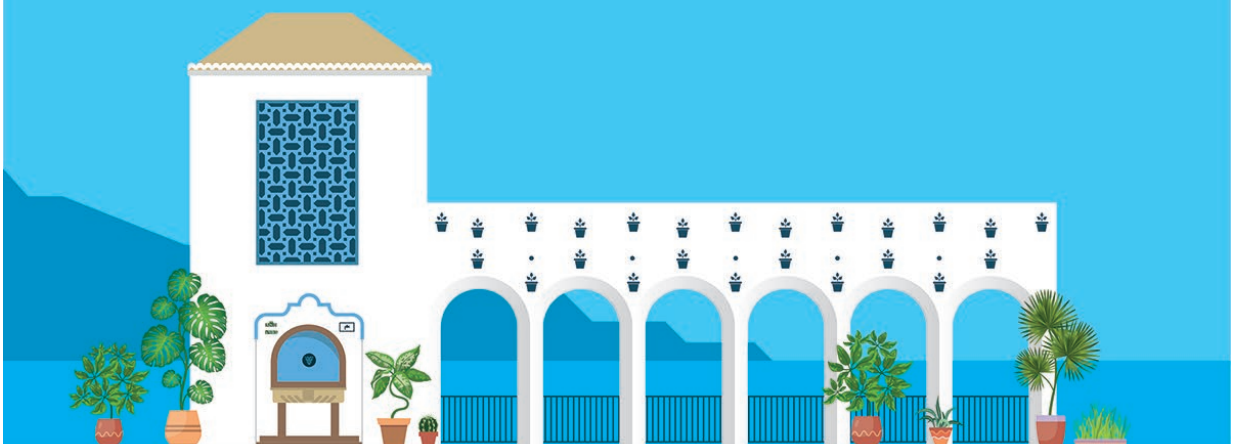


X Reunión del Grupo Especializado  
Microbiología de plantas  
**MiP'23**

Nerja (Málaga) / 25-27 ENERO 2023



## ORGANIZADORES Y PATROCINADORES

Organizan



Patrocinan



### **Comité Organizador MIP23:**

- *Dolores Fernández Ortuño* (Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, IHSM-UMA-CSIC)
- *Luís Rodríguez Moreno* (Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, IHSM-UMA-CSIC)
- *Eva Arrebola Díez* (Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, IHSM-UMA-CSIC)
- *Víctor J. Carrión Bravo* (Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, IHSM-UMA-CSIC)
- Secretaría Técnica: Revolution Events, Málaga

### **Junta Directiva MIP:**

- **Presidenta:** *Emilia López* (Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, CBGP, UPM-INIA)
- **Vicepresidente:** *José Manuel Palacios* (CBGP, UPM-INIA)
- **Secretario:** *Diego F. Romero* (Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, IHSM-UMA-CSIC)
- **Tesorera:** *Trinidad Gallego* (Departamento de Microbiología del suelo y sistemas simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC)
- **Vocales:** *Marta Martín* (Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid)  
*Francisco J. López* (Departamento de Microbiología Facultad de Biología, Universidad de Sevilla)

## PROGRAMA ABREVIADO

	<b>Horario</b>	<b>Actividades</b>
<b>Día 1</b>	12.00	Acreditación
	15.45	Inauguración de la reunión
	16.00	1º Sesiones científicas
	17.45	Pausa café
	18.15	2º Sesiones científicas
	20.00	Cocktail Sala Mercado
<b>Día 2</b>	8.30	3º Sesiones científicas
	10.00	Pausa café
	10.30	4º Sesiones científicas
	12.30	Visita Cuevas de Nerja
	14.00	Almuerzo
	16.00	5º Sesiones científicas
	18.00	Pausa
	18.30	6º Sesiones científicas
	20.00	Reunión Asamblea
	21.00	Cena Toboso Chaparal
<b>Día 3</b>	8.45	7º Sesiones científicas
	10.00	Pausa café
	10.30	8º Sesiones científicas
	12.30	Descanso
	12.45	9º Sesiones científicas
	13.45	Clausura
	14.00	Almuerzo Parador de Nerja

## **PROGRAMA MiP23**

### **Miércoles 25 ENERO**

**12:00-15:30** Acreditación

**15:45-16:00** Inauguración

**16:00-17:45 SESIÓN 1: Genómica Comparativa y Microbioma**

**Moderador: José Antonio Gutiérrez Barranquero (Universidad de Málaga)**

<b>16:00 - 16:15</b>	Captura y enriquecimiento de genes quimiorreceptores en muestras ambientales.
	<i>Claudia Sanchis-López</i>
<b>16:15 - 16:30</b>	Bacterial synthetic communities (SynComs) as inoculants for agriculture
	<i>Mónica Montoya</i>
<b>16:30 - 16:45</b>	MicroLife: a novel bioinformatics tool for bacterial lifestyle prediction and identification of genes involved in lifestyle
	<i>Adrian Pintado</i>
<b>16:45 - 17:00</b>	Exploring microbial legacy effects on aboveground-belowground interactions
	<i>Pablo M Rodríguez Blanco</i>
<b>17:00 - 17:15</b>	Identificación y estudio comparativo de genes implicados en la producción de etileno en <i>Trichoderma</i> spp.
	<i>Maria Illescas</i>
<b>17:15 - 17:30</b>	Effect of bacterial inoculation on the physiological response of strawberry under phosphorus deficit conditions
	<i>Pedro Valle-Romero</i>
<b>17:30 - 17:45</b>	Rescatando <i>Streptomyces</i> spp. del microbioma rizosférico de cítricos
	<i>Rosa M<sup>a</sup> Vázquez García</i>

**17:45-18:15** Pausa café

**18:15-19:45 SESIÓN 2: Biocontrol 1**

**Moderador: Miguel Redondo (Universidad Autónoma de Madrid)**

<b>18:15 - 18:30</b>	Genetic determinants of biofilm formation by the plant-beneficial bacterium <i>Stutzerimonas stutzeri</i> MJL19
	<i>Verónica Pérez Padilla</i>
<b>18:30 - 18:45</b>	Type VI secretion systems from <i>Pseudomonas ogarae</i> F113 mediate bacterial killing and adaption to the rhizosphere
	<i>David Vázquez-Arias</i>

<b>18:45 - 19:00</b>	Mejora de <i>Bacillus velezensis</i> UMAF6639 como agente de biocontrol
	<i>Montserrat Grifé</i>
<b>19:00 - 19:15</b>	Estudio de las bases moleculares de la colonización de la raíz de aguacate por <i>Pseudomonas chlororaphis</i> utilizando la cepa modelo de biocontrol PCL1606
	<i>Blanca Ruiz-Muñoz</i>
<b>19:15 - 19:30</b>	Construcción y caracterización de una comunidad sintética de tres <i>Pseudomonas chlororaphis</i> para el estudio de interacciones bacteriaplanta-patógeno
	<i>Rafael Villar-Moreno</i>
<b>19:30 - 19:45</b>	Contribución de la región N-terminal de la proteína amiloide TasA en su función estructural y en la formación del biofilm de <i>B. subtilis</i>
	<i>Laura Domínguez García</i>

**20:00-22:00** Cocktail de bienvenida Sala Mercado

## Jueves 26 ENERO

**8:30 – 10:00**

### SESIÓN 3: Tolerancia a estrés abiótico

**Moderador: José Juan Rodríguez Hervás (Universidad Politécnica de Madrid)**

<b>8:30 - 8:45</b>	El Saladar de El Margen, ambiente hipersalino fuente de bacterias halotolerantes de interés agrícola en condiciones de estrés salino
	<i>Patricia Sánchez Aranda</i>
<b>8:45 - 9:00</b>	Exploring Atacama Desert soil microbiomes for novel strains and traits involved in plant drought stress alleviation
	<i>Pascal Nuijten</i>
<b>9:00 - 9:15</b>	Marine environments as a source of microorganisms for salinity resilience in crops.
	<i>Miguel Rodríguez González</i>
<b>9:15 - 9:30</b>	Efecto de <i>Trichoderma simmonsii</i> y sus modos de aplicación en las respuestas de plantas de trigo al estrés hídrico
	<i>Alberto Pedrero-Méndez</i>
<b>9:30 - 9:45</b>	Nodulación de leguminosas en situaciones de estrés abiótico: inoculantes con endófitos resistentes a sequía y altas temperaturas como alternativa sostenible.
	<i>Noris J. Flores-Duarte</i>
<b>9:45 - 10:00</b>	Bioherramientas para la mejora de la eficiencia del uso de fertilización química y recursos hídricos en explotaciones freseras
	<i>Elena Romano-Rodríguez</i>

**10:00-10:30** Pausa café

**10:30-12:15**

**SESIÓN 4: Endófitos 1**

**Moderador: Patricia Bernal (Universidad de Sevilla)**

<b>10:30 - 10:45</b>	Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> a diferentes hospedadores
	<i>Marta Ballesteros Gutiérrez</i>
<b>10:45 - 11:00</b>	Estudio del papel de la proteína de respuesta a estrés sHSP_252 en la simbiosis <i>Rhizobium-leguminosa</i>
	<i>Lucía Domingo Serrano</i>
<b>11:00 - 11:15</b>	Functional analysis of a host-dependent metal transporter system in the <i>Rhizobium-legume</i> symbiosis
	<i>Joanna Soldek</i>
<b>11:15 - 11:30</b>	Importancia del Sistema de Secreción de Tipo VI de <i>Rhizobium</i> spp. en simbiosis con leguminosas
	<i>Bruna Fernanda Silva de Sousa</i>
<b>11:30 - 11:45</b>	Endófitos asociados al efecto beneficioso de <i>Bacillus subtilis</i> como potenciales promotores del crecimiento vegetal
	<i>María Victoria Berlanga-Clavero</i>
<b>11:45 - 12:00</b>	Unlocking inner power: endophytic bacterial functions activated by pathogen infection
	<i>Xinya Pan</i>
<b>12:00 - 12:15</b>	Aislamiento y cuantificación de vesículas extracelulares de membrana de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 en presencia del flavonoide apigenina
	<i>Paula Ayala-García</i>

**12:30 -14:00** Salida y visita a las Cuevas de Nerja

**14:00 -16:00** Almuerzo

**16:00-18:00**

**SESIÓN 5: Endófitos 2**

**Moderador: Diego Romero (Universidad de Málaga)**

<b>16:00 - 16:15</b>	Caracterización de un nuevo efector de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103
	<i>Diego García-Rodríguez</i>
<b>16:15 - 16:30</b>	Identificando nuevos actores moleculares del proceso simbiótico a través del estudio de las vesículas extracelulares de membrana de bacteroides
	<i>Natalia Moreno de Castro</i>
<b>16:30 - 16:45</b>	Caracterización del Sistema de Secreción Tipo VI de <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257
	<i>Pedro Reyes Pérez</i>
<b>16:45 - 17:00</b>	El sistema de secreción de tipo 3 simbiótico como determinante en la especificidad para nodular variedades de soja salvaje
	<i>Lucía Gutiérrez-Sáez</i>

<b>17:00 - 17:15</b>	Transcriptoma no codificante de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103: una nueva visión de la regulación simbiótica
	<i>Francisco Fuentes-Romero</i>
<b>17:15 - 17:30</b>	Endófitos halotolerantes como inoculantes para el crecimiento de las vides en condiciones salinas
	<i>Salvadora Navarro-Torre</i>
<b>17:30 - 17:45</b>	Nuclear calcium oscillation regulates legume root endosymbioses
	<i>Pablo del Cerro</i>
<b>17:45-18:00</b>	Uso de leguminosas y rizobios eficaces en la restauración de suelos áridos degradados de Canarias
	<i>Sara Pérez-González</i>
<b>18:00-18:30</b>	<b>Pausa Café</b>

**18:30 -20:00**

**SESIÓN 6: Factores de Virulencia 1**

**Moderador: Inmaculada Sampedro Quesada (Universidad de Granada)**

<b>18:30 - 18:45</b>	Caracterización de las rutas de quimiopercepción en <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000
	<i>Martí Munar-Palmer</i>
<b>18:45 - 19:00</b>	WhpR, un regulador transcriptional de la virulencia en el patógeno de huéspedes leñosos <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. savastanoi
	<i>Antonio Arroyo-Mateo</i>
<b>19:00 - 19:15</b>	El secretoma de <i>Pseudomonas savastanoi</i> : identificación de nuevas proteínas extracelulares y su papel en la virulencia durante su interacción con el olivo
	<i>Hilario Domínguez-Cerván</i>
<b>19:15 - 19:30</b>	Uso de oligonucleótidos para el control de <i>Botrytis cinerea</i> en cultivos hortícolas
	<i>Alba López-Laguna</i>
<b>19:30 - 19:45</b>	Identificación y control del patógeno causante de "la muerte regresiva" en árboles de aguacate en el sur de España
	<i>Lucía Guirado-Manzano</i>
<b>19:45 - 20:00</b>	Papel del clúster de quimiotaxis tipo II en cepas del complejo <i>Pseudomonas syringae</i> de huéspedes leñosos y herbáceos.
	<i>Carla Lavado-Benito</i>

**20:00 -20:30**

**Asamblea General MIP**

**21:00**

**Cena en Toboso Chaparil.**



## Viernes 27 ENERO

**8:45-10:00**

### SESIÓN 7: Biocontrol 2

**Moderador: Irene Jiménez Guerrero (Universidad de Sevilla)**

<b>8:45 - 9:00</b>	Componentes estructurales de la matriz extracelular de <i>Bacillus</i> que median la comunicación con hongos
	<i>Alicia Isabel Pérez Lorente</i>
<b>9:00 - 9:15</b>	BacLive: un método no invasivo para el estudio de interacciones bacterianas y la dinámica de formación de biopelículas
	<i>Carlos Molina-Santiago</i>
<b>9:15 - 9:30</b>	BC_1280: Una proteína específica de células de biofilm en <i>B. cereus</i>
	<i>Ana Álvarez-Mena</i>
<b>9:30 - 9:45</b>	Ingeniería de vesículas de membrana para modular las interacciones planta-microorganismo para aumentar la nodulación y el crecimiento vegetal.
	<i>Carlos Azogue Palma</i>
<b>9:45 - 10:00</b>	Una nueva "comunicación por cable" vegetal: <i>Trichoderma hamatum</i> como comunicador entre plantas cercanas tras la infección por patógenos foliares
	<i>Jorge Poveda Arias</i>

**10:00-10:30 Pausa Café**

**10:30 -12:30**

### SESIÓN 8: Factores de Virulencia 2

**Moderador: Gema López Torrejón (Universidad Politécnica de Madrid)**

<b>10:30 - 10:45</b>	Sistemas de secreción relacionados con la patogenicidad y competición de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. pruni, juglandis y corylina
	<i>Sara Cuesta-Morondo</i>
<b>10:45 - 11:00</b>	Papel coordinado de los mecanismos de supresión de la inmunidad disparada por quitina de <i>Podosphaera xanthii</i>
	<i>Nisrine Bakhat</i>
<b>11:00 - 11:15</b>	La biosíntesis de aminoácidos azufrados en los oídios requiere la función de dos genes de la planta implicados en la asimilación del sulfato
	<i>Laura Ruiz-Jiménez</i>
<b>11:15 - 11:30</b>	Análisis de las metilasas y metilación del DNA en patovares modelo de <i>Pseudomonas syringae</i> .

	<i>Laura Mancera-Miranda</i>
<b>11:30 - 11:45</b>	La adquisición de plásmidos de resistencia a cobre en bacterias fitopatógenas ¿disminuye la eficacia biológica?
	<i>Idoia Artoleta Arrizabalaga</i>

<b>11:45 - 12:00</b>	Coste de fitness asociado a plásmidos de virulencia de <i>Pseudomonas syringae</i>
	<i>Miriam Urriza Leoz</i>
<b>12:00 - 12:15</b>	Assembly and disassembly of a bacterial killing machine and biocontrol weapon. The importance of recycling the sheath of the Type VI secretion system
	<i>Patricia Bernal</i>
<b>12:15 - 12:30</b>	El gen de una proteína de anclaje a GPI como nueva diana para el control de <i>Podosphaera xanthii</i>
	<i>Isabel P. Roji</i>

**12:30-12:45 Descanso**

**12:45-13:45 SESIÓN 9: SCIENCE FLASHES (presentaciones de 5 minutos)**  
**Moderador: Carlos Medina Morilla (Universidad de Sevilla)**

Mechanisms involved in plant microbiome assembly: from seeds to roots

*Hugo A. Pantigoso*

The suppressive soil microbiome: toward a global meta-analysis to identify keystone taxa & functions for plant protection

*Kevin M. Bretscher*

Efecto de prácticas de manejo ecológicas en la biodiversidad microbiana del suelo en ecosistemas agrícolas.

*Sandra Tienda Serrano*

Soil microbiome management by Plant-Soil Feedback for suppressing insect pests in tomato

*Guadalupe Zitlalpopoca Hernández*

Cooperación al Desarrollo para instaurar estudios de Microbiología de planta y suelo en áreas contaminadas de Argentina y Ecuador

*Jennifer Mesa-Marín*

What makes an endophyte an endophyte?

*María Negre Rodríguez*

Diaporthe species associated with the maritime grass *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* and their interaction with agricultural crops  
*Rufin Marie Kouipou Toghueo*

Identificación y caracterización de un dipéptido cíclico con actividad nematocida y fungicida producido por el agente de biocontrol *Bacillus velezensis* UMAF6639  
*David Vela-Corcía*

Biosíntesis y regulación de los antifúngicos solanamicina y herbicolina A en fitobacterias

*Miguel A. Matilla*

Caracterización de quimiorreceptores de *Dickeya dadantii* 3937 implicados en la percepción de compuestos derivados de glicanos

*Nicolás Raho*

Expresión génica de *Xanthomonas arboricola* en diferentes condiciones de nutrientes

*Pilar Sabuquillo Castrillo*

Identification of broad-spectrum quantitative disease resistance loci in oilseed rape (*Brassica napus*) using association transcriptomics

*Catherine N. Jacott*

**13:45 – 14:00 Cierre**

**14:00 Comida en el Parador de Nerja**

## **SESIÓN 1**

# **Genómica Comparativa y Microbioma**

### **S1.1 Captura y enriquecimiento de genes quimiorreceptores en muestras ambientales.**

Claudia Sanchis-López<sup>1</sup>, Saray Santamaría-Hernando<sup>1</sup>, Carlos P Cantalapiedra<sup>1</sup>, Lisa Pokorny<sup>1</sup>, Jaime Huerta-Cepas<sup>1</sup> y Emilia López-Solanilla<sup>1,2</sup>.

(1) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Parque Científico y Tecnológico de la UPM, 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid., España.

(2) Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Avda. Complutense s/n, 28040 Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, España

Las bacterias son capaces de adaptarse a diferentes entornos gracias a la capacidad de detectar señales presentes en su hábitat. Por esa razón, existe una gran variedad de proteínas quimiorreceptoras en los genomas bacterianos. El estudio de los quimiorreceptores en organismos modelo ha puesto de manifiesto su importancia en las interacciones microbianas, uno de los ejemplos mejor caracterizados es la colonización y capacidad de infección de las plantas.

