

**XI Reunión del
Grupo Especializado
de Microbiología de Plantas
Granada. 19-21 de febrero de 2025
Programa y libro de resúmenes**



Organizan



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Microbiología
de Plantas
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
MICROBIOLOGÍA

Patrocina



Colabora



Presentación

El Grupo de Microbiología de Plantas (MiP) de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) fue creado con el objetivo de fomentar la comunicación y colaboración entre grupos de investigación dedicados al estudio de las interacciones entre plantas y microorganismos. Siguiendo estos principios, Granada toma el relevo de Nerja para acoger, del 19 al 21 de febrero de 2025, la XI Reunión del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas – MiP25.

Desde el Comité Organizador, hemos trabajado para diseñar un programa científico que refleje la diversidad y el dinamismo de este campo de investigación. La reunión contará con comunicaciones orales, charlas cortas y sesiones de pósteres que abordarán tanto avances fundamentales en el estudio de las interacciones planta-microorganismo como sus aplicaciones en agricultura, biotecnología y sostenibilidad ambiental.

Como en ediciones anteriores, se dará prioridad a la participación de jóvenes investigadores, fomentando su visibilidad y el intercambio de ideas con expertos consolidados en la materia.

Esperamos que la reunión MiP25 sea un espacio de aprendizaje, debate y generación de nuevas colaboraciones, y que los participantes disfrutéis tanto del contenido científico como del programa social, todo ello en el entorno único que ofrece la ciudad de Granada.

¡Bienvenidos a MiP25!

Comité Organizador y Científico

- Miguel A. Matilla, Departamento de Biotecnología y Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín (CSIC)
- Inmaculada Sampedro, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada
- Daniel Pérez Mendoza, Departamento de Microbiología del Suelo y la Planta, Estación Experimental del Zaidín (CSIC)
- Amalia Roca, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada

Programa MIP2025

Miércoles 19 de febrero

14:30-15:30 Registro (frente al Aula Magna)

15:30-16:00 Inauguración

Sesión 1: Genómica comparativa. Modera Esther Menéndez (Universidad de Salamanca)

Hora	Título	Ponente	Pág
16:00-16:15	Genomic insights into the Type VI Secretion Systems of <i>Burkholderia thailandensis</i> JBC02: implications for agricultural applications	Luis Angel Chicoma Rojas	O.01
16:15-16:30	Diversidad microbiana en árboles de aguacate: estudio de los cambios compartimentales y fenológicos en respuesta a enfermedades fúngicas	Marcos Pedraza Rubio	O.02
16:30-16:45	Leaf herbivory differentially reshapes rhizosphere microbiomes in sunflower and tomato resulting in distinct legacy effects	Pablo M. Rodríguez Blanco	O.03
16:45-17:00	Nexos simbióticos en ecosistemas forestales: Interacción planta-insecto-microbioma en <i>Ips typographus</i>	Zaki Saati Santamaría	O.04
17:00-17:15	Genómica comparativa para la selección de cepas de <i>Sinorhizobium</i> efectivas en bioremediación	Maria del Carmen Montero Calasanz	O.05
17:15-17:30	Comunidades bacterianas del rizoplaneo del trigo: estructura, funciones en colonización y formación de biofilms.	Mónica Majo-Cuervo	O.06
17:30-17:45	Modular automated high-throughput isolation and phylogenetic identification of bacteria from complex microbiomes	Ruben Chaboy	O.07

17:45-18:30 Pausa café y sesión de pósteres 1

Sesión 2: Biocontrol. Modera Paula García Fraile (Universidad de Salamanca)

Hora	Título	Ponente	Pág
18:30-18:45	Potencial de <i>Pseudomonas</i> sp. B22 como agente bioestimulante y de biocontrol en agricultura sostenible	Patricia Sánchez	O.08
18:45-19:00	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ST9 como medida de control biológico	Marina Pareja Valero	O.09
19:00-19:15	<i>Pseudomonas putida</i> membrane vesicles: a potential biocontrol tool?	Javier De la Peña Noya	O.10

19:15-19:30	Designing of a modular plasmid platform for T6SS mediated delivery of antibacterial and antifungal effectors	Mario Araujo-Garrido	O.11
19:30-19:45	Extracellular matrix-driven antagonism: <i>Bacillus</i> ECM manipulates <i>Botrytis</i> physiology and counterdefence	Alicia Isabel Pérez Lorente	O.12
19:45-20:00	Mycorrhizal fungi primes tomato indirect defenses against the pest <i>Tuta absoluta</i>	Juan Manuel Gacía Ramírez	O.13
21:00	Cóctel de bienvenida (Hotel Vincci Albaicín)		

Jueves 20 de febrero

Sesión 3: Tolerancia a estrés. Modera Juan Ignacio Vilchez (Instituto de Tecnología Química e Biológica - Lisboa)

