside and inside of its plant hosts**

Qingshan Zhang¹, Mercedes Rocafort¹, **Marc Valls**^{1,2}

¹CRAG.

²Universitat de Barcelona.

Contacto: marcvals@ub.edu

Like most bacterial pathogens, *Ralstonia solanacearum*, the causing agent of the bacterial wilt disease, can persist and thrive in diverse ecological niches. We have investigated *R. solanacearum* gene expression in all environments it occupies throughout its life cycle and found that it deploys distinct transcriptional programmes.

Our results show dynamic expression of metabolism-controlling genes and virulence factors during parasitic growth inside the plant.

Gene expression in environmental water resembled that observed during late xylem colonization, with metabolism shutdown and an intriguing induction of the T3SS. Alkaline pH and nutrient scarcity-conditions also encountered during late infection stages-were identified as the triggers for this -likely fortuitous- T3SS induction.

On the contrary, when *R. solanacearum* lives in the soil, stress responses and genes for the use of alternate carbon sources are specifically upregulated. We proved through gain- and loss-of-function experiments that genes associated with the oxidative stress response are key for bacterial survival in soil, as their deletion cause a decrease in culturability associated with a premature induction of the viable but non culturable state (VBNC).

Our findings represent valuable insights into the biology of *R. solanacearum* and its adaptation to unexplored environmental niches. Understanding the mechanisms controlling transition between different habitats may help control pathogen dissemination and future disease outbreaks.

Agua electrolizada en el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y su efecto en parámetros de calidad del fruto

Lilia Mexicano Santoyo¹, Tarsicio Medina Saveedra¹, Emmeli Jacqueline Medrano Espino¹, Adiana Mexicano Santoyo², Melina Yuliana Ornela Flores¹

¹Universidad de Guanajuato

²Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria

Contacto: ej.medranoespino@ugto.mx

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es considerado un cultivo de gran importancia económica a nivel nacional e internacional. México es la principal exportadora nivel mundial de esta hortaliza con una participación del 24.7%. Este cultivo puede ser afectado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) que causa el cáncer bacteriano y puede ocasionar pérdidas del 50 al 100%. Por lo tanto, el manejo de enfermedades causada por microorganismos sigue siendo un desafío importante. En este sentido, el agua electrolizada es una tecnología que ha demostrado tener actividad antimicrobiana. Es producida mediante una celda de electrólisis y final del proceso de electrólisis se pueden obtener diferentes tipos de agua como el electrolizada alcalina, agua electrolizada ácida o agua electrolizada neutra. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso del agua electrolizada en el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y su efecto en parámetros de calidad del fruto de jitomate. Se aplicaron tratamientos de AER: Agua electrolizada reductora, AEO: Agua electrolizada oxidante y kasumin (bactericida comercial). Se cosecharon frutos al azar en estado de madurez rojo claro y se midieron las variables diámetro polar, diámetro ecuatorial, peso y pérdida de peso durante 7 días. Los resultados muestran que al aplicar agua oxidante o kasumin se obtienen frutos con mayor peso y que el agua oxidante reduce la pérdida de peso durante el almacenamiento. Por lo tanto, se concluye que el agua electrolizada es una alternativa que puede ser usada en el campo para el control de enfermedades en el cultivo y que contribuye a obtener frutos de calidad.