En este trabajo se han diseñado unos paneles de captura genómica con el fin de caracterizar los quimiorreceptores presentes en diferentes muestras ambientales (suelo, rizosfera, lago, rumen, etc.). Esta nueva tecnología es innovadora tanto en la aplicación de estos paneles en muestras metagenómicas, como en el estudio de las proteínas quimiorreceptoras a gran escala. El diseño de las sondas ha sido determinado por la estructura de estas proteínas, las cuales presentan un dominio señalizador intracelular conservado, y un dominio generalmente extracelular encargado de la detección de señales muy diversas. La hibridación de las sondas va dirigida a la zona conservada (dominio señalizador), pero gracias al diseño de esta metodología se puede alcanzar la zona divergente permitiendo detectar quimiorreceptores previamente desconocidos.

Los resultados preliminares muestran la capacidad de enriquecer las muestras ambientales en proteínas quimiorreceptoras hasta casi 200 veces más que en los métodos usuales de secuenciación. Además, se ha comprobado que es posible alcanzar la parte divergente de los quimiorreceptores. Esta tecnología abre las puertas a la caracterización de los perfiles de quimiorreceptores asociados a diferentes ecologías, incluyendo los previamente desconocidos.

## **S1.2 Bacterial synthetic communities (SynComs) as inoculants for agriculture**

Mónica Montoya, Laura Carrera, Daniel Garrido-Sanz, Miguel Redondo-Nieto, David Durán, Marta Martín, Rafael Rivilla.

Grupo Rizosfera, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid.

Enrichment cultures are useful for the construction of bacterial consortia to be used as inoculants for plant growth promotion (PGP). However, these consortia frequently contain bacteria that are undesirable, including bacteria that do not participate in the biotechnological process or even bacteria that might be harmful or pathogenic for humans, animals and/or plants. Deconstruction of consortia allows the design of SynComs that contain the bacterial taxa necessary for the inoculant function and are free from undesirable populations. SynComs are therefore rationally designed, considering the principles of functional redundancy and phylogenetic diversity to optimize their performance. In the design and construction of SynComs, culturomics are used to isolate strains from the consortium, using different selective growth media by dilution. Isolated strains are tentatively identified by 16S DNA sequencing and the metagenome of the designed SynCom is then determined, to establish its biotechnology potential. Here we are presenting the design and construction of a SynCom, designed for PGP of tomato plants. The consortium was isolated from tomato plants rhizosphere, growing in a commercial plot. Microbiome analysis showed that the consortium contained 75 ASVs, including some of them potentially harmful. A SynCom harbouring multiple PGP traits was designed and constructed. This SynCom has been tested on tomato plants and has shown to significantly improve the yield under greenhouse experiments. However, the complexity of that SynCom limits the study of its traceability and for this reason our current research is focused on building SynComs based on the use of the minimum number of bacteria that maintain all the PGP of the original consortium.

### REFERENCES

Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff JP, Göker M, Martín, M, Rivilla R, et al. (2016) Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens*. PLOS ONE 11(4): e0153733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153733>

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been financed by PID2021-125070OB-I00 (MINECO/FEDER EU). M. Montoya is recipient of the Margarita Salas grant of the Ministerio de Universidades and Universidad Politécnica de Madrid (RD 289/2021) supported by European Union-NextGenerationEU.

### **S1.3 MicroLife: a novel bioinformatics tool for bacterial lifestyle prediction and identification of genes involved in lifestyle.**

Adrian Pintado<sup>1,3#</sup>, Guillermo Guerrero-Egido<sup>1,2#</sup>, Kevin M. Bretscher<sup>1</sup>, Luisa-Maria Arias-Giraldo<sup>2</sup>, Joseph Paulson<sup>4</sup>, Herman Spaink<sup>1</sup>, Dennis Claessen<sup>1</sup>, Francisco M. Cazorla<sup>3</sup>, Marnix Medema<sup>1,5</sup>, Jos M. Raaijmakers<sup>1,2</sup>, Victor J. Carrión<sup>1,2,3\*</sup>

1. Institute of Biology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333 BE Leiden, Netherlands
2. Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Droevendaalsesteeg 10 6708 PB Wageningen, Netherlands
3. Departamento de Microbiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Málaga, Spain.
4. Department of Biostatistics, Product Development, Genentech Inc., South San Francisco, CA 94080, USA
5. Wageningen University, 6708 PB Wageningen, Netherlands

MicroLife is a fast and accurate framework to annotate genomes, perform comparative genomics, predict bacterial lifestyles and identify genes and Biosynthetic Gene Clusters (BGCs) that are associated with those lifestyles. Here, we used MicroLife with *Burkholderia/Paraburkholderia* and *Pseudomonas* genera, one of the most ubiquitous bacterial genera whose species have been isolated worldwide in all kinds of environments and with well-defined bacterial lifestyles. Using Machine Learning (ML) we were able to evaluate the predictability of the lifestyles chosen and accurately predict the lifestyle of several unknown lifestyle bacteria. Using MicroLife we identified a total of 787 and 377 lifestyle associated genes (LAGs) significantly correlated with plant pathogenic lifestyle in *Burkholderia/Paraburkholderia* and *Pseudomonas*, respectively. Next, we made a function-based selection of 17 LAGs correlated with plant pathogenic lifestyle, generated 17 site-directed mutants, and performed plant-pathogen bioassays to validate the accuracy of MicroLife to predict LAGs. For *Burkholderia plantarii* we demonstrated the involvement of 5 LAGs in virulence. For *Pseudomonas* spp., we detected 377 LAGs, of which a high percentage were already described as involved in plant pathogenesis, however, we detected a novel NRPS-PKS never described before and demonstrated its involvement in plant virulence. Our results showed the power of MicroLife to find LAGs using bacterial full or draft genomes.

## **S1.4 Exploring microbial legacy effects on aboveground-belowground interactions**

Pablo M Rodríguez Blanco, Guadalupe Zitalpopoca Hernández, Iván Fernández-López, Ainoa MartínezMedina (indicando quién presentaría).

Filiación: Grupo Interacción Planta-Microorganismo, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiológicos de Salamanca (IRNASA-CSIC)

Upon leaf herbivory, plants change their root exudation chemical profile, leading to the assemblage of specific rhizosphere microbiomes. Recent studies suggest that this process leads plants to recruit beneficial soil microorganisms to help minimize the damage caused by the stress, a phenomenon known as “cry for help”, effectively generating a microbial legacy of interest. In my Ph.D. Thesis, I am addressing: 1) how effects of leaf herbivory can lead to changes in below-ground microbial communities *via* changes in plant physiology (from above to belowground); and 2) the impact of the herbivory-triggered alterations of the rhizosphere microbiome on plant health (from below to aboveground). To explore these effects, I am using two different biological systems: *Solanum lycopersicum*- *Spodoptera exigua*, and *Helianthus annuus* – *Spodoptera exigua*. I am using different methodologies to understand the effects of leaf herbivory on microbiome composition (integrative 16S metagenomics, ITS metagenomics and metabolomics), and the main plant-mechanisms driving this effect (leaf and root transcriptomics and metabolomics, and characterization of root exudation patterns). Furthermore, in a next step, I will explore the impact of the assembled microbiomes on the health of subsequent growing plants.



## **S1.5 Identificación y estudio comparativo de genes implicados en la producción de etileno en *Trichoderma* spp.**

Maria Illescas<sup>1</sup>, Edoardo Piombo<sup>2</sup>, Mukesh Dubey<sup>2</sup>, Enrique Monte<sup>1</sup>, Magnus Karlson<sup>2</sup>, Rosa Hermosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Campus de Villamayor, C/Duero, 12, 37185 Salamanca, España.

<sup>2</sup> Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.

*Trichoderma* es un género de hongos con alto potencial biotecnológico, algunas especies ejercen efectos beneficiosos sobre las plantas, promoviendo el crecimiento o incrementando la tolerancia a estreses bióticos y abióticos. Esta interacción beneficiosa *Trichoderma*-planta podría estar relacionada con la capacidad del hongo de modular la red de fitohormonas vegetal. *Trichoderma* es capaz de producir fitohormonas, siendo su perfil de producción dependiente de la cepa, sin embargo, se sabe muy poco sobre las vías metabólicas y genes implicados en estos procesos. En este trabajo hemos llevado a cabo un análisis comparativo para identificar genes relacionados con la biosíntesis de etileno en 37 especies de *Trichoderma*. Basándonos en la secuencia de aminoácidos de cinco supuestas proteínas implicadas en la biosíntesis de etileno en *T. atroviride*, se han identificado grupos de ortólogos para cada uno de estos genes en las 37 especies de *Trichoderma* utilizando la herramienta *OrthoFinder*. Los resultados mostraron que las especies estudiadas podrían sintetizar etileno, al menos, a través de dos vías metabólicas diferentes. La mayoría de las especies presentan una sola copia de estos genes, excepto para el gen del ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) sintasa, que poseen dos copias. Además, los dominios proteicos en estos ortogrupos están altamente conservados en las especies estudiadas. Los resultados indican que los genes implicados en la síntesis de etileno presentan un alto grado de conservación dentro del género *Trichoderma*, lo cual sugiere que el etileno podría tener un papel esencial en el desarrollo del hongo o su interacción con la planta.

Agradecimientos: Junta Castilla y León (contrato predoctoral María Illescas), Universidad de Salamanca (ayudas de movilidad para centros extranjeros estudiantes doctorado 2022) y Proyecto de I+D+i- “Generación de conocimiento”

PID2021-126575OB-I00, financiado por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/ y por “FEDER Una manera de hacer Europa”.

## **S1.6 Effect of bacterial inoculation on the physiological response of strawberry under phosphorus deficit conditions**

Pedro Valle-Romero, Jesús Valentín García-López, Susana Redondo-Gómez, Noris Jarleny Flores-Duarte, Ignacio D. Rodríguez-Llorente, Yanina Lorena Idaszkin, Eloísa Pajuelo, Enrique Mateos Naranjo

Filiación: Ecología Funcional Aplicada, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla

Intensive strawberry cultivation generates a large environmental impact due to the application of excessive chemical inputs that contaminate aquifers and soils. One of the major problems in agriculture is the scarce availability of some essential nutrients in arable soils, such as phosphorus, which is largely inorganic and insoluble form for plants. For this reason, it is important to find out more environmentally sustainable alternatives that will cover the main functions of chemical fertilizers and, at the same time, improve crop yields.

The main objective of the present work was to evaluate the effect of a consortium of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with the ability to solubilize phosphates on the growth and physiological response of strawberry plants grown under phosphorus deficit conditions (both in the absence of phosphorus and in the presence of insoluble phosphorus). Four differential treatments were chosen depending on whether or not the plants had bacterial inoculum and whether or not the fertilizer used contained inorganic phosphorus.

The results obtained showed a positive effect of PGPR inoculation and this effect was especially noticeable in plants grown with an insoluble phosphorus supply. This response was mediated by direct and indirect effects of the bacterial strains used on the plants, especially the phosphate solubilization capacity, which made possible the bioavailability of the phosphorus provided.

In conclusion, this study shows the potential of inoculation with PGPR to improve strawberry tolerance to phosphorus deficit, making feasible a line of work aimed at making possible more sustainable cultivation practices.

## S1.7 Rescatando *Streptomyces* spp. del microbioma rizosférico de cítricos

Rosa M<sup>a</sup> Vázquez García, Lucía Solaz Ródenas, Ana Quiñones Oliver y Ramón Peñalver Navarro

Grupo de Biotecnología de Bacterias de la Rizosfera, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, IVIA, Valencia

El cultivo de cítricos es el principal cultivo frutal a nivel mundial. Actualmente hay un claro interés por una agricultura más sostenible y respetuosa con el medio ambiente, donde el desarrollo de nuevos bioproductos y el uso de probióticos pueden contribuir de manera decisiva a esta transición ecológica. El estudio del microbioma rizosférico de cítricos nos permite seleccionar bacterias potencialmente beneficiosas para el huésped (Peñalver y col, 2022). El género *Streptomyces* es un componente mayoritario del microbioma rizosférico de cítricos y posee especies descritas como promotoras del crecimiento de plantas que podrían servir de base para el desarrollo de nuevos bioproductos. A pesar de ser un componente mayoritario del microbioma, no está bien representado en las diferentes colecciones de aislados de cítricos (Peñalver y col, 2022). Por tanto, el propósito de este estudio es evaluar en términos de eficacia diferentes condiciones de cultivo ya descritas en la bibliografía, así como diseñar condiciones de cultivo de *novo* en base al análisis genómico de la presencia de genes de biosíntesis de antibióticos en 160 genomas de especies del género. Y con ello, generar una buena y representativa colección de aislados de *Streptomyces* spp. Para evaluar las distintas condiciones de cultivo se han aislado aproximadamente 200 colonias tipo *Actinomyces* y la secuenciación del gen completo 16S rRNA nos indicará la eficacia de las distintas condiciones de cultivo en el aislamiento de especies del género. Asimismo, el análisis filogenético concluyente, nos reflejará la diversidad de especies rescatadas del microbioma de cítricos.

Penyalver y col. 2022. From the bacterial citrus microbiome to the selection of potentially host-beneficial microbes. *New Biotechnology* 70:116-128. DOI: [10.1016/j.nbt.2022.06.002](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.06.002)

## **SESIÓN 2**

### **Biocontrol 1**

## S2.1 Genetic determinants of biofilm formation by the plant-beneficial bacterium *Stutzerimonas stutzeri* MJL19

Verónica Pérez Padilla, María Isabel Ramos González and Manuel Espinosa Urgel.

Department of Biotechnology and Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

*Stutzerimonas stutzeri* MJL19 is a plant growth promoting rhizobacterium isolated from the rhizosphere of *Sesuvium portulacastrum* growing in the Salinas Grandes salt flat in Argentina. *S. stutzeri* MJL19 forms wrinkly colonies and thick biofilms, phenotypes usually correlated with elevated concentrations of the intracellular second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP). We are using two approaches to study biofilm formation and c-di-GMP signalling in this strain: random transposon mutagenesis using mini-Tn5[Km1] and directed deletion of genes potentially involved in these processes. With the first approach we isolated a mutant in the gene encoding a sensor histidine kinase sharing 68% identical residues with GacS of *Pseudomonas putida*. With the second approach, we have generated two mutants: one lacking a cluster of 10 genes that encodes an exopolysaccharide (Psl10 mutant) and one in a gene encoding a protein with a ligand-binding domain and a GGDEF domain (GGDEF-19 mutant). The *gacS*::mini-Tn5[Km1] and Psl10 mutants present altered biofilm formation capacity but the same swimming motility as the wild-type strain. Using a c-di-GMP fluorescence-based biosensor, lower fluorescence could be observed in the *gacS*::mini-Tn5[Km1] and higher in the Psl10 mutant. The GGDEF-19 mutant shows similar biofilm formation and swimming motility as the wild-type, but higher fluorescence with the biosensor. Staining with Congo red revealed white colonies in the wild-type and red colonies in *gacS*::mini-Tn5[Km1] and Psl10, suggesting changes in the production of extracellular matrix. In addition, differences in the growth rate of both mutants with respect to the wild-type could be observed at high salt concentration.

## S2.2 Type VI secretion systems from *Pseudomonas ogarae* F113 mediate bacterial killing and adaption to the rhizosphere

David Vázquez-Arias<sup>1</sup>, David Durán<sup>1</sup>, Patricia Bernal<sup>2</sup>, Álvaro Gómez-Luengo<sup>1</sup>, Esther Blanco-Romero<sup>1</sup>, Miguel Redondo-Nieto<sup>1</sup>, Rafael Rivilla<sup>1</sup> & Marta Martín<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin, 2, 28049 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida de la Reina Mercedes, 6, 41012, Sevilla, Spain

david.vazquez@uam.es

*Pseudomonas ogarae* F113 is a model rhizobacterium considered a relevant biocontrol agent because of its ability to produce antibiotics and antifungals compounds such as DAPG. The genome of *P. ogarae* F113 encodes three Type Six Secretion Systems (T6SSs, a bacterial nanomachine involved in interbacterial competition): F1, F2 and F3, and another five orphan VrgG clusters unrelated to a specific T6SS cluster. An *in silico* and proteomic analysis of F113 revealed genes encoding ten T6SSs effectors, some of them with their immunity protein, associated either with T6SSs operons or with orphan VgrG proteins. Within the T6SSs clusters, there are five effectors (tfe1, tfe2, tfe3, tfe4 and tfe5) with their immunity protein (tfi1, tfi2, tfi3 and tfi4). Tfe2 and tfe3, both encode Rhs effectors, Tfe2 with a toxic RES domain and tfe3 with a toxic HNH domain. Induction of tfe2 in eukaryotic (*S. cerevisiae*) and prokaryotic (*E. coli*) cells results in a reduction of growth. Outside T6SS clusters, we found the effectors tfe6, tfe7, tfe8, tfe9 and tfe10. Tfe8 contains a MatE domain that might disrupt the membrane of the target cells by forming pores. Mutation of the *tfe8* gene resulted in an impairment in bacterial killing. Furthermore, expression of *tfe8* in *E. coli* results in a reduction of growth. Analysing the secretome of the wild-type strain and mutants affected in each of the T6SS systems allowed us to determine which of the systems are secreting each of the effectors and identify new effectors present in *P. ogarae* F113. A natural rhizosphere colonization analysis and the bacterial killing assays related to the different T6SSs reveal the critical importance of these elements for rhizosphere adaption.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been financed by PID2021-125070OB-I00 (MINECO/FEDER EU). David Vázquez Arias was granted by FPI-UAM program (SFPI/2021-00458).

### S2.3 Mejora de *Bacillus velezensis* UMAF6639 como agente de biocontrol

Montserrat Grifé\*, Jesús Hierrezuelo, David Vela-Corcía, Alejandro Pérez-García, Antonio de Vicente, Diego Romero.

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

La necesidad de implementar modelos agrícolas sostenibles ha llevado a la búsqueda de alternativas para hacer frente a las distintas enfermedades de las plantas, siendo el uso de agentes de biocontrol una de las opciones con mayor versatilidad.

Un claro ejemplo de estos agentes son las cepas pertenecientes al grupo de *Bacillus velezensis*, bacterias Gram positivas capaces de colonizar las distintas estructuras de las plantas y de sintetizar una variedad de compuestos con diversas actividades, que van desde la promoción del crecimiento hasta el antagonismo frente a distintos fitopatógenos gracias a la síntesis de moléculas como los lipopéptidos (surfactinas, fengicinas e iturinas) entre otras.

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado cómo la cepa *B. velezensis* UMAF6639 presenta una gran capacidad de biocontrol en plantas pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, derivada principalmente de la producción de lipopéptidos.