Hora	Título	Ponente	Pág
8:30-8:45	The role of nitrate assimilation in the <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> -soybean symbiosis	Alba Hidalgo-García	O.14
8:45-9:00	Potential use and valorization of microalgae extracts from wastewater treatment as a biostimulant for beneficial soil microbiota	Ana Sofia Rodrigues dos Santos	O.15
9:00-9:15	Cork-immobilized plant growth promoting bacteria (PGPB) tolerant to high temperature as agrottools for ameliorating thermal stress in tomato	Eloísa Pajuelo Domínguez	O.16
9:15-9:30	Diseño y aplicación de bioinoculantes basados en la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. CDVBN10-B en cultivos de interés agrícola	Lihuén Iraí González Dominici	O.17
9:30-9:45	Adaptación al estrés salino y su transferencia: efectos de la preadaptación en <i>Bacillus megaterium</i> y su rol en la aclimatación de <i>Arabidopsis</i>	Antònia Romero Munar	O.18
9:45-10:00	Rhizosphere microbiome in quinoa: harnessing its potential to enhance nutritional quality and drought stress tolerance	María Reguera	O.19
10:00-10:15	Transcriptome changes induced by <i>Trichoderma</i> in leaf of wheat plants promote water stress tolerance	David Mendoza Salido	O.20
10:15-10:30	Deciphering the mechanisms of drought stress alleviation by <i>Pseudomonas</i> N122	Cristina Sarmiento Castañeda	O.21

10:30-11:15 Pausa café y sesión de pósteres 2

Sesión 4: Mecanismos moleculares I. Modera Pablo del Cerro (Universidad de Sevilla)

Hora	Título	Ponente	Pág
11:15-11:30	Chemotactic responses mediated by three chemoreceptors encoded in a gene cluster of the phytopathogen <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Roberta Genova	O.22
11:30-11:45	Mecanismos de la quimiotaxis a la acetilcolina en fitopatógenos bacterianos globales	Manuel Jesús Gilabert Ruíz	O.23
11:45-12:00	Caracterización funcional de los quimiorreceptores de tipo Aer en <i>Dickeya dadantii</i> 3937 y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000: taxis energética y su relevancia en la interacción planta-patógeno	Cristina L. Gómez-Campo	O.24
12:00-12:15	<i>Bacillus mycoides</i> as a shield for plant health against <i>Botrytis cinerea</i> .	Marta Orero Bayo	O.25

12:15-12:30	Cyclo(Pro-Tyr) induces cellular damage in fungi by targeting the [H ⁺] ATPase Pma1 within plasma membrane domains	David Vela-Corcia	O.26
12:45-13:00	Modelos metabólicos a escala genómica como herramienta para el estudio de la interacción <i>Podosphaera xanthii-Cucumis melo</i>	Alejandro Jimenez-Sanchez	O.27
13:00-13:15	Estudio del bucle regulatorio de la ruta Gac-Rsm de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Adriana Vásquez Rodríguez	O.28
13:15-13:30	Participation of FleN, HkmA, HdmA and HdmB in the regulation of <i>Pseudomonas ogarae</i> F113 motility and biofilm formation.	Laura Carrera Ruiz	O.29

13:30-15:30 Pausa almuerzo (Restaurante Los Manueles)

Sesión 5: Mecanismos moleculares II. Modera Carlos Medina Morillas (Universidad de Sevilla)

Hora	Título	Ponente	Pág
15:30-15:45	Unveiling the genetic secrets of MLG production: a mixed-linkage β -glucan essential for effective rhizobial colonization	Lucia Ruiz Sáez	O.30
15:45-16:00	New functions associated to RelA of <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Cristina Carvia-Hermoso	O.31
16:00-16:15	Cell cycle regulation by the <i>Sinorhizobium meliloti</i> small RNA NfeR1	Natalia I. García Tomsig	O.32
16:15-16:30	Understanding the molecular basis of <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103-soybean compatibility conferred by NopM effector	Ana María Cutiño Gobeia	O.33
16:30-16:45	Extracellular membrane vesicle-encapsulated Auxin Transporter (AuxT) enhances the symbiotic performance of <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	Natalia Moreno de Castro	O.34
16:45-17:00	Proteomic analysis of <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 reveals lalB as a potential effector in symbiosis with legumes	Irene Herrero Gómez	O.35

17:00-17:45 Pausa café y sesión de pósteres 3

Sesión 6: Mecanismos moleculares III. Modera Eva Arrebola Díez (Universidad de Málaga)

Hora	Título	Ponente	Pág
17:45-18:00	Identification and characterization of T6SS effectors in <i>Pseudomonas ogarae</i> f113	David Vázquez Arias	O.36
18:00-18:15	<i>Ralstonia solanacearum</i> genes required for soil survival and rhizosphere microbiome establishment	Mercedes Rocafort	O.37
18:15-18:30	Disentangling plant colonization at the genomic level	Marta Torres	O.38

18:30-18:45 Iniciación al estudio de la interacción entre el agente causal de la muerte regresiva y el aguacate Lucía Guirado O.39
Manzano

19:00-19:30 Asamblea General MIP

20:00-21:30 Visita guiada

21:30 Cena del Congreso (La Chumbera)

Viernes 21 de febrero

Sesión 7: Endofitos y factores de virulencia. Modera Juan Antonio López Raez (EEZ-CSIC)

Hora	Título	Ponente	Pág
9:00-9:15	<i>Burkholderia alba</i> is a new nodule endophyte of <i>Phaseolus vulgaris</i> that in consortium with <i>Rhizobium leucaenae</i> enhances nodule development and plant growth	Sara Pérez González	O.40
9:15-9:30	La inoculación de plantas de zarzamora con la bacteria endofítica <i>Rhizobium</i> sp. CRRU65 mejora el perfil fenólico de las moras y aumenta la producción del cultivo en condiciones de invernadero.	Rocío Roca Couso	O.41
9:30-9:45	Exploring the quinoa endophytic microbiome: possible implications for resilience and productivity under drought stress	Isaac Maestro-Gaitán	O.42
9:45-10:00	Rol de enzimas con actividad aldehído deshidrogenasa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en <i>Pseudomonas</i>	Adrián Pintado	O.43
10:00-10:15	<i>Pseudomonas syringae</i> lipopolysaccharide synthesis gene <i>wbpL</i> displays heterogeneous expression within <i>in vitro</i> and <i>in planta</i> populations	Laura Mancera-Miranda	O.44
10:15-10:30	Clonación y purificación de dominios de antígenos de <i>Xylella fastidiosa</i> ampliamente conservados en diferentes cepas, involucrados en viabilidad y formación de biofilm para el desarrollo de una terapia amplia frente al patógeno.	Gaspar Pérez Martínez	O.45

10:30-12:00 Pausa café y sesión de pósteres

Sesión 8: Flash talks. Modera María Concepción Sánchez Fernández (Misión Biológica de Galicia)

Hora	Título	Ponente	Pág
12:00-12:05	Effect of diesel contamination on bacterial populations in a pristine soil during rhizoremediation	Pieter van Dillewijn	O.46
12:05-12:10	Unveiling plant growth-promoting potential in <i>Gordonia</i> species through comparative genomics	Manel Z. Bellouti	O.47
12:10-12:15	Weaponizing CRISPR-Cas9-loaded nanoparticles for targeted antibacterial defence against plant pathogens	Alejandro Arce-Rodríguez	O.48
12:15-12:20	Interspecific plant interaction alters the tomato rhizosphere bacterial community and improves seedlings fitness	Muhammad Khashi u Rahman	O.49
12:20-12:25	<i>Bacillus halotolerans</i> B16: una alternativa microbiana para el control sostenible de plagas agrícolas	Amalia Roca Hernández	O.50

12:25-12:30	El potencial del desierto aplicado a la agricultura	Marina García-Gómez	0.51
12:30-12:35	Heat stress alters microbiota diversity and metabolite profiles in tomato plants: implications for microbial inheritance and plant resilience	Joana do Carmo Gomes	0.52
12:35-12:40	Arbuscular mycorrhizal fungi modulate the response of grape berry composition to climate change conditions	Daria Kozikova	0.53
12:40-12:45	Diversidad de hongos endófitos radiculares de colza (<i>Brassica napus</i>) y su relación con las condiciones edafoclimáticas y de manejo agrícola en la submeseta norte	Tamara Sánchez-Gómez	0.54
12:45-12:50	Molecular responses of chestnut to <i>Phytophthora cinnamomi</i> infection	Conchi Sánchez Fernández	0.55
12:50-12:55	Estrategias adaptativas de PGPR en la rizosfera	Manuel Espinosa-Urgel	0.56
12:55-13:00	Riborregulación en la simbiosis de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 con leguminosas	Francisco Fuentes Romero	0.57
13:00-13:05	Papel del diguanilato cíclico en la regulación de diversos procesos celulares en <i>Sinorhizobium fredii</i>	María del Carmen Sánchez Aguilar	0.58
13:05-13:10	Unravelling plant cellular targets for the <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 Type III Secretion System effector NopP	Diego García-Rodríguez	0.59
13:10-13:15	Plant communication in the rhizosphere: who is there, who is listening?	Juan Antonio López Ráez	0.60

13:15-13:30 Clausura MIP2025

13:30 Almuerzo (Escuela Superior de Arquitectura) y despedida

Sesiones de pósteres

Sesión de pósteres 1. Miércoles 19 de febrero de 17:45 a 18:30

Título	Autor de correspondencia	Pág
Diseño integrado de comunidades sintéticas bacterianas para la mejora de cultivos en rotación	Esther Menendez	P01
Harnessing soil microbiomes through plant-soil feedback to induce resistance against insect pests in tomato	Guadalupe Zitlalpopoca Hernandez	P04
Harnessing soybean genetic diversity to understand and enhance nitrogen-fixing symbiosis	Catherine Nancy Jacott	P11
Polyamines, new players in the microbe-induced pest resistance	Iván Manuel Fernández López	P14
Desarrollo de herramientas microbianas para control de cultivos estratégicos	Clara Izquierdo Jiménez	P17
Radisei: un caso de éxito en el uso de bacterias bioestimulantes en el mercado	Inmaculada del Castillo Madrigal	P19
<i>Trichoderma</i> isolates display different mechanisms to control <i>Fusarium</i> head blight on wheat plants	Alberto Pedrero-Méndez	P22
Valorización de residuos vegetales domésticos como agentes de control de bacterias fitopatógenas	Silvia Estarriaga	P24