El objetivo de este trabajo se centra en la mejora genética por mutagénesis aleatoria de dicha cepa para obtener mutantes con mayor actividad antimicrobiana. Una vez identificados los derivados con mayor actividad antimicrobiana, se está realizando su caracterización para determinar los cambios genéticos que justifican el aumento de su capacidad de biocontrol, así como los cambios en el perfil de producción de metabolitos secundarios, profundizando así en los distintos mecanismos responsables de la actividad antagonista de dichas cepas.

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

## **S2.4 Estudio de las bases moleculares de la colonización de la raíz de aguacate por *Pseudomonas chlororaphis* utilizando la cepa modelo de biocontrol PCL1606**

Blanca Ruiz-Muñoz<sup>1,2</sup>, José A. Gutiérrez-Barranquero<sup>1,2</sup>, Antonio de Vicente<sup>1,2</sup>, y Francisco M. Cazorla<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, España.

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

La rizosfera de las plantas proporciona un ambiente rico en nutrientes que atrae selectivamente a la microbiota del suelo circundante. Algunos de los microorganismos que colonizan las raíces de las plantas ejercen un efecto beneficioso sobre estas, fomentando el crecimiento vegetal o brindándoles protección frente a agentes patógenos. De esta forma, 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 bacteria aislada de las raíces de la planta de aguacate que muestra una marcada actividad de antagonismo y de control biológico frente a diferentes hongos fitopatógenos de suelo, así como una colonización eficiente de la raíz del aguacate. Con el objetivo de descifrar los determinantes genéticos responsables de la interacción de *PcPCL1606* con la rizosfera del aguacate, se ha llevado 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 está analizando en dos modelos vegetales diferentes, semillas de tomate y raíces de aguacate. La identificación de los genes interrumpidos, así como la caracterización fenotípica de los mutantes, podrían proporcionar información esencial para asentar las bases moleculares del proceso de la colonización utilizando como modelo *PcPCL1606*.



## **S2.5 Construcción y caracterización de una comunidad sintética de tres *Pseudomonas chlororaphis* para el estudio de interacciones bacteria-planta-patógeno.**

Rafael Villar-Moreno<sup>1,2</sup>, Sandra Tienda<sup>1,2</sup>, Antonio de Vicente<sup>1,2</sup>, Francisco Cazorla<sup>1,2</sup>, Eva Arrebola<sup>1,2</sup>

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

Las comunidades microbianas presentes en la rizosfera de árboles de aguacate sanos presentan una elevada presencia de bacterias del filo Proteobacteria. De entre las especies del complejo *Pseudomonas fluorescens*, destaca la especie *P. chlororaphis*, que pueden presentar actividades relacionadas con la promoción del crecimiento de plantas (Plant Growth Promotion: PGP) y el control biológico frente diferentes fitopatógenos. Para estudiar las interacciones y el comportamiento que tienen lugar entre distintas cepas de *P. chlororaphis* en su hábitat natural, se ha construido un consorcio microbiano compuesto por tres cepas aisladas de la rizosfera de aguacate, analizando sus fenotipos tanto en solitario como en comunidad. Inicialmente se realizó la búsqueda de genes relacionados con la actividad PGP. A partir de aquí, se analizó la compatibilidad y competitividad *in vitro* e *in vivo* entre las distintas cepas, determinándose la relación de dominancias en las diferentes combinaciones. Se determinó la capacidad de formación de biofilm así como la distribución de las cepas en la raíz de aguacate, determinándose su capacidad de colonización y persistencia. Además, se estudiaron capacidades relacionadas con PGP, como son la solubilización de fosfato y producción de ácido indolacético (IAA). Y, por último, se analizó la capacidad de control biológico de la comunidad frente a hongos fitopatógenos en el modelo tomate- *Fusarium oxysporium* y aguacate- *Roselinia necatrix*.

Financiación: UMA18-FEDERJA-046 y PID2021-123713OB-I00

## **S2.6 Contribución de la región N-terminal de la proteína amiloide TasA en su función estructural y en la formación del biofilm de *B. subtilis***

Laura Domínguez García, Jesús Cámara-Almirón, Antonio de Vicente, Diego Romero.

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

Las proteínas amiloides tienen la tendencia natural de formar fibras insolubles a partir de monómeros solubles, un proceso que implica la formación de agregados de distintos tamaños y con distintas conformaciones. En *Bacillus subtilis*, encontramos a TasA, una proteína amiloide que desempeña un papel fundamental tanto en la formación de biopelículas como en la homeostasis celular. Las biopelículas permiten la asociación de bacterias en comunidades unidas por una matriz extracelular (ECM). En trabajos previos, se ha estudiado las propiedades estructurales de TasA en su forma fibrilar y mediante la digestión de TasA con proteínasa K se demostró la existencia de una región resistente a la degradación proteolítica que comprendería el núcleo amiloide de TasA en la mitad N-terminal de la proteína. En base a ello, se pretende estudiar con mayor profundidad el núcleo amiloide de las fibras de TasA para caracterizar los determinantes de secuencia que promueven el comportamiento bioquímico de la proteína. El análisis in vitro de la región ha demostrado que el núcleo conserva todas las propiedades amiloides asociadas a la fibra madura de TasA. Además, estudios bioinformáticos del núcleo amiloide han mostrado la existencia de regiones propensas a la agregación que podría explicar sus propiedades. Mutaciones puntuales en aminoácidos potencialmente amiloidogénicos de esta región podrían interferir en el comportamiento del núcleo. La caracterización estructural, bioquímica y biofísica de esta región de la mitad N-terminal de TasA parece apuntar hacia la existencia de aminoácidos específicos que son esenciales para la función estructural de la proteína en la ECM.

Este trabajo está financiado por el proyecto AGL2016-78662-R y PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación; European Research Council Starting Grant (BacBio 637971).

## **SESIÓN 3**

### **Tolerancia a estrés abiótico**

### **S3.1 El Saladar de El Margen, ambiente hipersalino fuente de bacterias halotolerantes de interés agrícola en condiciones de estrés salino**

Patricia Sánchez<sup>1</sup>, Francisco Palma<sup>3</sup>, Miguel Rodríguez<sup>1</sup>, Inmaculada Llamas<sup>1,2</sup>, Inmaculada Sampedro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Granada

<sup>3</sup>Dpto. Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada

Mail: [patriciasancas@correo.ugr.es](mailto:patriciasancas@correo.ugr.es)

El uso de fertilizantes y pesticidas en agricultura, junto a los desafíos del cambio climático, generan un entorno hostil para los cultivos, provocando una situación crítica. El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) ofrece una alternativa simple, económica y ecológica para disminuir las pérdidas debidas a estreses abióticos gracias a los diferentes mecanismos que presentan estos microorganismos para favorecer el crecimiento de las plantas. Entre los mecanismos de adaptación a la salinidad, destacan la acumulación de azúcares solubles para reducir el potencial osmótico de las células vegetales y el incremento de poliaminas y polifenoles para contrarrestar el daño oxidativo.

Las halófitas constituyen nichos poco explorados y de los que podrían aislarse microorganismos adaptados a condiciones extremas con potencial para su uso en la industria agrícola.

Este estudio realizó un muestreo en el Saladar de El Margen con el objetivo de seleccionar cepas con actividad PGP en condiciones de estrés abiótico. La actividad PGP de estas se evaluó mediante ensayos con plantas de *Arabidopsis thaliana* y tomate en ausencia y presencia de estrés salino. Igualmente, se evaluaron los mecanismos de adaptación a la salinidad mediante la cuantificación de fenoles, azúcares solubles y poliaminas.

Los resultados destacan el potencial de *Psychrobacter vallis* B38 por sus mecanismos PGP para colonizar la rizosfera y la inducción de mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. La relevancia del estudio radica en el posible uso de cepas halotolerantes como biofertilizantes para mejorar el rendimiento de cultivos en suelos salinos.

### S3.2 Exploring Atacama Desert soil microbiomes for novel strains and traits involved in plant drought stress alleviation

**Pascal Nuijten**<sup>1,2</sup>, Miguel Rodriguez Gonzalez<sup>1,2</sup>, Adrian Pintado<sup>1,3</sup>, Guillermo Guerrero Egido<sup>1,2</sup>, Hugo Pantigoso Guevara<sup>1</sup>, Alexandra Stoll<sup>4</sup> and Victor Carrion<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology, Wageningen, The Netherlands;

<sup>2</sup>Institute of Biology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333 BE, Leiden, The Netherlands;

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Málaga, Spain;

<sup>4</sup>CEAZA, Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, La Serena, Chile

Climate change is amongst the major threats of modern human society. Sessile organisms, such as plants, are adapted to cope with a wide range of abiotic stressors, being drought stress one of the main and imminent hazards for plant growth and development. Numerous studies have revealed the potential of microorganisms to enhance the plant tolerance to drought stress, however, little is known about their underlying molecular mechanisms. In this study, we collected soil samples from the Atacama Desert to seek for microbes that potentially could help plants to alleviate the negative effects caused by water scarcity. First, we performed bacterial enrichments of the collected soil samples, using increasing concentrations of polyethylene glycol, to isolate bacteria that are highly tolerant to drought stress. The taxonomic and functional analysis of these enrichments, using shotgun metagenomics, showed that *Achromobacter* spp., *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. were among the taxa with significant increase in relative abundance under high osmotic pressure. We were able to isolate a total of 57 bacterial strains, 21 belonged to Gammaproteobacteria, 16 to Betaproteobacteria, 6 to Bacilli and one to Alphaproteobacteria. Drought stress experiments with *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* were performed using isolates belonging to *Achromobacter* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Roseomonas* spp.. One of the strains, *Achromobacter* spp., showed a strong drought stress alleviation effect in tomato plants. To decipher the key underlying molecular processes we are currently conducting RNA-seq experiments in tomato plants that are inoculated and non-inoculated with *Achromobacter* under drought stress conditions.

### **S3.3 Marine environments as a source of microorganisms for salinity resilience in crops**

Miguel Rodríguez<sup>1</sup>, Adrian Pintado<sup>1,3</sup>, Xinya Pan<sup>1</sup>, Guillermo Guerrero-Egido<sup>1,2</sup>, Kevin Brestcher<sup>1</sup>, Pascal Nuijten<sup>1</sup>, Jos Raaijmakers<sup>1,2</sup>, Víctor J. Carrión<sup>1,2,3</sup>

1. Metagenomics and Plant-Microbe Interactions, Institute of Biology Leiden, Leiden University (The Netherlands).

2. Microbial Ecology Dept., Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW) (The Netherlands).

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

Plants, as sessile organisms, deal with abiotic stress factors. Among them, salinity is one of the most threatening stresses in agriculture due to the climate change and the abuse of chemical fertilizers. Currently more than 20% of the agricultural land is affected by high salinity and it is expected to reach 50% by 2050, probably causing a food crisis in the coming years.

Plants have developed several mechanisms to counteract salt stress (i.e., phytohormone balance, antioxidants or osmoprotectant production) but these are not sufficient to balance plant yield. It is well known that certain bacterial strains which live in association with plants, known as plant growth promotion bacteria (PGPB), increase salt resilience through several traits like interference in phytohormone balance, biofilm formation and extracellular polymeric substances (EPS) or osmoprotectant production, but these mechanisms have been deeply studied and seem to be not enough to deal with the upcoming increase of salinity in agricultural land. Recently, marine environments have become more relevant as an unexplored source of well-adapted bacteria which could harbour new mechanisms related with salinity tolerance in plants.

In this project we are taking a “learning from nature” approach focusing on the study of the halophytes native microbiomes from the Terschelling island (The Netherlands). Bacterial isolates from these plants have been characterized for PGP traits, screened for salinity tolerance using the model plant *Arabidopsis thaliana* Col-0 and comparative genomics with their closest relatives were carried out to identify candidate genes related with this activity, showing the potential of these microbiomes to induce salinity resilience in plants.

### **S3.4 Efecto de *Trichoderma simmonsii* y sus modos de aplicación en las respuestas de plantas de trigo al estrés hídrico**

Alberto Pedrero-Méndez, María Illescas, M. Belén Rubio, Enrique Monte y Rosa Hermosa

Filiación: Departamento de Microbiología y Genética. Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE). Universidad de Salamanca.

*Trichoderma* es un género de hongos filamentosos que engloba especies utilizadas como agentes de control biológico frente a patógenos de interés agrícola. Algunas cepas son capaces de colonizar rizosfera y endosfera de las plantas, promoviendo su desarrollo y activando sus defensas frente a estreses bióticos y abióticos. El trigo es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y la sequía, cada vez más frecuente en un escenario de cambio climático como el que vivimos, causa importantes pérdidas de producción.

En este trabajo se evaluaron cuatro cepas de *Trichoderma*, endófitas de trigo, aisladas en un ensayo de campo realizado bajo condiciones de no riego, e identificadas como: *T. harzianum* T136, *T. simmonsii* T137, *T. afroharzianum* T138 y *T. harzianum* T139. En ensayos de invernadero, la cepa T137 mostró la mejor habilidad para proteger a la planta de trigo frente a un estrés hídrico severo, mediante la activación de actividades antioxidantes de la planta. A su vez, la cepa T137 destacó en la producción de los ácidos indol acético y abscísico y de la actividad ACC desaminasa. Además, los resultados mostraron que los efectos beneficiosos de T137 frente a un estrés hídrico dependen del modo de aplicación de la cepa y de la concentración de conidios aplicada.

Pedrero-Méndez et al., 2021. *J. Fungi* 7, 1087

Agradecimientos: Junta Castilla y León (contrato predoctoral de Alberto Pedrero-Méndez y María Illescas) y Proyecto de I+D+i- "Generación de conocimiento" PID2021-126575OB-I00, financiado por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/ y por "FEDER Una manera de hacer Europa".

### **S3.5 Nodulación de leguminosas en situaciones de estrés abiótico: inoculantes con endófitos resistentes a sequía y altas temperaturas como alternativa sostenible.**

Noris J. Flores-Duarte.<sup>1</sup>, Enrique Mateos-Naranjo.<sup>2</sup>, Eloísa Pajuelo.<sup>1</sup>, Jose A. Carrasco Lopez<sup>1</sup>, Susana Redondo-Gómez.<sup>2</sup>, Ignacio D. Rodríguez-Llorente<sup>1</sup>, Salvadora Navarro-Torre<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla.

<sup>2</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) pueden ser usadas como inoculantes para incrementar la nodulación de plantas leguminosas, que son una excelente opción para la recuperación de suelos degradados expuestos a estreses abióticos a través de la fijación biológica de N<sub>2</sub>.

En este trabajo se han utilizado bacterias endófitas (endófitos promotores del crecimiento vegetal, PGPE) aisladas de nódulos de la rizósfera de leguminosas (*Medicago* spp.) de las Marismas del Río Odiel, Huelva, España. Las bacterias seleccionadas pertenecen a los géneros *Ensifer* (*Ensifer* sp. N10) y *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. N4 y N8). Se determinaron la tolerancia a sequía, metales, salinidad y altas temperaturas y sus propiedades PGP (producción de auxinas, fijación de N<sub>2</sub>, actividad ACC desaminasa, etc.). Para ello, se diseñaron experimentos *in vitro* y condiciones de invernadero con suelos expuestos a sequía y temperaturas de 40°C.

Se evaluó la germinación, biomasa y nodulación de *M. sativa*, en ausencia y presencia de sequía y temperaturas de 40°C, con los siguientes tratamientos: un control (C-), inoculación con el rizobio (N10) e inoculación con el consorcio de ambos endófitos junto al rizobio (CSN). En los resultados en condiciones de invernadero con el consorcio (CSN), el número de nódulos aumentó en sequía (66%) y 40°C (52%), en comparación con N10. Los resultados de germinación y biomasa siguieron este patrón: CSN>N10>C-

Estos resultados sugieren que la co-inoculación de leguminosas con rizobios y PGPE multiresistentes es una herramienta útil para promover su crecimiento en suelos con distintos tipos de estrés abiótico.



### **S3.6 Bioherramientas para la mejora de la eficiencia del uso de fertilización química y recursos hídricos en explotaciones freseras**

Romano-Rodríguez E<sup>1</sup>, Flores-Duarte N. J<sup>2</sup>, García López JV<sup>1</sup> Mesa-Marín J<sup>1</sup>, Pérez-Romero JA<sup>3</sup>, Rodríguez-Llorente ID<sup>2</sup>, Redondo-Gómez S<sup>1</sup>, Pajuelo E<sup>2</sup>, Mateos-Naranjo E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 1095, 41012, Sevilla, España. e-mail: [eromano@us.es](mailto:eromano@us.es)

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 1095, 41012 Sevilla, España.

<sup>3</sup>Departamento de Biología, Instituto Universitario de Investigación Marina (INMAR), Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, España.

Se diseñó un experimento en condiciones controladas de invernadero para evaluar el efecto de la inoculación con bacterias altamente resistentes al estrés ambiental y con propiedades PGP, obtenidas de la rizosfera de halófitas, sobre el crecimiento, estado fisiológico y producción de frutos en plantas de fresa (var. Fortuna) bajo condiciones de limitación de insumos (riego y fertilizantes). Las plantas desarrolladas fueron sometidas a tres factores diferentes en combinación, obteniéndose 12 bloques experimentales al azar (n = 96): tres tratamientos de inoculación (no inoculado e inóculos 1 y 2) en combinación con dos regímenes de riego (100% y 70% de la capacidad de campo) y dos tratamientos de fertilización (100% y 70% de fertilización nitrogenada) durante un ciclo de cultivo (octubre-junio). Nuestros resultados mostraron que la inoculación bacteriana mejoró la producción de fresa en plantas cultivadas bajo limitación de riego entre un 5-21% con y sin déficit de fertilización de nitrógeno, y un 25% en plantas desarrolladas bajo condiciones de riego adecuado independientemente del tratamiento de fertilización. Estos efectos positivos en la producción de frutos se relacionaron con una mejora general del rendimiento fisiológico de las plantas. Así, las plantas inoculadas mostraron un mejor balance de asimilación de carbono, y eficiencia en el uso del agua y energía en el aparato fotoquímico. En conclusión, este estudio resalta el potencial del empleo de inóculos basados en bacterias de plantas halófitas como bioherramienta para mejorar la eficiencia y sostenibilidad de las prácticas freseras intensivas.

## **SESIÓN 4**

### **Endófitos 1**

#### **S4.1 Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* a diferentes hospedadores.**

Marta Ballesteros<sup>1\*</sup>, Marta Albareda<sup>1,2</sup>, José Manuel Palacios<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC), Campus de Montegancedo, 28223 Madrid, España. <sup>2</sup> Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. \*Email: marta.ballesteros@upm.es.

*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv) UPM791 es una alfa-proteobacteria que infecta las raíces de diversas leguminosas e induce la formación de nódulos radiculares donde fija N<sub>2</sub>. Trabajos previos en los que se compararon perfiles proteómicos de bacteroides de nódulos de lenteja y guisante revelaron la existencia de un número significativo de proteínas cuya expresión es dependiente de hospedador. Entre ellas se encuentra Dat, una posible diaminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa (DABA-AT) codificada en el plásmido simbiótico y sobreexpresada en guisante. El análisis funcional de esta proteína se ha abordado estudiando: i) el fenotipo simbiótico de mutantes defectivos en este gen y cepas de sobreexpresión en plantas de guisante y lenteja; ii) la capacidad competitiva del mutante frente a la cepa silvestre; iii) la actividad DABA-AT; iv) el crecimiento en vida libre en diferentes fuentes de nitrógeno; y v) la producción de biofilm. Los resultados sugieren que DAT es una enzima con actividad DABA-AT que afecta la capacidad de crecimiento en L-homoserina y la competitividad para nodulación en guisante pero no en lenteja. Por otro lado, mediante fusiones transcripcionales del promotor de *dat* al gen reportero *gusA* se ha demostrado que este gen se expresa en condiciones de vida libre y en simbiosis con un mayor nivel de expresión en guisante que en lenteja. Adicionalmente, se ha estudiado la relevancia ecológica de este gen en suelos de Tierra de Campos, habiéndose observado la presencia del gen en una fracción minoritaria de aislamientos tanto de lenteja como de guisante.

#### **S4.2 Estudio del papel de la proteína de respuesta a estrés sHSP<sub>252</sub> en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa**

Lucía Domingo Serrano<sup>1</sup>, Marta Albareda<sup>1,2</sup>, Claudia López-Sanchis<sup>1</sup>, Carla Alejandre<sup>1</sup>, José Manuel Palacios<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC), Campus de Montegancedo, 28223 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain.

*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv) es capaz de fijar N<sub>2</sub> en simbiosis con leguminosas del grupo IRLC (Inverted Repeat-Lacking Clade). Estas plantas producen péptidos antimicrobianos (NCR) que inducen la diferenciación de las células vegetativas a bacteroides, su forma endosimbionte. Además de los NCR, los bacteroides deben ser capaces de soportar otros estreses dentro del nódulo (microaerobiosis, “burst” oxidativo, etc).

Estudios proteómicos comparativos entre bacteroides inducidos por la cepa Rlv UPM791 en plantas de guisante (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) identificaron unas 100 proteínas con expresión dependiente del huésped. Entre ellas, fueron identificadas proteínas del tipo sHSP (small Heat Shock Protein), que funcionan como chaperonas estabilizando otras proteínas parcialmente desnaturalizadas en respuesta a diferentes tipos de estrés. El objetivo de este trabajo es analizar la función de la proteína sHSP<sub>252</sub>, sobreexpresada en bacteroides de guisante inducidos por Rlv UPM791.

Los resultados obtenidos señalan que sHSP<sub>252</sub> es necesaria para alcanzar niveles máximos de fijación de nitrógeno en plantas de guisante. La región promotora del gen *shsp\_252* contiene dos cajas anaeróbicas y el análisis de la regulación de la expresión mediante fusiones con el gen *gusA* ha mostrados que *shsp\_252* se expresa en condiciones microaeróbicas de forma dependiente del factor de transcripción FnrN. Además, experimentos de inducción controlados indican que sHSP<sub>252</sub> ofrece protección frente a estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El análisis de copurificación de sHSP<sub>252</sub>, a partir de bacteroides de guisante, ha identificado proteínas necesarias para la fijación del nitrógeno, otras sHSPs y proteínas implicadas en la biosíntesis de grupos hemo, entre otras.

### S4.3 Functional analysis of a host-dependent metal transporter system in the *Rhizobium*-legume symbiosis

Joanna Soldek<sup>1\*</sup>, Ignacio Delgado Santamaría<sup>1</sup>, José Manuel Palacios<sup>1,2</sup>, Marta Albareda<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC), Campus de Montegancedo, 28223 Madrid, Spain, <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain. \*j.soldek@upm.es

Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis constitutes an alternative to the use of nitrogen fertilizers. The establishment of the symbiosis requires sophisticated plant- and bacteria-dependent mechanisms to adjust the behaviour of both partners leading to the formation of nodules where rhizobia are differentiated to bacteroids, the symbiotic nitrogen-fixing form.

Proteomic analysis of bacteroids induced by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 from pea and lentil nodules showed that the expression of over 100 proteins is dependent on the legume host indicating that the host induces rhizobia-specific responses that might define the symbiotic performance. Among these proteins, a metal binding protein RLV\_3444, a periplasmic binding protein (PBP) component of the ABC transporter system RLV\_3442-3444, overexpressed in pea bacteroids was identified suggesting that the provision of some metal(s) to the bacteroid is more restrictive in the *Rhizobium*-pea symbiosis. This work aims to study the functional role of the RLV\_3442-3444 metal transporter system in the *Rhizobium*-legume symbiosis.

Results have shown that zinc concentration in pea bacteroids induced by a mutant strain affected in the transporter system decreased in comparison with the wild type. Functional analysis of RLV\_3442-3444 has revealed that RLV\_3444 replaces the role of PBP ZnuA under free-living and symbiotic conditions. The defective growth phenotype of the RLV\_3444/ZnuA mutant strain under Zn-depleted conditions was complemented by supplementation with zinc but not with manganese or iron. Transcriptional analysis revealed that the system is expressed under zinc-limiting conditions and repressed in the presence of this metal. The regulatory region of the system has also been identified.

#### **S4.4 Importancia del Sistema de Secreción de Tipo VI de *Rhizobium* spp. en simbiosis con leguminosas**

Bruna Fernanda Silva de Sousa, Andrea Arrabal, Lucia Domingo-Serrano, Rodrigo Gómez-Pellicer, Diego López Monte Joaquín Giner-Lamia, José Manuel Palacios, Luis Rey.

Filiación: Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (UPM)- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC), Campus de Montegancedo, 28223 Madrid, Spain.

El sistema de secreción tipo VI (T6SS) es una nanojeringa de algunas bacterias Gram-negativas que inyectan proteínas llamadas efectores en otras o en eucariotas. La mayoría de los efectores tienen actividad antibacteriana. Los genes estructurales del T6SS están presentes en más del 64% de *Rhizobium* spp. secuenciados, pero su relevancia no se conoce bien. Nuestro grupo estudia el T6SS de *Rhizobium etli* Mim1 (ReMim1) y *R. ruizarguesonis* UPM1134 (Rr1134). En la primera cepa se demostró un efecto positivo del T6SS en la simbiosis y en la segunda, el T6SS parece ser inactivo en vida libre y en simbiosis con guisantes. Mutaciones en genes candidatos a efectores en ReMim1 no tienen efecto negativo en simbiosis con judías, sin embargo, la expresión de varios candidatos en *E. coli* afectó al crecimiento. Los mutantes también presentaron menor competitividad para nodular judías y en ensayos de coincubación con la cepa parental. En el segundo modelo, Rr1134, no se ha inmunodetectado Hcp (proteína distintiva de los T6SSs) a partir de bacteroides o de células crecidas en vida libre por lo que el sistema estaría inactivo. En 2003 se demostró que la cepa RBL5523 de *R. trifolii* posee un T6SS que impide la nodulación efectiva con guisantes. Al comparar la región promotora del T6SS de Rr1134 con el de RBL5523, se ha encontrado un cambio en un nucleótido que podría ser clave en el estado de activación/inactivación del promotor. Estos datos indican que el T6SS tiene diferente función dependiendo de la cepa rizobiana y hospedador.

#### **Agradecimientos**

Esta investigación fue financiada por MICIU (RTI2018-094985-B-I00) y MICINN (PID2021-124344OB-I00), España. BFSS fue financiada por la beca CNPq-Brazil (GDE-204842/2018-2). LD-S ha sido financiada por la beca FPI (PRE2019-091327del MCINN, España).

#### **S4.5 Endófitos asociados al efecto beneficioso de *Bacillus subtilis* como potenciales promotores del crecimiento vegetal**

María Victoria Berlanga-Clavero<sup>1</sup>, Carlos Molina-Santiago<sup>1</sup>, Antonio de Vicente<sup>1</sup>, Víctor J. Carrión<sup>1,2</sup> & Diego Romero<sup>1</sup>

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

2 Institute of Biology, Leiden University, Leiden, Países Bajos

*Bacillus subtilis* es una bacteria que interacciona con plantas favoreciendo la defensa frente a patógenos y estimulando el crecimiento. En trabajos previos basados en transcriptómica, metabolómica y microscopía se determinó que la respuesta desencadenada en semillas de melón tras aplicar *B. subtilis* constaba de cambios en estado metabólico que se mantenían a lo largo del crecimiento de la planta. Se identificaron dos componentes de la matriz extracelular, la proteína TasA y el lipopéptido fengicina, cuya aplicación en semillas daba lugar un efecto promotor del crecimiento de distinta duración mediante mecanismos de acción basados en la producción diferencial de especies reactivas de oxígeno y la optimización del catabolismo de reservas lipídicas<sup>1</sup>.

Dado que de forma subyacente a estos cambios metabólicos la composición o dinámica de la endosfera podría verse afectada, se realizó una secuenciación masiva de la región de ARN ribosómico 16S en semillas y plántulas. Los resultados muestran variaciones menores en los niveles de algunas especies asociadas a los tratamientos con componentes purificados, mientras que la aplicación de *B. subtilis* se asocia a un cambio significativo en la estructura de la comunidad bacteriana, donde especies de actinobacterias y *Sphingomonas* se encuentran favorecidas. Algunas de estas especies se han aislado y caracterizado como promotoras de crecimiento o de la germinación. Actualmente se utilizan en ensayos de interacción y competición en vistas de realizar tratamientos individuales o combinados en semillas de otros cultivos. Los resultados permitirán determinar si las distintas actividades beneficiosas son compatibles entre sí y definir la especificidad del efecto positivo.

Referencias:

1) Berlanga-Clavero et al. 2022. *Bacillus subtilis* biofilm matrix components target seed oil bodies to promote growth and anti-fungal resistance in melon. *Nature Microbiology*, 7: 1001–1015.

#### S4.6 Unlocking inner power: endophytic bacterial functions activated by pathogen infection

**Xinya Pan**<sup>1,2</sup>, Jos M. Raaijmakers<sup>1,2</sup>, Victor J. Carrión<sup>1,2,3</sup>

1. Institute of Biology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333 BE Leiden, Netherlands
2. Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Droevendaalsesteeg 10 6708 PB Wageningen, Netherlands
3. Departamento de Microbiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Málaga, Spain.

The plant microbiome harbors a largely untapped functional potential that contributes to plant growth and health. Endophytic bacteria colonize and thrive within plant tissues and can act as a second layer of defense against pathogen infection. Here we aim to identify functional traits in the endophytic microbiome and decipher how specific bacterial genes involved in plant defense are activated by metabolites released from plant roots upon fungal infection. In previous studies (Carrión et al., 2019; *Science*), we established a large collection of endophytic bacterial strains that harbor various biosynthetic gene clusters (BGCs) with unknown functions. More specifically, we focus on endophytic *Flavobacterium* and *Chitinophaga* that act synergistically in protection against the fungal root pathogen *Rhizoctonia solani* via the expression of BGC298 and chitinase genes, respectively. Here, we conducted comparative metabolomics and showed that 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB), the lower ligand of vitamin B<sub>12</sub>, is less abundant in the knockout mutant of BGC298 ( $\Delta$ BGC298) in *Flavobacterium* and absent in the  $\Delta$ *bluB* mutant. We also showed that DMB is inhibitory to hyphal growth of *R. solani* in a concentration-dependent manner. Currently, we are conducting transcriptional analyses to disentangle the regulatory networks of BGC298 and DMB in endophytic *Flavobacterium*. In addition, we are preparing reporter constructs to study how genes in endophytic bacteria are activated in plants under siege. Furthermore, we are expanding the characterization of our endophyte collection by large-scale whole genome sequencing and functional analyses. Our results highlight the potential of endophytic bacteria in plant protection against biotic stresses.



#### **S4.7 Aislamiento y cuantificación de vesículas extracelulares de membrana de *Rhizobium tropici* CIAT 899 en presencia del flavonoide apigenina**

Paula Ayala-García, Alejandro Arce-Rodríguez, José Manuel Borrero-de Acuña, Francisco Javier Ollero, Francisco Pérez-Montaño.

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

La formación de vesículas a partir de la membrana externa de la pared celular es un mecanismo universal en bacterias Gram negativas. Estas nanopartículas esféricas participan en diversos procesos biológicos como la captación de nutrientes, la transferencia horizontal, la respuesta inmune, el quorum sensing o la eliminación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el papel que podrían desempeñar en la simbiosis rizobio-leguminosa.

El diálogo molecular que se establece en la simbiosis rizobio-leguminosa se inicia cuando la bacteria, en respuesta a flavonoides exudados por las raíces, sintetiza y secreta moléculas conocidas como factores de nodulación (FN). Estos FN específicos son reconocidos por la planta, permitiendo por un lado la entrada del rizobio compatible en la raíz y por otro el desarrollo del nódulo. Por ello nos preguntamos, ¿podrían ser las vesículas de membrana externa una parte importante del diálogo molecular durante la simbiosis?

Centrándonos en la etapa más temprana del proceso, hemos querido estudiar si la presencia del flavonoide apigenina, que induce los genes de nodulación de *Rhizobium tropici* CIAT 899, puede afectar a la formación de estas vesículas. En este trabajo, hemos optimizado un protocolo para aislar estas nanoesferas en presencia y ausencia del flavonoide inductor, y hemos confirmado la presencia de vesículas a través de microscopía electrónica y cuantificado su concentración mediante Nano-Sight. Los resultados muestran un claro incremento en el número de vesículas externas de membrana en presencia de apigenina, reforzando la idea de que estas vesículas puedan tener un papel importante en simbiosis.

## **SESIÓN 5**

### **Endófitos 2**

### S5.1 Caracterización de un nuevo efector de *Sinorhizobium fredii* HH103

Diego García-Rodríguez, Irene Jiménez-Guerrero, Paula Ayala-García, Pedro Reyes-Pérez, Lucía Gutiérrez-Sáez, José-María Vinardell, Francisco Javier López-Baena.

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

*Sinorhizobium fredii* HH103 es un rizobio de amplio rango de nodulación capaz de colonizar las raíces e inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en una gran variedad de plantas leguminosas. Entre las señales moleculares bacterianas implicadas en el establecimiento de la simbiosis encontramos los factores de nodulación o factores Nod, los polisacáridos de superficie y el sistema de secreción de tipo III (T3SS). El T3SS es una maquinaria molecular que permite a la bacteria inyectar proteínas al interior de células hospedadoras. Las proteínas translocadas por el T3SS, también llamadas efectores (T3E), influyen en el proceso de nodulación, estando involucradas en la determinación del rango de hospedador y la eficiencia de la nodulación. Además, en *S. fredii* HH103 la regulación de la activación de los genes del T3SS se encuentra ligada al proceso de nodulación, dependiendo de flavonoides y del regulador transcripcional global NodD1.

En este trabajo nos centramos en la caracterización de un posible nuevo T3E de *S. fredii* HH103, Sfe1. El gen *sfe1* ha sido identificado *in silico* y la secuencia aminoacídica de la proteína que codifica presenta homología con efectores de tipo TALE encontrados en bacterias fitopatógenas. Estudios de expresión indican que la transcripción de *sfe1* se induce en presencia del flavonoide genisteína y de exudados radicales. Además, se han realizado ensayos de secreción para determinar si Sfe1 es secretado a través del T3SS.

## **S5.2 Identificando nuevos actores moleculares del proceso simbiótico a través del estudio de las vesículas extracelulares de membrana de bacteroides**

Natalia Moreno de Castro, Paula Ayala García, Irene Jiménez-Guerrero, Francisco Pérez Montañó y José Manuel Borrero de Acuña

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Av. de la Reina Mercedes, no. 6, Sevilla, CP 41012, España

Los rizobios son un grupo de proteobacterias con la capacidad de establecer simbiosis con leguminosas. En este proceso, los rizobios infectan sus raíces e inducen la formación de un nuevo órgano, los nódulos. Una vez en dentro de éstos, los rizobios se diferencian en bacteroides, células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico en amonio, nutriente que se suministra a las leguminosas a cambio de carbono y otros compuestos. Para que la simbiosis sea efectiva, es necesario un diálogo molecular que comienza con exudados radiculares que incluyen flavonoides. Los rizobios, en respuesta, producen los denominados factores Nod, moléculas señal que activan diferentes respuestas en la planta, incluida la curvatura de los pelos radicales o la organogénesis del nódulo. Sin embargo, existen otras moléculas importantes para que el proceso de nodulación sea exitoso, como es el caso de los polisacáridos superficiales o los sistemas de secreción de proteínas.

En este trabajo nos preguntamos si las vesículas extracelulares de membrana (VEM) podrían jugar un papel activo en las últimas fases del proceso simbiótico. Para ello, hemos aislado estas estructuras a partir de bacteroides de nódulos de soja infectados con *Sinorhizobium fredii* HH103 mediante técnicas de ultrafiltración y ultracentrifugación, y hemos realizado un análisis proteómico. De esta forma, hemos encontrado una serie de proteínas presentes en las VEM de bacteroides. La mutación del gen que codifica para una de ellas, un transportador de auxinas, tuvo como consecuencia un menor éxito del proceso simbiótico entre *S. fredii* HH103 y la soja.

### **S5.3 Caracterización del Sistema de Secreción Tipo VI de *Sinorhizobium fredii* USDA257**

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

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, Sevilla, España.

Para la agricultura, la simbiosis realizada por los rizobios y las leguminosas es una de las más importantes a nivel económico y medioambiental. En ella, la bacteria coloniza las raíces de las plantas induciendo la formación de un órgano denominado nódulo. Dentro de estas estructuras los rizobios llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno, disminuyendo así la demanda de este elemento, crítico para el crecimiento vegetal. Distintos sistemas de secreción bacterianos (TXSS, del inglés Type X Secretion System) se han visto implicados en el establecimiento de la simbiosis, siendo el más estudiado el T3SS. Curiosamente, aunque el T6SS está ampliamente distribuido entre los rizobios, se desconoce su papel en la simbiosis con las leguminosas. Este sistema es usado comúnmente como arma antimicrobiana, aunque algunas bacterias utilizan este sistema para manipular células eucariotas. En nuestro laboratorio, estudiamos el T6SS de *Sinorhizobium fredii* USDA257, una bacteria de crecimiento rápido que presenta un amplio rango de hospedador. *S. fredii* USDA257 posee un único clúster de T6SS que, además de contener los genes que codifican todos los componentes estructurales del sistema, contiene dos genes que codifican potenciales efectores que podrían tener como diana la pared celular de las células vegetales. Mediante ensayos de regulación y secreción hemos demostrado que el sistema se encuentra activo y que puede ser inducido en medios de cultivos pobres en nutrientes. Además, los ensayos de nodulación entre *S. fredii* USDA257 y su hospedador natural, *Glycine max* var Pekin, parecen indicar que el T6SS juega un papel positivo en simbiosis.