Sesión de pósteres 2. Jueves 20 de febrero de 10:30 a 11:15

Título	Autor de correspondencia	Pág
Optimizing seed surface sterilization to study seedborne microbiota: enhancing maize resilience to drought stress	Inês Rebelo Romão	P02
Decoding the plant-microbe interactions of <i>Vreelandella</i> sp. in maize plants growth enhancement under salt-stress: an omics approach	André Sousa	P05
<i>Trichoderma</i> mediates wheat plant responses to water stress and rehydration	Julio Ascaso	P07
Selección de complejos leguminosa-rizobio-PGP con potencial para la fitoextracción de Cu y Zn de suelos contaminados.	José-María Barcia-Piedras	P09
Mejora de la capacidad de promoción del crecimiento mediante el uso de coproductos de la industria azucarera bajo condiciones de estrés salino en plantas de guisante	David Correa Galeote	P12
Levaduras, miles de años facilitando la vida al ser humano	Carlos Lucena	P15
Bacterias metanotrofas contra el estrés hídrico en plantas	Pamela Pacheco de la Cruz	P20

Análisis comparativo de la interacción de <i>Lotus corniculatus</i> con sus diferentes endosimbiontes en la provincia de Salamanca.	José David Flores Félix	P25
The essential role of the Type VI Secretion System of <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257 in the nodulation of <i>Glycine max</i> cv Pekin	Irene Jiménez Guerrero	P27
Las estrigolactonas actúan como moléculas señal en la interacción raíz-PGPR	Ricardo Aroca	P29
Interacción <i>Trichoderma</i> -garbanzo: inducción de respuestas hormonales y metabólicas sistémicas para el control eficaz de la rabia (<i>Ascochyta rabiei</i>)	Jorge Poveda	P31

Sesión de pósteres 3. Jueves 20 de febrero de 17:00 a 17:45

Título	Autor de correspondencia	Pág
Analysis of the type VI secretion system in pea nodulating rhizobia	Nassim Chafiqi	P03
Construction of a c-di-GMP biosensor for <i>Rhizobiaceae</i>	Pedro José Pacheco Márquez	P06
Efecto fisiológico de <i>Trichoderma</i> spp. en el cultivo de <i>Solanum lycopersicum</i>	Jorge Poveda Arias	P08
Migración de vesículas extracelulares de <i>Escherichia coli</i> a través del sistema vascular de plantas para su uso a nivel biotecnológico para el tratamiento de fitopatógenos	Rubén Izquierdo Fernández	P10
Phylogenetically related <i>Bacillus</i> species differentially modulate seed-driven metabolic reprogramming and adaptation of adult plants	María Luisa Carrégalo Ríos	P13
Symbiotic microorganisms meet medicinal plants: accident or arrangement?	Bo Zhu	P16
Extracellular vesicles facilitate communication between legume plants and rhizobia in nodules: protein trafficking analysis	Paula Ayala-García	P18
A novel ANL tomato transcription factor regulates mycorrhiza induced resistance	Beatriz Romero-Rodríguez	P21
La percepción de ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos en <i>Dickeya dadantii</i> 3937 está mediada por un quimiorreceptor monomodular con diferentes sitios de unión	Saray Santamaría-Hernando	P23
Developing bacterial AI-designed proteins to increase rhizobia-legume symbiotic compatibility	Raquel Thuss	P26
Estudio de las bases moleculares de la colonización de la rizosfera del aguacate utilizando la cepa modelo de control biológico <i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL1606	Ruiz-Muñoz Blanca	P28
Unraveling the role of antisense RNAs in the regulation of nitrogen fixation genes in <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Sabina K. Guedes García	P30

Key role of the <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> ClpAP1S1 chaperone-protease system in the abiotic stress response and in symbiosis	Socorro Mesa	P32
Identificación de una familia de quimiorreceptores para formato en bacterias de suelo y asociadas a plantas	Elizabet Monteagudo-Cascales	P33
Iron modulates the development and function of arbuscular mycorrhiza	Nuria Ferrol	P34
<i>Ralstonia solanacearum</i> genes expressed outside and inside of its plant hosts	Marc Valls	P35
Agua electrolizada en el control de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> y su efecto en parámetros de calidad del fruto	Emmeli Jacqueline Medrano Espinoej	P36

Comunicaciones orales

Genomic Insights into the Type VI Secretion Systems of *Burkholderia thailandensis* JBC02: Implications for Agricultural Applications

Luis Angel Chicoma Rojas^{1,2}, Bruna Fernanda Silva de Sousa², José Manuel Palacios^{2,3}, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos¹, Luis Rey^{2,3}

¹Laboratory of Microorganism and Plant Biochemistry, Department of Agricultural, Livestock and Environmental Biotechnology, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinary Sciences, Jaboticabal, São Paulo.