#### S5.4 El sistema de secreción de tipo 3 simbiótico como determinante en la especificidad para nodular variedades de soja salvaje

<sup>1</sup>Lucía Gutiérrez-Sáez, <sup>1</sup>Diego García-Rodríguez, <sup>1</sup>Ana M. Buendía-Clavería, <sup>1</sup>José E. Ruiz-Sainz, <sup>2</sup>Dulce N. Rodríguez-Navarro, <sup>1</sup>Irene Jiménez-Guerrero, <sup>1</sup>Carlos Medina, <sup>1</sup>Francisco Javier López-Baena.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla; <sup>2</sup>IFAPA Las Torres y Tomejil.

*Glycine soja* (Siebold and Zucc.) es el ancestro silvestre de la soja comercial actual (*G. max*). En la simbiosis con la soja, se observa el fenómeno denominado “especificidad de cultivar”, en el que ciertas estirpes de rizobios (Sino- o Bradyrhizobium) son incapaces de nodular ciertos cultivares de soja. Este bloqueo está asociado a la presencia de distintos genes de resistencia (*R*), denominados genes *Rj/rj*, que codifican proteínas R, las cuales reconocen específicamente a ciertos efectores (T3E) secretados a través del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), llegando a impedir por completo el proceso de nodulación.

Estudios previos llevados a cabo por nuestro laboratorio indican un papel significativo del T3SS de *Sinorhizobium fredii* HH103 y NGR234 en la simbiosis con líneas de soja salvaje procedentes de China. Estos resultados sugieren la presencia de distintos genotipos *Rj/rj* en *G. soja* o, incluso, de nuevos genes *R* que eventualmente pueden haberse transferido durante el proceso de domesticación y que aún no han sido identificados.

El principal objetivo de este estudio es determinar qué T3E están involucrados en el bloqueo de la nodulación de sojas salvajes. Además, mediante ensayos de transferencia de plásmidos simbióticos entre estirpes de *S. fredii*, se pretende estudiar si se induce o bloquea la nodulación en esta leguminosa, ya que es en este plásmido donde se localizan los genes relacionados con la estructura del T3SS y la mayoría de los T3E.

## **S5.5 Transcriptoma no codificante de *Sinorhizobium fredii* HH103: una nueva visión de la regulación simbiótica**

Francisco Fuentes-Romero<sup>1</sup>, Sebastián Acosta-Jurado<sup>2</sup>, Pilar Navarro-Gómez<sup>2</sup>, Paula Ayala-García<sup>1</sup>, Francisco Pérez-Montaño<sup>1</sup>, Francisco-Javier Ollero<sup>1</sup>, Sabina Guedes-García<sup>3</sup>, Natalia García-Tomsig<sup>3</sup>, José Ignacio Jiménez-Zurdo<sup>3</sup>, José- María Vinardell<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla (España); <sup>2</sup>Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC), Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla (España); <sup>3</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada (España).

*Sinorhizobium fredii* HH103 es un rizobio de amplio rango de hospedador, capaz de establecer simbiosis fijadoras de N<sub>2</sub> con docenas de leguminosas. Esta interacción requiere una compleja comunicación entre la bacteria y la planta donde participan una serie de señales moleculares de ambos simbioses, destacando entre las bacterianas los lipoquitooligosacáridos (LCOs) o Factores Nod (NF), proteínas efectoras secretadas por el T3SS (Nops) y diferentes polisacáridos superficiales (EPS, LPS, KPS y GC). En estudios transcriptómicos previos hemos estudiado la regulación de estas señales simbióticas. Sin embargo, estos análisis estaban incompletos, puesto que no tenían en cuenta el papel regulador de los *small* RNAs (sRNAs). Por ello, hemos realizado dos nuevas transcriptómicas. La primera (Cappable- seq) se ha realizado con RNA obtenido de múltiples condiciones de cultivo, con el fin de escrutar el mayor número posible de sitios de inicio de la transcripción (TSS) y anotarlos en función de la localización de las ORFs (messenger RNA, sense RNA, antisense RNA, trans RNA) previamente anotadas en el genoma. La segunda transcriptómica que realizamos es un RNAseq específico de hebra con RNA de condiciones simbióticamente importantes. Los datos obtenidos se mapearán sobre la nueva anotación del genoma que ya contiene los sRNAs, con objeto de identificar los posibles sRNAs que se expresen diferencialmente en esas condiciones. Con estos datos, hemos decidido estudiar varios sRNAs potencialmente implicados en simbiosis como son AbcR1 y AbcR2, ampliamente conservados dentro de los rizobios, y F6, sRNA único entre las especies de rizobios de crecimiento rápido que nodulan con soja.

### **S5.6 Endofitos halotolerantes como inoculantes para el crecimiento de las vides en condiciones salinas**

Salvadora Navarro-Torre<sup>1,2</sup>, Sara Ferrario<sup>2</sup>, Ana Caperta<sup>2</sup>, Gonçalo Victorino<sup>2</sup>, Marion Bailly<sup>2</sup>, Vicelina Sousa<sup>3</sup>, Wanda Viegas<sup>2</sup>, Amaia Nogales<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

<sup>2</sup> Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Associate Laboratory Terra, Instituto Superior de Agronomia, Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal.

<sup>3</sup> Forest Research Centre and Laboratory for Sustainable Land Use and Ecosystem Services, School of Agriculture. Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal

La producción de los viñedos está en riesgo de verse afectado por la salinidad debido al cambio climático y a malas prácticas de riego. La inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal es una herramienta que ayuda a las plantas a contrarrestar los efectos negativos causados por la sal, por lo que en este trabajo se comprueba la efectividad de un consorcio de endofitos halotolerantes en esas condiciones de estrés.

Para ello, se aislaron endofitos de halófitas del género *Limonium* procedentes de ambientes salinos. Estas bacterias se caracterizaron en base a sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal, tanto en presencia como en ausencia de sal. Con las tres mejores se formuló un consorcio para inocular las vides. A los tres meses de comenzar con las inoculaciones, la mitad de las plantas se regaron con una solución salina. Pasados 6 días, se eliminó el exceso de sal de las macetas mediante lavados para su recuperación.

Se observó un efecto positivo del consorcio en los parámetros fisiológicos de las vides antes de su exposición a la sal. Sin embargo, después del tratamiento con sal, todas las plantas mostraron síntomas de estrés y una defoliación severa, aunque hay que destacar que aquellas plantas inoculadas se recuperaron antes de este estrés, mostrando nuevos brotes y tallos más largos.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la inoculación con un consorcio de endofitos halotolerantes parece ser una estrategia prometedora para mejorar la resiliencia de las vides en aquellos viñedos afectados por problemas de salinidad.



### **S5.7 Nuclear calcium oscillation regulates legume root endosymbioses**

Pablo del Cerro<sup>1,2</sup>, Nicola Cook<sup>2</sup>, Rik Huisman<sup>2,3</sup>, Pierre Dangeville<sup>2</sup>, Lauren Grubb<sup>2</sup>, Clemence Marchal<sup>2,4</sup>, Anson Ho Ching Lam<sup>2</sup>, Myriam Charpentier<sup>2</sup>

1. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain;
2. Cell and Developmental Biology Department, John Innes Centre, Norwich, United Kingdom;
3. Laboratory of Molecular Biology, Wageningen, The Netherlands;
4. The Sainsbury Laboratory, Norwich, United Kingdom.

Oscillations in intracellular calcium concentration play an essential role in the regulation of multiple cellular processes. In plants capable of root endosymbiosis with nitrogen-fixing bacteria (rhizobia) and/or arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), nuclear-localized calcium oscillations are essential for the establishment of these interactions.

The entry of rhizobia and AMF into roots is initiated by the recognition of the endosymbiont. Host leguminous plants have plasma membrane receptor-like kinases that recognize rhizobial and fungal elicitors. This recognition triggers the activation of calcium oscillations in root epidermal nuclei to initiate the endosymbiosis program. In *Medicago truncatula* model legume, the fluctuations in nucleoplasmic calcium concentrations are generated by ion channels located at the nuclear envelope, including the CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNELS 15 (CNGC15) and DOES NOT MAKE INFECTIONS 1 (DMI1) channels. However, how these channels are regulated in planta to sustain a calcium oscillatory mechanism remains unknown.

Here, we demonstrate that modulating the activity of these ion channels alter nuclear calcium oscillations and therefore the presence of rhizobia and AMF endosymbionts within the roots. Our data reveal differential regulation of rhizobia and AMF endosymbiosis and suggest that modulating calcium signaling can be used as a strategy to positively impact symbiosis.

### **S5.8 Uso de leguminosas y rizobios eficaces en la restauración de suelos áridos degradados de Canarias**

Sara Pérez-González, Ana Monzón-Ramos, Laura María Pulido-Suárez, Milagros León-Barrios.

Filiación: Grupo Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo. Área de Microbiología, Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Universidad de La Laguna.

En suelos erosionados y degradados, las repoblaciones vegetales suelen fracasar. Una estrategia para aumentar su éxito es incorporar con las plantas su microbiota asociada. En suelos áridos y pobres en nitrógeno, como los de Lanzarote (Islas Canarias), la simbiosis rizobio-leguminosa es una alternativa prometedora por el aporte de nitrógeno. También es importante considerar otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal presentes en los rizobios endosimbiontes y en los endófitos asociados a la raíz.

Este trabajo, parte de un proyecto de restauración de un hábitat de Lanzarote, se ha centrado en el aislamiento de rizobios que nodulen eficazmente tres leguminosas presentes en la zona de estudio: *Bituminaria bituminosa*, *Coronilla viminalis* y *Lotus lancerottensis*. El objetivo final ha sido diseñar un inoculante para cada especie que pueda utilizarse en la repoblación de estas leguminosas en su hábitat natural.

El crecimiento de las plantas trampa en suelos con distinta vegetación y diferentes estados de degradación mostraron diferencias importantes en la nodulación. Asimismo, aunque se recuperaron rizobios fijadores para cada leguminosa, nuestros resultados mostraron la dificultad en recuperar rizobios de leguminosas silvestres de nódulos de aspecto funcional, ya que muchos casos sólo se recuperaron endófitos no nodulantes. Las bacterias aisladas se identificaron mediante secuenciación y para los rizobios se determinó además su simbiovar. Los ensayos de eficacia simbiótica y de biomasa vegetal sirvieron para seleccionar los rizobios más eficaces. Finalmente, la presencia de varias propiedades promotoras del crecimiento vegetal en los rizobios y endófitos aislados son también datos importantes a tener en cuenta a la hora de diseñar los inoculantes.

## **SESIÓN 6**

### **Factores de virulencia 1**

### **S6.1 Caracterización de las rutas de quimiopercepción en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000**

Martí Munar-Palmer<sup>1</sup>, Saray Santamaría-Hernando<sup>1</sup>, José Juan Rodríguez-Herva <sup>1, 2</sup>, Gema López-Torrejón <sup>1, 2</sup> y Emilia López-Solanilla <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas CBGP, Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Parque Científico y Tecnológico de la UPM, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España

La quimiopercepción y la quimiotaxis son procesos cruciales para las bacterias fitopatógenas a la hora de infectar su huésped. Muchas bacterias, incluida la bacteria modelo *Escherichia coli*, presenta una única agrupación génica (“cluster”) correspondiente a la vía de señalización canónica que controla la quimiotaxis. Nuestro patógeno modelo *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*PsPto*) codifica tres de estas agrupaciones (cluster I, II y III), siendo dos de ellas (I y II) homólogas a la canónica de quimiotaxis. El objetivo de este trabajo es elucidar las diferentes funciones asociadas a la quimiopercepción que pueden desempeñar las diferentes vías en el contexto de la patogénesis. Para ello se han generado mutantes simples y dobles de las quinasas centrales de las vías de señalización (*cheA1*, *cheA2* y *cheA3*) y se han caracterizado en numerosos fenotipos relacionados con la quimiopercepción y la patogénesis. Se han medido los niveles intracelulares del segundo mensajero 3',5'-diguanylate cíclico (c-di-GMP), además de cuantificarse la expresión de genes relacionados con su formación y degradación.

Todos los mutantes presentan fenotipos alterados respecto la quimiopercepción y patogénesis. Los fenotipos más destacados son los relacionados con quimiotaxis y motilidad, donde el mutante simple *cheA2* y el doble *cheA1 cheA3* los muestran muy reducidos. Además, todos los mutantes presentan una expresión alterada de genes relacionados con la producción y degradación de 3',5'-diguanylate cíclico. También, demostrando la implicación que tienen todos los fenotipos comprobados en la virulencia, todos los mutantes presentan una menor capacidad de infección respecto a la cepa silvestre.

## S6.2 WhpR, un regulador transcriptional de la virulencia en el patógeno de huéspedes leñosos *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Arroyo-Mateo, Antonio<sup>1,2</sup>; Leal-López, Jesús<sup>1,2</sup>; Caballo-Ponce, Eloy<sup>1,2</sup>; Díaz-Martínez, Luis<sup>3</sup>; Rodríguez-Moreno, Luis<sup>1,2</sup>, Ramos, Cayo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora», Extensión Campus Teatinos, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), E-29010 Málaga

<sup>3</sup>Unidad de Bioinformática, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

El genoma del patógeno del olivo *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 codifica una región denominada WHOP (del inglés, *W*oody *H*ost and *P*seudomonas), involucrada en el catabolismo de compuestos aromáticos y esencial para la virulencia de Psv en plantas de olivo [1]. Esta región la comparten otras bacterias del complejo *Pseudomonas syringae* que infectan huéspedes leñosos. La región WHOP está organizada en cuatro operones, *antABC* (catabolismo antranilato), *catBCA*, *dhoAB* (posible implicación en la ruta  $\beta$ -ketoacido) y *ipoBCA* (actividad oxigenasa) y tres genes transcritos independientemente, *antR* (regulador positivo del operón *antABC*), *PSA3335\_3206* (receptor de aerotaxis) y *whpR* (regulador transcripcional) [2]. Hemos identificado un dominio DBD (del inglés, *DNA-Binding Domain*) y un dominio AraC de unión a ligando en WhpR. Además, se ha purificado la proteína para, en un futuro, llevar a cabo ensayos de interacción proteína-ligando y poder identificar posibles efectores. Para confirmar la actividad reguladora de WhpR, se ha construido un mutante  $\Delta whpR$  en Psv NCPPB 3335 y se ha comparado con la cepa silvestre mediante RNAseq. El resultado será reforzado mediante qRT-PCR. Además, se han construido fusiones transcripcionales de algunos promotores de la región WHOP a *lacZ*, y se ha analizado el inicio de la transcripción de estos mediante 5'-RACE. Los resultados obtenidos nos permitirán definir el papel de WhpR en la regulación de genes codificados dentro y fuera de la región WHOP. Por otro lado, estamos evaluando actualmente el papel de WhpR en la virulencia de Psv y *P. savastanoi* pv. *nerii*, en plantas de olivo y adelfa, respectivamente.

Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto PID2020-115177RB-C21/AEI/10.13039/501100011033, co-financiado por FEDER y P20-00122 (Junta de Andalucía-FEDER)

[1] Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010. Environ. Microbiol., 12, 1604-1620.

[2] Caballo-Ponce *et al.*, 2017. Mol. Plant-Microbe Interact., 30, 113-126.

### **S6.3 El secretoma de *Pseudomonas savastanoi*: identificación de nuevas proteínas extracelulares y su papel en la virulencia durante su interacción con el olivo**

Hilario Domínguez-Cerván<sup>1,2</sup>, Luis Díaz-Martínez<sup>3</sup>, Cayo Ramos<sup>1,2</sup>, Luis Rodríguez-Moreno<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos s/n, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

<sup>2</sup>Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Extensión Campus de

Teatinos, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), E-29010 Málaga

<sup>3</sup>Unidad de Bioinformática, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

La tuberculosis del olivo, causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), se caracteriza por la formación de tumores en plantas infectadas. La sintomatología se debe, principalmente, a la producción de fitohormonas por Psv, y a la translocación de proteínas al interior de células vegetales mediante un sistema de secreción tipo III (T3SS). Además del T3SS, las bacterias Gram-negativas presentan mecanismos para secretar proteínas al espacio extracelular, pero la información sobre proteínas secretadas independientemente del T3SS en bacterias fitopatógenas es limitada. En este trabajo hemos caracterizado, mediante espectrometría de masas, el secretoma de la cepa Psv NCPPB 3335, y de sus cepas mutantes en los genes *hrpA*, implicado en la síntesis del pili del T3SS, y *hrpL*, implicado en la regulación de elementos estructurales y funcionales del T3SS, entre otros genes. Del total de proteínas identificadas, se seleccionaron aquellas que contenían péptido señal para su secreción, obteniéndose un total de 430 y 773 proteínas para la cepa silvestre, a tiempo 12 y 24 horas, respectivamente, 163 y 781 proteínas para el mutante  $\Delta hrpA$ , y 164 y 337 proteínas para el mutante  $\Delta hrpL$ . Del total de proteínas identificadas, las categorías funcionales mayormente representadas fueron: degradación de proteínas, resistencia a agentes antimicrobianos y unión a carbohidratos. Dentro de esta última categoría funcional, se identificaron 5 proteínas que contienen dominios LysM y que, según los análisis de virulencia realizados en las plantas de olivo, están implicadas en la virulencia de Psv.

Financiado por los proyectos PID2020-115177RB-C21/AEI/10.13039/501100011033 (MICINN-FEDER) y P20- 00122 (Junta de Andalucía-FEDER), y por el contrato predoctoral PRE2021-099113 (MICINN)

#### S6.4 Uso de oligonucleótidos para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos hortícolas

Alba López-Laguna<sup>1,2</sup>, Alejandra Vielba-Fernández<sup>1,2</sup>, Alejandro Pérez-García<sup>1,2</sup>, Dolores Fernández-Ortuño<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

<sup>2</sup>Dpto. de Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC) "La Mayora"

*Botrytis cinerea*, agente causal de la enfermedad de la botritis o podredumbre gris, es uno de los principales factores que limitan la producción de cultivos hortícolas en todo el mundo, llegándose a consumir hasta un 40% de fungicidas para su control. Sin embargo, *B. cinerea* ha sido catalogado por el FRAC como un hongo fitopatógeno de alto riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas, hecho que ha sido demostrado en nuestro país. A esto le sumamos la disminución en la diversidad de fungicidas disponibles para los agricultores que, según la estrategia "de la granja a la mesa" del reciente Pacto Verde Europeo, se reducirá a un 50% para 2030. Todo esto evidencia la necesidad de disponer de nuevas moléculas con acción fungicida como estrategias de fitoprotección más sostenibles para su inclusión en las rotaciones de los diferentes programas de control de *B. cinerea*. Con este objetivo, en el presente estudio se pretende comprobar la eficacia de estrategias emergentes que emplean oligonucleótidos con efecto antifúngico, como la tecnología del ARN interferente (ARNi), mediante la técnica de silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS), y el uso de aptámeros o anticuerpos químicos. Para ello, se han diseñado cuatro ARNs de doble cadena (ARNdc) frente a diversos genes diana de fungicidas y dos aptámeros frente a proteínas implicadas en la virulencia/patogenicidad del hongo. Los resultados preliminares obtenidos en ensayos *in vivo* han demostrado que tanto la aplicación de los ARNdc como de los dos aptámeros reducen significativamente el desarrollo del hongo, demostrando el potencial del uso de estos oligonucleótidos en el control de *B. cinerea*.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía (PY20\_00048).