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

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

Contacto: luis.chicoma@unesp.br

The type VI secretion system (T6SS) injects effectors into target cells, playing key roles in bacterial competition, metal acquisition, and interactions with eukaryotic cells. T6SSs are common in *Burkholderia* species. This study aimed to describe the genomic features of T6SS genes in *Burkholderia thailandensis* JBC02, a promising biocontrol agent previously studied, and to compare them with those of other species. The JBC02 genome was sequenced and assembled into four contigs, with a total size of 6.72 Mb. The most closely related species is *B. thailandensis* E264, showing 99.99% ANI identity. Five T6SSs were identified in JBC02. Among these, T6SS-5 has been primarily associated with eukaryotic interactions (Lennings *et al.*, 2019), while the remaining systems are linked to antibacterial competition and metal transport. Regarding the effectors located within the clusters that act as antibacterial toxins, we identified Rhs toxins, which have been reported to act against insects. Interestingly, Pentapeptide-Repeat Proteins (PRPs) were found at the C-terminal region of the DUF2169 adaptor protein or encoded in close proximity within the T6SS-2 and T6SS-5 clusters; however, their specific functions remain unclear. Proteins associated with Fusaric Acid Resistance (FAR) were identified in T6SS-2 and T6SS-3. These proteins play a crucial role in developing biocontrol strategies against *Fusarium* spp. Considering the lifestyle of JBC02, which was isolated from agricultural soils where Mimosa species are present, we hypothesize that this strain could coexist with symbionts and utilize its T6SS systems for survival in competitive environments. The analysis of the T6SSs provides valuable information regarding possible effectors and their roles in rhizosphere dynamics.

Funding: MICINN-Spain PID2021-124344OBI00. LACR is supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education CAPES/PDS-Brazil.

Reference: Lennings, *et al.* (2019). The *Burkholderia* type VI secretion system 5: composition, regulation, and role in virulence. *Frontiers in microbiology*, 9, 3339.

Diversidad microbiana en árboles de aguacate: estudio de los cambios compartimentales y fenológicos en respuesta a enfermedades fúngicas

Marcos Pedraza Rubio, Víctor J. Carrion, Francisco M. Cazorla

Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga.

Contacto: mpedraza@uma.es

Las plantas albergan comunidades microbianas en distintos compartimentos, incluyendo la filosfera (superficies aéreas), la rizosfera (suelo que rodea las raíces) y la endosfera (tejidos internos). Estas comunidades microbianas pueden desempeñar importantes funciones en la salud de las plantas y su respuesta a enfermedades fúngicas.

En este estudio, caracterizamos la biodiversidad microbiana asociada con árboles de aguacate afectados por enfermedades fúngicas, específicamente la podredumbre blanca de la raíz causada por *Rosellinia necatrix* y el secado de ramas provocado por miembros de la familia *Botryosphaeria*. También analizamos las variaciones en estas comunidades entre los tres compartimentos mencionados y en dos etapas fenológicas (cuajado de fruto y fruto completamente maduro). Para lograrlo, realizamos un enfoque integral de metabarcoding, dirigido a las regiones 16S rRNA e ITS para perfilar comunidades bacterianas y fúngicas, respectivamente. Los análisis comparativos revelaron cambios significativos en la diversidad y composición microbiana entre los compartimentos, las etapas fenológicas y el estado de salud de los árboles, además de identificar taxones microbianos específicos asociados con ambas enfermedades fúngicas.

También generamos una colección bacteriana de 300 aislados derivados de los tres compartimentos de los árboles de aguacate. Mediante ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo*, identificamos varias cepas bacterianas con actividades fuertemente antagonistas contra *Botryosphaeria* spp. y *Rosellinia necatrix*, destacando el potencial de estos aislados como agentes de biocontrol. Nuestros hallazgos identificaron taxones específicos asociados con cada enfermedad fúngica en cada compartimento, así como cambios significativos en la composición microbiana durante las diferentes etapas fenológicas. Estos resultados resaltan el dinamismo en las interacciones entre los árboles de aguacate y su microbiota, proporcionando información clave para prácticas agrícolas sostenibles.

Este trabajo fue financiado por los proyectos TED2021-129369B-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación, España) y PROYEXCEL_00012 (Junta de Andalucía, España).

Leaf herbivory differentially reshapes rhizosphere microbiomes in sunflower and tomato resulting in distinct legacy effects

Pablo M. Rodríguez Blanco^{1,2}, Guadalupe Zitlalpopoca Hernández², María Gloria González Holgado¹
Iván Manuel Fernández López², Adam Ossowicki^{3,4}, Víctor J. Carrión⁴, Lorena Carro⁵, Ainhoa Martínez
Medina²

¹Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca.

²Molecular Agroecology Laboratory (MOLECOLAB), Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

³Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga.

⁴Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científica (IHSM-UMA-CSIC).

⁵Microbiology and Genetics Department, University of Salamanca.

Contacto: pablo.rodriguez@irnasa.csic.es

Plants shape their rhizosphere microbiomes by selecting different microbial taxa from the soil via root exudation. While root exudates' composition is largely determined by plant genotype, it is also influenced by environmental factors. For instance, recent studies show that pathogen or herbivore attack can trigger significant shifts in rhizosphere microbiome assembly, probably caused by changes in root exudate patterns. These alterations in the rhizosphere microbiome can lead to specific legacy effects in a next generation of plants. Although these effects are increasingly recognized, the impact of foliar herbivory on rhizosphere microbiome assembly and functioning remain understudied; and legacy effects of herbivory-driven microbiomes in plant fitness are unclear. In this study, we aimed to explore whether and to what extent leaf herbivory triggers changes in the rhizosphere microbiome; and the legacy effects of herbivory-driven rhizosphere microbiomes on plant defence phenotypes. To that end, we conditioned natural soil with two different crops, tomato (*Solanum lycopersicum*) or sunflower (*Helianthus annuus*), with or without infestation by the caterpillar *Spodoptera exigua*. Rhizosphere microbiome alterations were analysed by a combined metabarcoding and metagenomic approach. We found that plant genotype was the primary driving factor of the microbiome assembly at taxonomical and functional level. Interestingly, the effects of herbivory are more pronounced in the bacterial communities, compared to the fungal communities. We further tested the legacy effects of the herbivory-driven microbiomes in a subsequent next generation of plants. Notably, in sunflower, herbivory-driven microbiome enhanced plant tolerance to herbivory. Overall, we conclude that leaf herbivory induces significant changes in rhizosphere microbiome composition and functionality, generating legacy effects that can enhance the defence phenotype. Still, such effects are highly dependent on the specific crop species.

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

Nexos simbióticos en ecosistemas forestales: Interacción planta-insecto-microbioma en *Ips typographus*

Zaki Saati-Santamaría¹, Martin Kostovčík¹, Tereza Veselská¹, Karel Švec¹, Ezequiel Peral-Aranega², Lihúén Iraí González-Dominici², Paula García-Fraile², Miroslav Kolařík¹

¹Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences.

²Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) y Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

Contacto: zakisaati@usal.es

La simbiosis microbiana desempeña un papel crucial en los procesos ecológicos y evolutivos, facilitando la adaptación de los organismos hospedadores a entornos complejos y desafiantes. Aunque se han realizado numerosos estudios sobre la composición taxonómica de los microbiomas, los mecanismos que sustentan la integración funcional y la cooperación metabólica dentro de los holobiontes todavía presentan aspectos poco comprendidos. El escarabajo de la corteza del abeto europeo (*Ips typographus*) es una de las plagas más destructivas de los bosques europeos, cuyo éxito depende de una red compleja de interacciones entre el insecto, su microbioma y su planta hospedadora. En este estudio utilizamos como modelo el este sistema para profundizar en las interdependencias metabólicas que sustentan las interacciones planta-microbioma-insecto. El trabajo profundiza en el papel del microbioma en el éxito adaptativo del escarabajo, con especial énfasis en la obtención de nutrientes y la protección frente a patógenos. Mediante técnicas de cultivo y análisis independientes de cultivo, hemos identificado taxones clave responsables de la degradación de polisacáridos vegetales y de la inhibición de hongos entomopatógenos. Estas funciones sugieren que los simbiosis microbianos no solo compensan las limitaciones metabólicas del escarabajo, sino que también le confieren importantes ventajas adaptativas. Además, los análisis meta-transcriptómicos han revelado una cooperación metabólica activa entre bacterias y hongos del microbioma, facilitando la biosíntesis de nutrientes esenciales como aminoácidos y vitaminas. Estos resultados destacan el papel central de las interacciones simbióticas en la ecología del escarabajo y abren nuevas perspectivas para el uso funcional del microbioma en la conservación y manejo de ecosistemas forestales. En conjunto, este enfoque integrado proporciona una comprensión más profunda de la dinámica planta-microbioma-insecto y su impacto en sistemas naturales.

Genómica comparativa para la selección de cepas de *Sinorhizobium* efectivas en bioremediación

Maria del Carmen Montero-Calasanz¹, Jose Maria Barcia-Piedras¹, Maria Teresa Cubo², Maria Rosario Espuny², Maria Camacho¹

¹Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica - IFAPA Las Torres. Junta de Andalucía.

²Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

Contacto: mariac.montero.calasanz@juntadeandalucia.es

Más del 6,24% de la superficie agrícola europea presenta problemas de toxicidad. El fitogestión de suelos contaminados se postula como una solución factible y alineada con los principios de la economía circular. En este sentido, se ha demostrado que las especies del género *Medicago* (Leguminosae, Fabaceae) son candidatas ideales para la fitogestión, gracias a su moderado potencial fitoextractivo, su rápido crecimiento, su gran adaptabilidad a entornos estresantes, su capacidad para crecer en suelos contaminados y, por supuesto, su habilidad para establecer una relación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno. No obstante, la contaminación por metales pesados puede afectar gravemente la simbiosis entre la alfalfa y el rizobio. Por lo tanto, es necesario seleccionar simbioses bien adaptados para maximizar los beneficios del uso de la alfalfa en la remediación de sitios contaminados.

En este trabajo se analizaron 21 genomas de *Sinorhizobium* sp. con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen bajo su tolerancia al estrés. Nuestros resultados revelaron diferencias genómicas significativas entre los miembros del género en relación con los sistemas de adaptación a estrés y detoxificación, que podrían influir claramente en su efectividad en bioremediación. A nivel de especie, las cepas de *Sinorhizobium medicae* presentaron una alta homogeneidad en el repertorio de genes involucrados en bioremediación, independientemente de su origen de aislamiento. A pesar de tal homogeneidad, nuestros resultados experimentales demostraron que la tolerancia a metales pesados varía entre cepas, lo que sugiere que la especificidad simbiótica rizobio-planta, junto con pequeñas diferencias a nivel genómico en mecanismos de adaptación a estrés y detoxificación, podrían estar marcando distintos niveles de tolerancia a metales pesados.