### **S6.5 Identificación y control del patógeno causante de “la muerte regresiva” en árboles de aguacate en el sur de España**

Lucía Guirado-Manzano<sup>1,2</sup>, Dolores Fernández-Ortuño<sup>1,2</sup>, Emilio Guirado<sup>2</sup>, David Sarmiento<sup>3</sup>, Antonio de Vicente<sup>1,2</sup>, Francisco M. Cazorla<sup>1,2</sup>, Eva Arrebola<sup>1,2</sup>.

1. Departamento de Microbiología y Patología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, España. 2. Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, IHSM-UMA-CSIC, Málaga, España. 3. Departamento Técnico de TROPS-SAT 2803, El Trapiche, Málaga, España.

El cultivo del aguacate se ha convertido en el producto subtropical, junto con el mango, con más hectáreas cultivadas en la provincia de Málaga y Granada, pasando a ser el principal motor económico del sector agrícola de esta región.

Desde 2019 se ha estado observando un incremento en la presencia de síntomas compatibles con la enfermedad fúngica conocida como muerte regresiva o como se conoce en inglés “dieback”. Estos síntomas consisten en tejido necrosado y seco que puede afectar desde las puntas de las ramas jóvenes hasta ramas completas, llegando a la muerte del árbol, si éste es una planta joven de menos de tres años. Esta enfermedad está asociada a hongos aéreos de la familia de las Botryosphaeriaceae, compuesta por 26 géneros y unas 1500 especies. Con el fin de determinar la especie causante de la muerte regresiva en aguacate en la región, se realizaron prospecciones en fincas que presentaban árboles con esta sintomatología. Análisis morfológicos y moleculares han revelado que el género *Neofusicoccum* es el más frecuente de los aislados obtenidos y que, además, reproduce los síntomas típicos de la enfermedad durante los ensayos de confirmación de los postulados de Koch.

Actualmente se está realizando estudios de control de la incidencia de la enfermedad empleando distintos productos disponibles en el mercado y autorizados para su uso en aguacate, así como la aplicación de distintas estrategias integradas de manejo, cuyo objetivo es prevenir el incremento de los síntomas, así como reducir el establecimiento de nuevas lesiones.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 806/60.5345 y 806/60.5952 suscrito entre la Universidad de Málaga, Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, adscrito al Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM) y las empresas del sector productivo del aguacate SAT 2803 TROPS, Viveros Blanco S.L. y Viveros Brokaw S.L.



### **S6.7 Papel del clúster de quimiotaxis tipo II en cepas del complejo *Pseudomonas syringae* de huéspedes leñosos y herbáceos.**

Carla Lavado-Benito<sup>1,2</sup>, Luis Rodríguez-Moreno<sup>1,2</sup>, Saray Santamaria-Hernando<sup>3</sup>, Emilia López-Solanilla<sup>3,4</sup>, Cayo Ramos<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos, Universidad de Málaga, Málaga

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Extensión Campus de Teatinos, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga <sup>3</sup> Universidad Politécnica de Madrid, Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Pozuelo de Alarcón, Madrid

<sup>4</sup>Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Biotecnología - Biología Vegetal, Madrid, Madrid

*Pseudomonas savastanoi* es una bacteria fitopatógena que forma parte del complejo *Pseudomonas syringae* y causa tumoración o excrecencias en huéspedes leñosos. El análisis genómico comparativo de los 21 genomas disponibles de cepas de los distintos patovares de *P. savastanoi* reveló regiones específicas que podrían estar implicados en el rango de huésped de cada patovar (1). En concreto, todas las cepas de *P. savastanoi*, excepto las cepas del patovar *mandevillae* y algunas cepas del patovar *nerii* (Psn), poseen un clúster de genes de quimiotaxis, similar al clúster II de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000 y de otras cepas de *P. syringae* que infectan huéspedes herbáceos. Este clúster codifica cinco genes *che* y dos posibles quimiorreceptores (MCPs). El objetivo principal de este trabajo es conocer el papel del clúster II en la regulación de la virulencia y/o la especificidad de huésped en cepas patógenas de plantas leñosas y herbáceas. La construcción de mutantes en los genes del clúster II en Psn23 y Pto DC3000 ha permitido establecer su papel en la virulencia de estas cepas en adelfa y tomate, respectivamente. Además, algunos de estos genes afectan la motilidad tipo *swarming* en Pto DC3000. El análisis bioinformático y la clasificación del dominio de unión a ligando (LBD) (2) de las dos MCPs del clúster II mostró que solo una de ellas presenta un dominio LBD. Para caracterizar esta MCP en la cepa Psn23, se realizaron ensayos de quimiotaxis por capilaridad y se purificó su dominio LBD, con el que se están llevando a cabo ensayos de interacción proteína-ligando frente a una colección de compuestos derivados de plantas.

Financiado por los proyectos PID2020-115177RB-C22/AEI/10.13039/501100011033 y PID2021-125673OB-I00 (MICINN FEDER).

1. Moreno-Pérez A., et al. (2020) *Front. Plant Sci.* 11: 973
2. Sanchis-López C., et al. (2021) *mSystems* 6:e00951-21

## **SESIÓN 7**

### **Biocontrol 2**

## **S7.1 Componentes estructurales de la matriz extracelular de *Bacillus* que median la comunicación con hongos**

Alicia Isabel Pérez Lorente<sup>1</sup>, Carlos Molina Santiago<sup>1</sup>, David Vela Corcía<sup>1</sup>, Antonio de Vicente Moreno<sup>1</sup>, Diego Romero Hinojosa<sup>1</sup>

(1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, La Mayora, Universidad de Málaga (IHSM-UMA-CSIC), Microbiología, Ciencias, Bulevar Louis Pasteur 31, Málaga, España.  
[perezlorente@uma.es](mailto:perezlorente@uma.es)

En la naturaleza las bacterias se encuentran frecuentemente formando comunidades bacterianas conocidas como biofilms, donde las células se encuentran embebidas dentro de una matriz extracelular (MEC) que confiere protección frente a agresiones externas o facilita la captación y uso eficiente de los recursos disponibles. Las interacciones con otros microbios pueden alterar notablemente la estructura de la comunidad y de esta forma el tipo de relación con el entorno. Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la relevancia de la formación de biofilms en la interacción antagonista de *Bacillus* con hongos en la filosfera de melón. Basados en otros trabajos previos, nuestra hipótesis es que la MEC desempeña una función complementaria a la estructural en esta interacción antagonista.

En este trabajo desgranamos el papel de diferentes componentes de la MEC de *Bacillus* en la adhesión a las hifas de *Botrytis*, lo que podría facilitar la liberación eficiente de metabolitos antifúngicos. También describimos cómo los diferentes componentes purificados de la MEC y ciertos metabolitos secundarios de *Bacillus* intervienen en la comunicación química entre *Bacillus* y *Botrytis*, alterando la fisiología y ultraestructura de *Botrytis*, responsables de respuestas celulares y fisiológicas claramente diferenciadas. Además, hemos observado que, durante esta interacción, los componentes estructurales de la pared celular de hongos, quitosano o quitina, alteran la formación de biofilm de *Bacillus*. Nuestros resultados urgen a seguir investigando dichas interacciones con la idea de identificar y describir procesos de adaptación que conduzcan o bien la exclusión o la co-existencia de dos microorganismos inicialmente antagonistas.

## **S7.2 BacLive: un método no invasivo para el estudio de interacciones bacterianas y la dinámica de formación de biopelículas**

Carlos Molina-Santiago<sup>1</sup>, John R. Pearson<sup>2</sup>, María Victoria Berlanga-Clavero<sup>1</sup>, Alicia Isabel Pérez-Lorente<sup>1</sup>, Antonio de Vicente<sup>1</sup>, Diego Romero<sup>1</sup>

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

2 Nano-imaging Unit, Andalusian Centre for Nanomedicine and Biotechnology, BIONAND, Málaga, Spain

[camolsan@uma.es](mailto:camolsan@uma.es)

Las interacciones que tienen lugar entre distintas especies microbianas en un mismo nicho ecológico modulan tanto las propiedades de las comunidades microbianas como su composición. Son de especial relevancia las interacciones entre poblaciones en biopelículas en muchos ámbitos, desde la resistencia a los antimicrobianos hasta la ecología microbiana. En concreto, las bacterias en el ambiente de la planta suelen encontrarse viviendo en forma de biopelículas lo que le confiere una mayor resistencia a estreses bióticos y abióticos. En estudios previos hemos demostrado que dichas interacciones, en rizosfera o la superficie de hojas, pueden progresar desde la cooperación y la coexistencia mutuamente beneficiosa a la competencia y la muerte, o el desplazamiento de poblaciones microbianas o subpoblaciones. La utilización de técnicas microscópicas modernas ha proporcionado una nueva e interesante visión de cómo las bacterias interactúan a nivel celular para formar y mantener estas biopelículas microbianas. Sin embargo, nuestra capacidad para seguir interacciones intraespecies e interespecies complejas *in vivo* a nivel microscópico a lo largo del tiempo es limitada debido a dificultades técnicas. En este trabajo se presenta BacLive, un novedoso método no invasivo para el estudio del crecimiento de poblaciones bacterianas durante interacciones con otros microorganismos, así como la dinámica de formación y desarrollo de biopelículas utilizando microscopía de fluorescencia de alta resolución. Además, presentamos un macro para el procesamiento de las imágenes en ImageJ (<https://github.com/BacLive>), el cual facilita enormemente el manejo de los datos obtenidos y el análisis de imágenes. Este método se puede combinar con otras herramientas para un análisis más profundo.

### S7.3 BC\_1280: una proteína específica de células de *biofilm* en *B. cereus*

Ana Álvarez-Mena<sup>1</sup>, Mélanie Berbon<sup>2</sup>, Axelle Grelard<sup>2</sup>, Estelle Morvan<sup>3</sup>, Antonio de Vicente<sup>1</sup>, Antoine Loquet<sup>2</sup>, Diego Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Extensión Campus de Teatinos, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), E-29010 Málaga <sup>2</sup>L'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano- Objets (CBMN), Unité Mixte de Recherche (UMR 5248) <sup>3</sup> Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), Unité Mixte de Service (UMS 3033) Unité de Soutien (US 001), Centre National de la Recherche (CNRS), University of Bordeaux, Pessac, France

*Bacillus cereus* es un grupo de bacterias con miembros capaces de producir intoxicaciones alimentarias u otras patologías más severas en humanos. En nuestro laboratorio ya hemos demostrado la capacidad de esta bacteria para formar *biofilms*, y la relevancia en su ciclo de vida permitiendo su supervivencia y/o transmisión. Durante este proceso, una determinada subpoblación expresa de forma específica y secuencial un grupo de genes diferentes a los que expresan las células planctónicas. Entre ellos se encuentran los genes *tasA* y *calY* los cuales codifican proteínas de naturaleza amiloide, y con funciones complementarias en la formación de *biofilms*. Entre ese grupo de genes hemos encontrado el locus *bc\_1280*, el cual se encuentra entre los genes *tasA* y *calY*. Este locus está ampliamente distribuido en el grupo de *B. cereus* y especies relacionadas, pero no en *B. subtilis*. Nosotros hemos observado que, a pesar de expresarse a niveles muy bajos en comparación a los genes vecinos, la delección de *bc\_1280* da lugar a un fenotipo deficiente en la formación de *biofilm*. La proteína BC\_1280 se divide en dos dominios: i) en el extremo amino terminal un dominio ampliamente conservado sin función conocida; ii) una serie de repeticiones perfectas en el extremo carboxilo terminal. La combinación de experimentos de genética, biología celular, transcriptómica y biofísica nos han permitido caracterizar estructuralmente a BC\_1280 y determinar la contribución de los dominios en la funcionalidad de la proteína completa, y por tanto en la ecología de *B. cereus*.

Este trabajo está financiado por los proyectos AGL2016-78662-R (FPI BES-2017-081275) y PID2019-107724GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. Actualmente Ana Álvarez-Mena está contratada con la ayuda Contrato Puesto del Plan Propio de la Universidad de Málaga.

#### **S7.4 Ingeniería de vesículas de membrana para modular las interacciones planta-microorganismo para aumentar la nodulación y el crecimiento vegetal.**

Azogue Palma, C.<sup>1</sup>, Ayala García, P.<sup>1</sup>, Moreno de Castro, N.<sup>1</sup>, Jiménez, Guerrero, I.<sup>1</sup>, Pérez Montaña, F.<sup>1</sup>, & Borrero de Acuña, J. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Av. de la Reina Mercedes, no. 6, Sevilla, CP 41012, Spain.

Las vesículas de membrana intra- y extracelulares cumplen una gran variedad de funciones biológicas en bacterias, entre ellas, la comunicación entre bacterias y entre reinos y la optimización de reacciones enzimáticas en cadena. El uso de las vesículas de membrana tiene innumerables aplicaciones biotecnológicas tales como la producción de vacunas, compuestos de valor industrial o transporte de fármacos. Aunque se ha avanzado mucho en los procesos moleculares para la biogénesis de vesículas en eucariotas, en bacterias aún queda bastante por explorar.

Nuestro grupo de investigación junto a la Universidad de Kent (Reino Unido) hallaron una familia de proteínas conservadas entre especies que actúan promoviendo la generación de vesículas extra- e intracelulares. Conseguimos originar proteínas recombinantes de esta familia en *Escherichia coli* a partir de bacterias Gram positivas y negativas para luego observar mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión la reestructuración de la membrana.

Nuestros trabajos con *Pseudomonas aeruginosa* sobre produciendo estas proteínas junto a deleciones de los genes codificantes para dichas proteínas mostraron una diferenciación de dos grupos, parecen estar involucradas en la formación de vesículas de membrana extracelulares, mientras que las otras promueven la formación de vesículas intracelulares. En este proyecto, se propone aprovechar el potencial de estas vesículas para favorecer las interacciones rizobio-planta adaptando y optimizando estas vesículas de membrana para encapsular factores de nodulación, enzimas fijadoras de nitrógeno o inhibidores de fitopatógenos para mejorar la nodulación, la fijación de nitrógeno y, con todo ello el consiguiente crecimiento de las plantas.

### S7.5 Una nueva “comunicación por cable” vegetal: *Trichoderma hamatum* como comunicador entre plantas cercanas tras la infección por patógenos foliares

Jorge Poveda<sup>1</sup>, Víctor M. Rodríguez<sup>2</sup>, Rosaura Abilleira<sup>2</sup>, Pablo Velasco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo AgroBiotech. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid.

<sup>2</sup>Grupo de Genética, Mejora y Bioquímica de Brásicas, Mision Biologica de Galicia (MBG-CSIC).

*Trichoderma* es un género de hongos filamentosos ampliamente estudiado y utilizado como agente de control biológico en la agricultura. Sin embargo, aún no se ha abordado su capacidad para formar redes fúngicas de comunicación vegetal mediante la llamada "comunicación por cable" entre plantas.

En nuestro estudio utilizamos la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, el hongo *Trichoderma hamatum* (aislado de *Brassica oleracea* var. *acephala*) y los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Xanthomonas campestris* (hongo necrotrofo y bacteria hemibiotrofa, respectivamente). Realizamos diferentes combinaciones de plantas aisladas/vecinas y colonización/no colonización de las raíces por *T. hamatum*, así como infecciones foliares con los patógenos.

De este modo, pudimos determinar cómo, en ausencia de *T. hamatum*, existe una comunicación entre plantas que induce resistencia sistémica en las plantas vecinas de las plantas infectadas por los patógenos. Por otro lado, las plantas colonizadas radicularmente por *T. hamatum* muestran una mayor resistencia sistémica contra los patógenos. En cuanto al papel de *T. hamatum* como comunicador entre plantas, es el resultado de un aumento de la señalización foliar por ácido jasmónico, aumentando antagónicamente la señalización radicular por ácido salicílico. Esta situación impide la colonización radicular por *T. hamatum* de la planta infectada foliarmente y conduce a la colonización masiva de la planta vecina, donde se inducen las defensas sistémicas mediadas por el ácido jasmónico.

## **SESIÓN 8**

### **Factores de virulencia 2**



## **S8.1 Sistemas de secreción relacionados con la patogenicidad y competición de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *juglandis* y *corylina***

Sara Cuesta-Morrondo<sup>1,2</sup>, Ralf Koebnik<sup>3</sup>, Jerson Garita-Cambronero<sup>4</sup>, Jaime Cubero<sup>1</sup>

Filiación: <sup>1</sup>Grupo de Bacteriología, Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Madrid, España. <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. <sup>3</sup>Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France. <sup>4</sup>Asociación Nacional de Obtentores Vegetales (ANOVE), Madrid, España.

Dentro de la especie bacteriana *Xanthomonas arboricola* hay tres patovares de gran interés para la agricultura europea: *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap), causante de la mancha bacteriana en *Prunus* spp., *X. arboricola* pv. *juglandis* (Xaj), que provoca el tizón bacteriano, la necrosis apical y el chancro del nogal, y *X. arboricola* pv. *corylina* (Xac), que causa la mancha y la necrosis bacteriana del avellano. En este trabajo se analizaron los sistemas de secreción relacionados con la patogénesis y los mecanismos de competición frente a otras bacterias de seis cepas de *X. arboricola*.

Se estudió el sistema de secreción tipo III (T3SS), determinándose sus efectores (T3Es). Se observó que existían T3Es específicos de Xap y Xac. En cuanto al estudio de sistemas de secreción relacionados con la competición con otras bacterias, se analizaron los sistemas de secreción tipo VI y IV (T6SS, T4SS). Se observó que el T6SS no se encontraba presente en ninguno de los genomas completos de *X. arboricola*. Sin embargo, todas las cepas estudiadas contenían el cluster de genes del T4SS, siendo su estructura distinta en Xac3978 frente al resto de cepas. Además, se creó un hidden Markov Model (HMM) con el que se predijeron proteínas putativas secretadas por el T4SS y se realizaron ensayos que demostraron que las cepas Xaj2499 y Xac3978 eran capaces de competir frente a *E. coli*.

Los resultados presentados son parte del proyecto de I+D+i/PID2021-123600OR-C41, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ "FEDER Una manera de hacer Europa" y PRE2019-090846 "El FSE invierte en tu futuro".

## S8.2 Papel coordinado de los mecanismos de supresión de la inmunidad disparada por quitina de *Podosphaera xanthii*

Nisrine Bakhat, Dolores Fernández-Ortuño, Alejandro Pérez-García

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

Los patógenos fúngicos son los principales microorganismos destructivos para las plantas terrestres y plantean desafíos cada vez mayores para la producción agrícola mundial. La quitina es un bloque de construcción vital para las paredes celulares de los hongos y un inductor ampliamente efectivo para la inmunidad de las plantas. La inmunidad desencadenada por quitina es una poderosa respuesta de defensa de las plantas contra los hongos. Por ello, los hongos fitopatógenos han desarrollado diferentes factores de virulencia que les permiten suprimir la activación de esta respuesta defensiva. En este estudio, pretendemos evaluar los mecanismos moleculares de supresión desencadenados por quitina previamente identificados en *Podosphaera xanthii*, el principal agente causal del oídio en cucurbitáceas. Estos mecanismos consisten en la modificación de oligómeros inmunogénicos de quitina (CDA), la unión a estos oligómeros (CHBE) y su degradación (EWCA). Para ello, utilizamos la tecnología de ARN de interferencia (ARNi), que consiste en la aplicación de ARN de doble cadena (dsRNA) diseñado para suprimir la expresión de los genes *PxCDA* y *PxEWCA*, lo que daría como resultado la reducción de los tres mecanismos de supresión de señalización de quitina mencionada anteriormente, ya que las proteínas CDA y CHBE son productos del mismo gen *PxCDA*. La aplicación de dsRNA se llevó a cabo utilizando ensayos de discos de hoja e infiltración de cotiledones de melón. Los resultados preliminares obtenidos indican que la aplicación de dsRNA reduce significativamente el desarrollo del hongo y los síntomas de la enfermedad de oídio en melón, lo que sugiere que los mecanismos de supresión de la señalización de quitina son esenciales para el desarrollo de *P. xanthii*.

Este trabajo fue financiado por AEI (PDC2021-121373-C21).

### **S8.3 La biosíntesis de aminoácidos azufrados en los oídios requiere la función de dos genes de la planta implicados en la asimilación del sulfato**

Laura Ruiz-Jiménez, Álvaro Polonio, Dolores Fernández-Ortuño y Alejandro Pérez-García.

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

E-mail: [laura110493@uma.es](mailto:laura110493@uma.es)

La productividad de los cultivos de cucurbitáceas se ve afectada por *Podosphaera xanthii*, identificado como el principal agente causal del oídio en estos cultivos. Hasta la fecha, nuestro conocimiento sobre cómo este patógeno depende de su hospedador para desarrollarse es limitado. El objetivo de este estudio es proporcionar nuevas perspectivas sobre la biotrofia de *P. xanthii* que puedan ser de utilidad para el desarrollo de nuevas herramientas de fitoprotección. Para ello, hemos centrado nuestros esfuerzos en el metabolismo del azufre, parcialmente ausente en los genomas de oídios disponibles. En este sentido, el estudio de un conjunto de proteínas conservadas no anotadas deducidas del transcriptoma de *P. xanthii*, nos permitió identificar una de las enzimas involucradas en la asimilación del sulfato ausente en los oídios. Asimismo, los resultados obtenidos de un análisis RNA-seq durante los primeros estadios de la infección en melón, revelaron un gran número de genes de la planta desregulados, entre los que se encontraban dos de los genes del metabolismo del azufre no identificados en oídios. Sobre esta base, los ensayos de silenciamiento génico y de complementación química, nos llevaron a concluir que la biosíntesis de aminoácidos azufrados en los oídios es totalmente funcional pero dependiente de la función de dos genes de la planta implicados en la asimilación de sulfato.

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) (PID2019-107464RB-C21). Laura Ruiz Jiménez ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral (BES-2017-080414) para la formación de doctores de la AEI.

#### **S8.4 Análisis de las metilasas y metilación del DNA en patovares modelo de *Pseudomonas syringae*.**

Mancera-Miranda, Laura<sup>1</sup>, López-Pagán, Nieves<sup>1</sup>, Gutiérrez-Pozo, Gabriel<sup>2</sup>, Spröer, Cathrin<sup>3,4</sup>, Bunk, Boyke<sup>3,4</sup>, Sánchez-Romero, María Antonia<sup>2</sup>, Ruiz-Albert, Javier<sup>1</sup>, Beuzón Carmen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Malaga, Spain.

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>3</sup>Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

<sup>4</sup>German Centre of Infection Research DZIF, Braunschweig, Germany

lauramm@uma.es

La metilación del ADN es el principal mecanismo epigenético en bacterias y archeas. La más abundante en procariotas es la metilación en adeninas. En *E. coli* y en *Salmonella*, este mecanismo se ha asociado a la regulación del inicio de la replicación, la reparación de errores del ADN y la transcripción en genes donde el estado de metilación interfiere con la capacidad de unión a promotores de reguladores transcripcionales. En poblaciones clonales de dichas especies, la metilación del ADN también está implicada en la aparición de heterogeneidad fenotípica (que da lugar a subpoblaciones fenotípicamente diferenciadas, pero genéticamente homogéneas) con implicación en virulencia [2]. Sin embargo, nada se sabe de la metilación del DNA en *Pseudomonas syringae*. *P. syringae* es una importante bacteria fitopatógena, que como complejo de especies se considera responsable de una gran variedad de enfermedades de plantas, con un alto impacto en la producción agrícola a nivel mundial. *P. syringae* es asimismo un importante modelo académico para el estudio de las interacciones planta-patógeno [3]. Con el objetivo de describir los procesos de metilación en *P. syringae* y caracterizar su papel como mecanismo epigenético de regulación de procesos adaptativo, nuestro grupo ha determinado el metiloma de dos de las tres principales estirpes modelo del complejo: *P. syringae* pv. tomato DC3000 y *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, y abordado la caracterización de las metilasas predichas en sus respectivos genomas, identificando varios motivos de metilación en adeninas, y fenotipos asociados a cambios en el nivel de expresión de algunas metilasas.

[1] Blow M. *et al.*, 2016. PLoS Genet, 12(2), 1-28.

[2] Adhikari S. and Curtis P.D., 2016. FEMS Microbiol. Rev., 40(5), 575-591.

[3] Xin X. *et al.*, 2018. Nat. Rev. Microbiol., 16(5), 316-328

### **S8.5 La adquisición de plásmidos de resistencia a cobre en bacterias fitopatógenas ¿disminuye la eficacia biológica?**

Idoia Artoleta, Miriam Urriza, Maite Añorga, Jesús Murillo.

Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Edificio de Agrobiotecnología, Avda. de Pamplona 123, 31192 Mutilva Baja

*Pseudomonas syringae* es una bacteria fitopatógena que además explota muy diversos nichos ecológicos que no implican la infección del huésped. El gran tamaño de su pangenoma sugiere que esta especie se ha beneficiado de una tasa muy alta de transferencia horizontal, incluyendo genes de virulencia y de resistencia a productos fitosanitarios —como antibióticos y cobre—. Estos genes suelen incluirse en plásmidos que, por su número, tamaño y número de copia, pueden suponer en conjunto alrededor del 25% del total del genoma. A su vez, y en ausencia de selección de los genes que portan, la mayoría de los plásmidos suponen una reducción de la eficacia biológica (fitness) de las bacterias. Aunque la ventaja selectiva de los genes de virulencia y resistencia a fitosanitarios parece clara durante el proceso infeccioso, en bacterias fitopatógenas no se ha hecho ninguna valoración del posible coste biológico que puede suponer mantener estos determinantes. *P. syringae* pv. tomato PT23 contiene cuatro plásmidos nativos, de entre los cuales pPT23D (36 kb) confiere resistencia a cobre. En este trabajo hemos abordado la estimación del impacto de este plásmido, así como de otros plásmidos de resistencia, sobre la eficacia biológica de PT23 y de otras bacterias fitopatógenas a las que se les hayan transferido. Para ello se está evaluando la velocidad de crecimiento *in vitro* en diversos medios (sin y con concentraciones subinhibitorias de cobre), ensayos de competición, y virulencia en plantas huésped. Nuestros resultados preliminares indican que pPT23D reduce la eficacia biológica dependiendo de la cepa que lo porte.

Financiado con cargo al proyecto PID2020-115177RB-C22 MCIN/ AEI/ 10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia e Innovación y Agencia Estatal de Investigación, España).

## S8.6 Coste de *fitness* asociado a plásmidos de virulencia de *Pseudomonas syringae*

Miriam Urriza<sup>1</sup>, Maite Añorga<sup>1</sup>, Antonio Arroyo-Mateo<sup>2,3</sup>, Cayo Ramos<sup>2,3</sup>, Jesús Murillo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Edificio de Agrobiotecnología, Avda. de Pamplona 123, 31192 Mutilva Baja; <sup>2</sup>Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga; <sup>3</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga. \*e-mail: [jesus.murillo@unavarra.es](mailto:jesus.murillo@unavarra.es)

Los plásmidos están ampliamente distribuidos en bacterias fitopatógenas y, a menudo, portan genes involucrados en patogenicidad, virulencia o supervivencia en entornos hostiles. Sin embargo, también pueden conllevar una disminución del *fitness* por la gran cantidad de ADN que suponen en el genoma bacteriano y las posibles interferencias en sistemas de regulación transcripcional. En este trabajo hemos abordado el estudio del posible coste de *fitness* que suponen los plásmidos nativos para diferentes cepas de *P. syringae*. Hemos obtenido cepas curadas de *P. syringae* pvs. phaseolicola 1448A, savastanoi NCPPB 3335 y tomato DC3000. Las cepas silvestres y curadas se han marcado con distintas proteínas fluorescentes (miniTn7) y los plásmidos nativos con casetes de resistencia a antibióticos. Realizamos ensayos para estimar la velocidad de crecimiento en medios de cultivo y la capacidad competitiva entre las cepas silvestres y curadas. Se demostraron diferencias de crecimiento entre las cepas silvestre y curada en todas las bacterias analizadas. Además, alguna de ellas, mostraron una ventaja competitiva en cultivos a 1 y 4 días de incubación. Para determinar el impacto de la adquisición de plásmidos en otras bacterias, además de lo anterior, estudiaremos los efectos en la virulencia en planta. Nuestros resultados preliminares indican que la transferencia de pB o pC de NCPPB 3335 a otras cepas fitopatógenas de *Pseudomonas* ocasiona una disminución en la velocidad de crecimiento y en virulencia. Los resultados de estos ensayos se discutirán en términos de coste-beneficio de los plásmidos de virulencia y de sus estrategias de supervivencia en la población bacteriana.

Financiado con cargo a los proyectos PID2020-115177RB-C22 y PID2020-115177RB-C21/ AEI/10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) cofinanciados por FEDER

### S8.7 Assembly and disassembly of a bacterial killing machine and biocontrol weapon. The importance of recycling the sheath of the Type VI secretion system

Marina Murillo-Torres<sup>1</sup>, Joao Botelho<sup>2</sup>, Cristina Civantos<sup>1</sup>, Adrián Ruiz<sup>1</sup>, Joaquín Bernal-Bayard<sup>2</sup>, Despoina A.I. Mavridou<sup>3</sup> and Patricia Bernal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>3</sup>Department of Molecular Biosciences, University of Texas at Austin, Austin (Texas), USA

The Type VI Secretion System (T6SS) is a bacterial nanomachine involved in inter-bacterial competition. In the biocontrol agent *Pseudomonas putida*, it provides the ability to outcompete deleterious phytopathogens protecting plants from their attack<sup>1</sup>.

The T6SS is formed by a membrane complex, a baseplate and a tail. The tail contains an inner tube (Hcp) and is surrounded by a sheath (TssBC) that upon contraction propels the tube for toxin delivery. The contracted sheath is regenerated by the ATPase ClpV, allowing for a new round of firing. Previous studies have shown that ClpV is relevant to maintaining T6SS functionality<sup>2-4</sup>. Therefore, a deeper understanding of *P. putida* ClpV would allow the optimization of T6SS efficiency and thus improving the biocontrol capabilities of this agent.

Here, we study ClpV from a functional and biochemical perspective. We use Hcp secretion as a hallmark of T6SS functionality. A strain lacking *clpV1* was deficient in Hcp1 secretion, implying that T6SS was not functional. Hcp1 levels were restored in a complemented strain and could be increased by overexpressing *clpV1*. As expected, a *clpV1* mutant displayed a reduced ability to kill *E. coli*. These data indicate that the efficiency of *P. putida* T6SS could be modulated by ClpV. To this end, we identified ClpV1 interaction partners by bacterial two hybrid assays. ClpV1 interacts with the sheath stabilizer TagB1<sup>5</sup> and the core components TssK1 (baseplate), TssA1 and TssB1 (tail). This suggests that ClpV1 could be placed on a baseplate/tail level to access the sheath as soon as required.

1. Bernal *et al.* (2017). ISME J. 11(4):972-87.
2. Förster *et al.* (2014). J Biol Chem. 289(47):33032-43.
3. Douzi *et al.* (2016). Sci Rep. 6:1-13.
4. Basler *et al.* (2012). Nature. 483(7388):182.6.
5. Bernal *et al.* (2021). PNAS. 118 (7) e2008500118

This research was supported by “Ministerio de Ciencia e Innovación” - Proyectos de Generación de Conocimiento 2021, PID2021-123000OB-I002020 grant awarded to PB.



### **S8.8 El gen de una proteína de anclaje a GPI como nueva diana para el control de *Podosphaera xanthii***

Isabel P. Roji, Dolores Fernández-Ortuño, Alejandro Pérez-García

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

<sup>2</sup>Dpto. de Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC) "La Mayora"-

Una de las principales limitaciones en la producción del cultivo de cucurbitáceas es la producida por la enfermedad del oídio, causada por el hongo biotrofo *Podosphaera xanthii*. Para controlar la enfermedad, se lleva a cabo un manejo integrado combinando distintas estrategias, siendo la aplicación de fungicidas el método más utilizado y eficaz. Sin embargo, *P. xanthii* ha sido catalogado por el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) como un patógeno con un alto riesgo de desarrollo de resistencia al poco tiempo de ser estos compuestos autorizados para su uso. Si a ello le sumamos las nuevas restricciones que estos productos fitosanitarios están teniendo a nivel europeo, debido a la estrategia "de la granja a la mesa" dentro del Pacto Verde Europeo, nuevas herramientas fitosanitarias que permitan un control sostenible de esta enfermedad son necesarias. Es por ello que el empleo de tecnologías emergentes como el ARNi mediante el silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS), está atrayendo cada vez más el interés de empresas agrobiotecnológicas. En este trabajo se ha evaluado si el gen *Ecm33* de *P. xanthii*, que codifica para una proteína de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que parece ser fundamental para el correcto ensamblaje de la pared celular fúngica, podría ser un gen esencial para el desarrollo de *P. xanthii*. Los resultados preliminares obtenidos tras pulverizar ARNdc dirigidos a silenciar la expresión de *PxEcm33* sobre plantas de melón inoculadas con conidios de *P. xanthii*, han mostrado una reducción significativa del desarrollo fúngico. Estos resultados sugieren que el gen *Ecm33* puede ser una diana prometedora para el control del oídio de las cucurbitáceas.

Este trabajo ha sido financiado por la AEI (PID2019-107464RB-C21). IPR agradece el contrato predoctoral PRE2020-093156 de la AEI.



# **SESION 9**

## **SCIENCE FLASHES**

### **S9.1 Mechanisms involved in plant microbiome assembly: from seeds to roots**

Hugo A. Pantigoso<sup>1</sup>, Simone van de Zande<sup>1</sup>, Juan E. Pérez-Jaramillo<sup>2</sup>, Jos M. Raaijmakers<sup>1,3</sup>  
Victor J. Carrión<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333 BE, Leiden, The Netherlands.

<sup>2</sup>PECET, Universidad de Antioquia, calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), P.O. Box 50, 6708 PB Wageningen, The Netherlands.

<sup>4</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Málaga, Spain

Plants have a significant influence on the diversity and activity of soil microbial communities. During germination, plant seeds release exudates promoting microbial activity in the spermosphere, the zone surrounding the seed. To date, little is known about the diversity and activities of microbial communities in the spermosphere. Here, we deciphered the spermosphere effect for two different crops, tomato and bean. More specifically, we investigated if a plant genotype-dependent influence is discernible in the spermosphere and to what extent the spermosphere microbiome affects the rhizosphere microbiome. We selected wild and modern accessions of tomato and common bean for which strong differences in the rhizosphere microbiome were found in previous studies. Community profiling revealed a decrease of  $\alpha$ -diversity of all plant accessions as compared to the bulk soil. Similarly, differences in the  $\beta$ -diversity was observed between bean accessions and bulk soil. Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria were significantly more abundant in the spermosphere. Albeit small, significant differences in the  $\beta$ -diversity were detected between wild and modern plant accessions, suggesting a plant genotype-dependent effect already at this early developmental stage. If and how seed exudates drive the differences in spermosphere communities between the wild and modern plant accessions will be presented.

## **S9.2 The suppressive soil microbiome: toward a global meta-analysis to identify keystone taxa & functions for plant protection**

Kevin M. Bretscher<sup>1,2</sup>, Xinya Pan<sup>1,2</sup>, Jos M. Raaijmakers<sup>1,2</sup>, Victor J. Carrión<sup>1,2,3</sup>

1. Institute of Biology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333 BE Leiden, Netherlands
2. Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Droevendaalsesteeg 10 6708 PB Wageningen, Netherlands
3. Departamento de Microbiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Málaga, Spain.

Some soils occur naturally suppressive to fungal root diseases and provide microbiome-mediated protection due to the antagonistic activities against the pathogens. The plant microbiome studies on disease-suppressive soils have generated a large amount of sequencing data, and shed light on taxonomic diversity of these protective microbial communities. Several studies described key microbial taxa and the underlying mechanisms that contribute to the suppressiveness of specific pathogens. However, many questions regarding the disease suppression phenomenon still remain unanswered, i.e., is there a “core” disease suppressive microbiome? Are common functions enriched across disease suppressive soils regardless of the taxa recruited by the plant and the pathogen present?

In this study, we will perform a comparative metagenomic analysis of disease-suppressive soils encompassing a variety of crops and fungal pathogens. 16S rRNA amplicon sequencing datasets were retrieved from different databases and analyzed to decipher the taxonomic compositions of root associated microbiomes in soils suppressive or conducive to various fungal plant diseases. Using metagenome and/or metatranscriptome analyses, we are currently investigating enzymatic activities and secondary metabolic capacities of bacterial taxa in disease suppressive microbiomes. We aim to (I) investigate whether disease-suppressive and conducive soils from different studies share common patterns in microbiome composition and (II) identify enriched microbial functions and taxa in disease-suppressive soils. These findings will open new avenues to engineer a plant protective microbiome, an emerging strategy to control outbreaks of fungal pathogens and thus contribute to plant health.