Funding: Este trabajo fue financiado por TED2021-130122B-I00/ AEI/10.13039/501100011033/ Unión Europea NextGenerationEU/PRTR. MdCMC agradece la financiación recibida a través de la Beca de Investigación Ramón y Cajal (RYC2019-028468-I) del MCIN.

Comunidades bacterianas del rizoplasma del trigo: estructura, funciones en colonización y formación de biofilms

Mónica Majo-Cuervo^{1,2}, Valeria Hidalgo-Carchi¹, Zaki Saati-Santamaría³, Paula García-Fraile^{1,2,4}, George C. diCenzo⁵, Esther Menéndez^{1,2,4}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

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

³Instituto de Microbiología de la Academia Checa de Ciencias, Praga.

⁴Unidad Asociada de Investigación en Interacción Planta-Microorganismo, USAL-CSIC (IRNASA), Salamanca.

⁵Departamento de Biología, Queen's University.

Contacto: monicamajo@usal.es

Los biofilms del rizoplasma mejoran el crecimiento vegetal protegiendo a los microorganismos beneficiosos de factores ambientales extremos, facilitan la absorción de nutrientes, fijar nitrógeno, producir hormonas y proteger contra patógenos. Este estudio tiene como objetivo analizar la composición y dinámica de las comunidades bacterianas en las etapas iniciales de formación de biofilms en el rizoplasma del trigo.

Se diseñó un experimento de "planta trampa" utilizando trigo como planta modelo, cultivando dos variedades en suelos con y sin historial de cultivo previo de trigo, incluyendo uno contaminado con metales pesados. Los análisis se realizaron en dos tiempos (recolección a los 15 y 30 días del ensayo) para evaluar la dinámica de las comunidades bacterianas. Los resultados mostraron una comunidad bacteriana diversa en el rizoplasma, con diferencias significativas según el tipo de suelo y el tiempo de recolección. No se observaron diferencias relacionadas con las variedades de trigo utilizadas. Las comunidades bacterianas mostraron variaciones a lo largo del tiempo: los géneros *Acinetobacter* y *Pantoea* se asociaron a la condición de los 15 días, mientras que a los 30 días se relacionaron *Exiguobacterium* y *Asticcacaulis*. Posteriormente, se realizaron aislamientos seleccionando los taxones pertenecientes al bacterioma core, los géneros presentes en todas las muestras. Secuenciamos el genoma completo de 88 cepas, realizando una búsqueda de genes relacionados con la colonización y formación de biofilms. Mediante microscopía de fluorescencia, se confirmó que algunos de estos aislados colonizan y forman biofilms en el rizoplasma en condiciones axénicas. Estos hallazgos se emplearán en el diseño de bioinoculantes basados en comunidades bacterianas complejas, optimizando su efectividad en campo mediante enfoques *in silico* e *in vitro*, y proporcionando una base para futuros experimentos.

Financiación y agradecimientos: Este trabajo está financiado por el proyecto PID2022-138373NA-I00 (EM) y FPI PRE2023-138373 (MMC), financiadas por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "FSE+Una manera de hacer Europa".

Modular automated high-throughput isolation and phylogenetic identification of bacteria from complex microbiomes

Rubén Chaboy-Cansado, Silvia Talavera-Marcos, Ramón Gallego-Simón, Paula Cobeta, Gabriel Roscales, Alberto Rastrojo, Daniel Aguirre de Cárcer

Universidad Autónoma de Madrid

Contacto: ruben.chaboy@uam.es

The production of microbiome-representative culture collections through non-targeted microbial isolation is commonly carried out using plating on different solid media formulations and identifying selected colonies using Sanger sequencing of 16S rRNA genes. A higher throughput can be attained by pre-filtering selected colonies using MALDI-TOF, an approach termed Culturomics. However, these approaches present pitfalls; many strains may not be able to grow on solid media, and fast-growing bacteria may inhibit slow-growing ones, thus biasing the sampling effort towards fast growers. The common solution of picking colonies at different time points is laborious and time-consuming. Sanger sequencing is expensive when considering increasing numbers of isolates and is inefficient at detecting contamination or co-isolation. Also, the research group may not have access to (or experience with) a MALDI-TOF spectrometer. Finally, often researchers will select colonies with different morphologies to enhance the total diversity of their culture collection, yet this is a detrimental approach when considering representativity; colonies with different morphologies are likely to pinpoint different underlying genomes, but most genomic diversity in a community will be present in a reduced number of shared morphology phenotypes.

Taking these pitfalls into consideration, Zhang *et al.* provided a high-throughput protocol that can be performed using common laboratory equipment, avoids the issues related to colony-picking, and uses high-throughput sequencing of barcoded samples to streamline the process (*Nature Protocols*, 2021;16(2):988-1012). We present a pipeline grounded on their use of the limiting dilution method using multi-well plates and barcoded sequencing, but enhance it (reduced costs and increased throughput) by employing 384-well plates, the use of an optical plate reader available to most labs, and the possibility of using MinION sequencing. Furthermore, we offer modularity by proposing different protocols and possibilities along the pipeline and all scripts required for process automation using an inexpensive pipetting robot.

Potencial de *Pseudomonas* sp. B22 como agente bioestimulante y de biocontrol en agricultura sostenible

Patricia Sánchez¹, Inés Castillo¹, Fernando Martínez-Checa^{1,2}, Inmaculada Sampedro^{1,2}, Inmaculada Llamas^{1,2}

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

²Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica.