### **S9.3 Efecto de prácticas de manejo ecológicas en la biodiversidad microbiana del suelo en ecosistemas agrícolas.**

Sandra Tienda Serrano <sup>1,2</sup>, Víctor Carrión Bravo <sup>1,2</sup>, Javier Peris <sup>3</sup>, José Antonio Gutiérrez Barranquero <sup>1,2</sup>, Francisco M. Cazorla López <sup>1,2</sup>

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

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

3 Syngenta Crop Protection, Basel (Switzerland)

Esta investigación se está realizando en el marco del proyecto internacional LivinGro®, impulsado por Syngenta. Nuestro trabajo forma parte del estudio de los efectos de diferentes prácticas de manejo sobre la biodiversidad microbiana del suelo en diferentes ecosistemas agrícolas. Éste estudio se lleva a cabo sobre parcelas comerciales de frutales de hueso (melocotón, albaricoque, nectarina y ciruela) y olivos, situadas en diferentes zonas geográficas de España. Mediante secuenciación de las regiones 16S rDNA e ITS, se realizaron estudios de biodiversidad microbiana, estimando la abundancia relativa de microorganismos procariotas y eucariotas. Se analizó la alfa y beta diversidad y se propusieron posibles indicadores microbianos específicos de campo y del manejo del suelo. Nuestros primeros resultados apuntan a que los sistemas de riego en los árboles en estudio son los que tienen un mayor efecto sobre la diversidad microbiana. Sin embargo, también se observó que algunas de las prácticas de manejo utilizadas podrían tener un efecto sobre el microbioma del suelo agrícola, reflejado por el aumento de la abundancia relativa de algunos géneros microbianos específicos que según la bibliografía podrían tener un papel potencialmente beneficioso para el suelo y las plantas.

#### **S9.4 Soil microbiome Management by plant-soil Feedback for suppressive insect pests in tomato**

Guadalupe Zitalpopoca Hernández, Pablo M. Rodríguez Blanco, Iván M. Fernández López, Ainhoa Martínez Medina

Grupo de Interacción Planta-Microorganismo, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca IRNASA-CSIC

Beneficial soil microorganisms have been successfully applied in agricultural settings for suppressing insect pests as an alternative to polluting pesticides. However, inconsistent or moderate results in the field are common, evidencing important challenges in their implementation. Indeed, most of the current microbial-based approaches are focused on the effect of a limited number of microbial strains, which is in contrast to the astonishing taxonomic diversity in soils. An exciting alternative approach for overcoming this challenge is to focus on the residing whole microbiomes. Recently, several studies are demonstrating that steering the native soil microbiome via Plant-Soil Feedbacks (PSF), holds a high potential for promoting plant health. In this study, applied the concept of PSF for managing the soil microbiome with the aim of inducing tomato resistance to pests. We steered the soil microbiome from a natural soil from the dehesa ecosystem by using four different pasture grasses, and a mixed community. Later we inoculated tomato plants with the generated microbiome inoculants, and assessed their impact on tomato growth and resistance to the insect pest *Spodoptera exigua*. Our study provides evidence that PSF effects influence tomato growth and pest resistance, and that this effect is highly dependent on the plant species used for steering the soil microbiome.

## **S9.5 Cooperación al Desarrollo para instaurar estudios de Microbiología de planta y suelo en áreas contaminadas de Argentina y Ecuador**

Jennifer Mesa-Marín<sup>1</sup>, Karina I. Paredes-Páliz<sup>2</sup>, Yanina L. Idaszkin<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Chimborazo, Ecuador

<sup>3</sup> Instituto Patagónico para el Estudio de los Ecosistemas Continentales (IPEEC – CENPAT – CONICET), Puerto Madryn, Chubut, Argentina

<sup>4</sup> Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto

Madryn, Chubut, Argentina

Personal investigador de la Universidad de Sevilla se desplazó hasta Argentina y Ecuador para realizar trabajos en terreno amparados por convocatorias de Proyectos de Cooperación al Desarrollo, con el fin de fortalecer las estructuras investigadoras de los centros de destino y especializar al PDI del mismo en Microbiología de plantas y suelos contaminados.

En Argentina, describimos por primera vez las comunidades microbianas de suelo de las marismas patagónicas de San Antonio, contaminadas por la presencia de minas. La mitad de las cepas aisladas mostró propiedades promotoras del crecimiento vegetal, siendo la más abundante la producción de sideróforos. Las cepas que presentaron más propiedades fueron las de la zona más contaminada de la marisma y, en concreto, las de la rizosfera de la halófito *Spartina densiflora*. Además, un estudio metagenómico desveló la abundancia y diversidad taxonómica de especies bacterianas del suelo de esta marisma, y que estas se rigen por la contaminación, por encima de las especies vegetales dominantes.

En Ecuador, se ha llevado a cabo un estudio de suelo en la parroquia San Juan, un área agrícola contaminada debido a acciones humanas, como el abuso de pesticidas y fertilizantes, el vertido de basura a los ríos y la actividad de una fábrica de cemento. Se está caracterizando por primera vez el papel de las comunidades microbianas en suelo y rizosfera de la planta nativa *Cortaderia nitida*.

## **S9.6 What makes an endophyte an endophyte?**

María Negre<sup>1</sup>, Adrian Pintado<sup>1,2</sup>, Xinya Pan<sup>1,3</sup>, Guillermo Guerrero-Egido<sup>1,3</sup>, Victor Carrión<sup>1,2,3</sup>.

1 Institute of Biology, Leiden University, Leiden, the Netherlands.

2 Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Área de Genética, Facultad de Ciencias, 29010, Málaga, Spain

3 Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Wageningen, the Netherlands.

All plants are inhabited internally by diverse microbial communities comprising bacteria, archaea, fungi, and even protist. These microorganisms with endophytic lifestyles can play crucial roles in plant development, growth and protection against (a)biotic stress. The nature of plant-endophyte interactions ranges from mutualism to pathogenicity. This depends on a set of factors, including the plant genotype and microbes, environmental conditions, and the dynamic network of interactions within the plant biome. In our group we have recently developed a bioinformatic tool, MicroLife, to explore large-scale genomic datasets and perform a deep comparative genomic analysis, that predicts the different bacterial lifestyles identifying specific genes and Biosynthetic Gene Clusters that are directly related to a specific lifestyles. Here, using MicroLife and combined with molecular and microbial techniques we are trying to answer the question what makes an endophyte an endophyte. As a model, we have studied the endophytic behaviour of *Pseudomonas* strains and predicted the putative genes, such as the *pga* operon or the PTS system, involved in endophytic lifestyle. A targeted mutagenesis was carried out in these genes and colonisation assays were performed to determine their involvement in endophytic lifestyle. In addition, a tagged wild-type and mutant strains with the fluorescent protein mCherry was generated to study their localization.

### **S9.7 *Diaporthe* species associated with the maritime grass *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* and their interaction with agricultural crops**

Rufin Marie Kouipou Toghueo, Beatriz R. Vázquez de Aldana, Eric C. Pereira, Iñigo Zabalgozcoa

Plant-Microorganism Interaction Research Group, Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Spain.

*Festuca rubra* subsp. *pruinosa* is a halophytic perennial grass growing in rock fissures in sea cliffs in absence of soil, and highly exposed to salinity and marine winds. The culturable root microbiome of this plant is complex, composed of 135 different endophytic fungal taxa among which *Diaporthe* is one of its most abundant components occurring in more than 50% of the plants and all locations analyzed. The characterization of these *Diaporthe* isolates using multilocus DNA sequence data of five genes revealed two new species named *Diaporthe atlantica* and *Diaporthe iberica*. The most abundant taxon was *D. atlantica*, a species closely related to *D. sclerotioides*, a well-known pathogen of cucurbits. *Diaporthe iberica* is multihost, also isolated from roots of *Celtica gigantea*, another grass species growing in semiarid inland habitats. An *in vitro* biochemical characterization showed that all cultures of *D. atlantica* produced indole-3-acetic acid and ammonium, and *D. iberica* produced indole-3-acetic acid, ammonium, siderophores, and cellulase. In greenhouse experiments, *D. atlantica* and *D. iberica* caused a significant plant growth reduction when inoculated in cucumber, melon, and watermelon without causing any plant lesions, as reported for black root rot disease caused by *D. sclerotioides* on these crops. However, both *Diaporthe* species improved the growth and salinity tolerance of the agricultural grasses, tritordeum and perennial ryegrass. Moreover, *D. atlantica* improved the growth and drought stress tolerance of tomato plants while *D. iberica* promoted the growth of *Festuca rubra*.



### **S9.8 Identificación y caracterización de un dipéptido cíclico con actividad nematocida y fungicida producido por el agente de biocontrol *Bacillus velezensis* UMAF6639**

David Vela-Corcía, Jesús Hierrezuelo, Alicia Pérez-Lorente, Antonio de Vicente, Alejandro Pérez García, Diego Romero.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071, Málaga.

E-mail: [dvela@uma.es](mailto:dvela@uma.es)/[diego\\_romero@uma.es](mailto:diego_romero@uma.es)

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

El empleo de bacterias beneficiosas para combatir enfermedades de plantas ha cobrado gran importancia en las últimas décadas. En estudios previos demostramos que la cepa de *Bacillus velezensis* UMAF6639 es un excelente agente de biocontrol contra enfermedades fúngicas y bacterianas de las cucurbitáceas. Resultados preliminares indicaron que también podría ser efectiva contra nematodos parásitos de plantas. Sin embargo, se desconocen las moléculas que median esta actividad.

En este trabajo hemos llevado a cabo la identificación, caracterización y descripción del modo de acción de un dipéptido cíclico producido por *Bacillus velezensis* UMAF6639 con actividad nematocida y fungicida capaz de alterar las características físicas de la membrana plasmática, claves en la fisiología y homeostasis de ambos patógenos.

## S9.9 Biosíntesis y regulación de los antifúngicos solanimicina y herbicolina A en fitobacterias

Miguel A. Matilla<sup>a</sup>, Rita E. Monson<sup>b</sup>, Jesús Martín<sup>c</sup>, Cristina Lomas-Martínez<sup>a</sup>, Miriam Rico-Jiménez<sup>a</sup>, Fernando Reyes<sup>c</sup>, Finian Leeper<sup>d</sup>, George P. C. Salmond<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Environmental Protection and Biotechnology, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain; <sup>b</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; <sup>c</sup>Fundación MEDINA, Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, Granada, Spain; <sup>d</sup>Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

A nivel global, se estima que los organismos fitopatógenos son responsables de provocar pérdidas de hasta el 40% en las cosechas; un hecho que constituye una notable amenaza para la productividad agrícola y la salud alimentaria. En este contexto, se necesitan nuevas estrategias para el (bio)control eficaz de fitopatógenos. Entre estas aproximaciones, las bacterias asociadas a plantas representan una fuente potencial de nuevos metabolitos secundarios bioactivos que podrían explotarse en estrategias de agricultura sostenible. Nuestras investigaciones se centran en el estudio de la biosíntesis y regulación de distintos antibióticos sintetizados por fitobacterias. Durante la caracterización de cepas mutantes deficientes en la producción del antifúngico oocidina A en el fitopatógeno de patata *Dickeya solani*, se observó que estos mutantes mantenían unas propiedades antifúngicas elevadas. La combinación de aproximaciones multidisciplinares nos permitió determinar que *D. solani* produce solanimicina; un nuevo antifúngico eficiente frente a un amplio espectro de hongos fitopatógenos. A nivel transcripcional, la expresión del conjunto génico solanimicina está regulada por dos sistemas de “quorum sensing”, mientras que a nivel post-transcripcional el regulador RsmA juega un papel clave. La producción de solanimicina se induce a pH ácido; condiciones presentes en los tubérculos de patata (1). Asimismo, durante la caracterización de las propiedades antifúngicas de un aislado rizosférico de la especie *Pantoea agglomerans*, se evidenció que produce el antifúngico herbicolina A. La expresión del conjunto génico herbicolina A es máxima en la fase estacionaria de crecimiento y nuestras investigaciones demostraron que “quorum sensing” también regula la síntesis de este antifúngico (2).

### Referencias

- (1) Miguel A. Matilla\*, Rita E. Monson, Annabel Murphy, Muriel Schicketanz, Alison Rawlinson, Caia Duncan, Juan Mata, Finian Leeper, George P.C. Salmond\* (2022) Solanimycin: Biosynthesis and Distribution of a New Antifungal Antibiotic Regulated by Two Quorum-Sensing Systems. *mBio*. In press. doi: 10.1128/mbio.02472-22. \*Corresponding authors.
- (2) Miguel A. Matilla\*, Terry J. Evans, Jesús Martín, Zulema Udaondo, Cristina Lomas-Martínez, Miriam Rico-Jiménez, Fernando Reyes, George P.C. Salmond\* (2022) Herbicolin A production and its modulation by quorum sensing in a *Pantoea agglomerans* rhizobacterium bioactive against a broad spectrum of plant-pathogenic fungi. *Microbial biotechnology*. In press. doi: 10.1111/1751-7915.14193. \*Corresponding authors.

**Agradecimientos:** Este trabajo está financiado por un proyecto del Plan Estatal del Ministerio de Ciencia e Innovación/Agencia Estatal de Investigación (PID2019-103972GA-I00) a MAM. CLM es portadora de un contrato de garantía juvenil de la Secretaría General de Universidades, Investigación y Tecnología de la Junta de Andalucía” (AND21\_EEZ\_M2\_044).

### **S9.10 Caracterización de quimiorreceptores de *Dickeya dadantii* 3937 implicados en la percepción de compuestos derivados de glicanos**

Nicolás Raho, Clara Gálvez-Roldán, José J. Rodríguez-Herva, Emilia López-Solanilla

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (INIA-CSIC), Parque Científico y Tecnológico de la UPM, 28223-Pozuelo de Alarcón, Madrid, España

*Dickeya dadantii* 3937 (Dd3937) es una bacteria necrótrfica Gram-negativa que provoca la enfermedad de la podredumbre blanda en una amplia gama de cultivos de alta importancia económica. Este síntoma es generado por un conjunto de enzimas bacterianas secretadas capaces de degradar los polisacáridos de la pared celular vegetal. Este suele ser el lugar inicial de encuentro entre las plantas y sus patógenos microbianos y la producción de estos compuestos de degradación regula diversos procesos biológicos.

Resultados previos obtenidos en nuestro grupo han revelado la presencia de al menos dos quimiorreceptores implicados en la percepción de xilosa. La descripción de su papel relativo en este proceso, indica que las actividades de las enzimas pectolíticas de degradación de la pared son las responsables de la generación de gradientes de quimioefectores que activan quimiorreceptores bacterianos con distintas constantes de afinidad por estos compuestos.

En esta línea, también se está analizando el reconocimiento por parte de Dd3937 de otros compuestos liberados por las plantas en respuesta a la infección por patógenos. De especial interés son distintos compuestos derivados de la degradación de la pectina que tienen un doble papel al funcionar tanto como moléculas de alerta que desencadenan respuestas de defensa en la planta (patrones moleculares asociados a daño o DAMPs) como de quimioatrayentes para las bacterias fitopatógenas. Concretamente, se analizarán los mecanismos de percepción de distintos oligalacturonidos de bajo peso molecular (galacturonato y digalacturonato) por parte de Dd3937.

La identificación de los quimiorreceptores implicados en el reconocimiento de los ligandos mencionados anteriormente permitirá generar cepas mutantes para analizar con mayor profundidad el papel de los mismos en la eficiencia de la colonización, entrada y virulencia de Dd3937 en su planta huésped.

### **S9.11 Expresión génica de *Xanthomonas arboricola* en diferentes condiciones de nutrientes**

Pilar Sabuquillo Castrillo, Laura Hernández-Escribano, Jaime Cubero Dabrio.

Filiación: Grupo de Bacteriología, Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC).

*Xanthomonas arboricola* es una especie bacteriana que comprende al menos 9 patovares entre los que se encuentran pruni (Xap), juglandis (Xaj) y corylina (Xac), que representan tres patovares muy similares filogenéticamente pero diferenciados a nivel infraespecífico en base a la gama de huésped. Xap, Xac y Xaj son considerados los económicamente más importantes dentro de la especie debido a las enfermedades que provocan en cultivos importantes como los frutales de hueso y almendro (Xap), avellano (Xac) y nogal (Xaj). Xap y Xac están considerados oficialmente como patógenos regulados no cuarentenarios aunque figuran como patógenos de cuarentena en las lista A2 de la EPPO.

El establecimiento y desarrollo de las enfermedades producidas por estos agentes patógenos está fuertemente afectada por las condiciones agroclimáticas, prácticas de cultivo y la susceptibilidad del huésped. Todos estos factores pueden influir en el comportamiento de las bacterias y en sus patrones de expresión génica, la cual puede ser evaluada en profundidad gracias a la secuenciación y disponibilidad de genomas secuenciados de los tres patovares y al avance de herramientas bioinformáticas.

En esta comunicación se presentarán los resultados más relevantes obtenidos a partir de ensayos dirigidos a determinar el efecto de dos medios de cultivo, uno con alta concentración de nutrientes y otro que simula condiciones de apoplasto, en la expresión génica de los patovares Xap, Xac y Xaj. Estos estudios nos permitirán ahondar en el conocimiento de la interacción planta patógeno y desarrollar estrategias de control más eficaces de las enfermedades que producen.

### S9.12 Identification of broad-spectrum quantitative disease resistance loci in oilseed rape (*Brassica napus*) using association transcriptomics

Catherine N. Jacott<sup>1,2</sup>, Henk-jan Schoonbeek<sup>2</sup>, Burkhard Steuernagel<sup>3</sup>, Rachel Kirby<sup>2</sup>, Xiaorong Zheng<sup>4</sup>, Andreas von Tiedermann<sup>4</sup>, Violetta K. Macioszek<sup>5</sup>, Andrzej K. Kononowicz<sup>6</sup>, Heather Fell<sup>7</sup>, Bruce D.L. Fitt<sup>7</sup>, Georgia K. Mitrousis<sup>7</sup>, Henrik U Stotz<sup>7</sup>, Christopher J. Ridout<sup>2</sup>, Rachel Wells<sup>2</sup>

1. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
2. Crop Genetics Department, John Innes Centre, Norwich Research Park, UK
3. Computational and Systems Biology Department, John Innes Centre, Norwich Research Park, UK
4. Department of Crop Sciences, Georg August University, Göttingen, Germany
5. Department of Biology and Plant Ecology, Faculty of Biology, University of Bialystok, Poland
6. Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland
7. Centre for Agriculture, Food and Environmental Management Research, School of Life and Medical Sciences, University of Hertfordshire, UK

Crops are affected by several pathogens, but these are rarely studied in parallel to identify common and unique genetic factors controlling susceptibility to diseases. Broad-spectrum **quantitative disease resistance (QDR)** is desirable for crop breeding as it confers resistance to several pathogen species.

Here, we use **association transcriptomics (AT)**—**Genome-wide association (GWAS)** analyses combined with **gene expression marker (GEM)** analyses—to identify candidate gene loci associated with *Brassica napus* QDR to four fungal pathogens with contrasting infection strategies: *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Pyrenopeziza brassicae*, and *Verticillium longisporum*.

We observed broad-spectrum QDR dependent on the lifestyle of the fungal pathogen—**hemibiotrophic and necrotrophic pathogens had distinct QDR responses and associated loci**—suggesting potential trade-offs associated with such loci. In addition, we identify a novel region associated with resistance to *V. longisporum* containing only five potential causal gene candidates.

This is the first time AT has been used simultaneously for several pathosystems to identify loci involved in broad-spectrum QDR. As interesting candidates for crop breeding, we highlight candidate loci for broad-spectrum QDR with no antagonistic effects on susceptibility to other pathogens.

Organizan



Patrocinan