Contacto: patriciasancas@correo.ugr.es

El uso intensivo de fertilizantes y pesticidas químicos para mejorar la producción agrícola y combatir los fitopatógenos, junto a los desafíos del cambio climático, ha hecho que la industria agrícola alcance una situación límite. En este contexto, los ambientes salinos suponen una fuente importante para el aislamiento de microorganismos adaptados a vivir en condiciones extremas, con un elevado potencial como biofertilizantes y agentes de control biológico. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) destacan por sus actividades enzimáticas, que mejoran la adaptación de las plantas a ambientes extremos. Estas características, unidas a la producción de enzimas capaces de interferir en la comunicación de patógenos o quorum quenching (QQ), ha hecho que las bacterias con actividad PGP-QQ se posicionen como una alternativa innovadora y sostenible para combatir estrés abiótico y biótico en agricultura.

En este estudio se realizó una caracterización taxonómica polifásica de la cepa B22, aislada en el Saladar de El Margen (Cúllar, Granada). El análisis taxonómico reveló que la cepa B22 representa una nueva especie. La actividad PGP se evaluó mediante estudios *in vitro* e *in vivo* en plantas de tomate. Por su parte, la actividad QQ se evaluó *in vitro* frente a moléculas tipo N-acil homoserina lactonas (AHLs) sintéticas y aquellas producidas por fitopatógenos en cocultivo y posteriormente se analizó *in vivo* el efecto en la virulencia en frutos y plantas de tomate.

Los resultados obtenidos destacan el potencial de esta nueva especie bacteriana tanto por su actividad PGP en plantas de tomate como por su capacidad para reducir factores de virulencia. Este estudio revela el interés de esta cepa halotolerante como una herramienta prometedora para mejorar el rendimiento de cultivos y como agente de biocontrol sostenible.

Palabras clave: biocontrol, *quorum quenching*, fitopatógenos, PGPB.

Financiación: PID2019-106704RB-100/AEI/10.13039/501100011033 y FEDER/Junta de Andalucía-Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades (B-AGR-222-UGR20).

***Pseudomonas chlororaphis* ST9 como medida de control biológico**

Marina Pareja-Valero¹, Hanan El Bakkali¹, Maria Camila Espinosa-Araque¹, Gloria Andrea Silva-Castro¹, Ignacio Villalba-Recuerda

¹MAFA Vegetal Ecobiology

Contacto: marina@mafa.es

Ante las graves pérdidas económicas que producen numerosos patógenos vegetales en la agricultura y el desmesurado uso de agroquímicos para combatir esta problemática, urge la necesidad de explorar otras opciones.

El uso de PGPRs (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) es una alternativa sostenible y ecológica, ofreciendo protección a la planta, entre otros beneficios nutricionales, además de ayudar a minimizar el impacto ambiental que generan los agroquímicos. *Pseudomonas chlororaphis* ST9 es una rizobacteria capaz de producir enzimas y sustancias activas que favorecen la defensa de la planta ante estreses bióticos, destacándose como un gran potencial de biocontrol.

El estudio de su genoma muestra la presencia de genes correspondientes a la producción de compuestos antifúngicos como pirrolnitrina, hidrógeno cianida o ácido fenazina-1-carboxílico, así como también antibacterianos como R-tailocina e insecticidas como quitinasa o proteasa. Las pruebas *in vitro* determinaron la capacidad antagónica de *P. chlororaphis* frente a siete aislados de hongos fitopatógenos comunes en cultivos agrícolas, entre los que resaltan *Penicillium* y *Botrytis*, con una inhibición micelial del 60 y 40% respectivamente.

Adicionalmente, ensayos *in vivo* con plántulas de arroz bajo invernadero demostraron la efectividad de *P. chlororaphis* contra la bacteria patógena *Dickeya zae*, logrando una reducción significativa de la severidad de la enfermedad de un nivel 3 a nivel 2 en las plantas tratadas. Asimismo, entre los resultados positivos que se obtuvieron en el ensayo de campo en cultivo de vid frente al hongo *Uncinula necator*, causante de la enfermedad de oidio, se destaca la disminución significativa de la severidad de la enfermedad en fruto de hasta un 53% en plantas tratadas.

En definitiva, estas evidencias demuestran la gran capacidad de *Pseudomonas chlororaphis* ST9 como herramienta para el manejo y protección frente a enfermedades causadas por patógenos en la agricultura, ofreciendo prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente.

***Pseudomonas putida* membrane vesicles: a potential biocontrol tool?**

Javier De la Peña Noya, José Manuel Borrero de Acuña, Patricia Bernal

Universidad de Sevilla

Contacto: jdelapena@us.es

Pseudomonas putida is a gram-negative bacterium inhabiting the rhizosphere of plants. Due to its successful antagonism towards phytopathogens, it can be used as a biocontrol agent to protect crops. Beyond well-known mechanisms of cell-to-cell interactions i.e. siderophores, T6SS or quorum sensing, membrane vesicles (MVs) have arisen as a novel communication system operating across species and kingdoms. MVs are small membranous spheric vessels conveying biomolecules like DNA or metabolites between cells. Among the functions conducted by MVs are the elimination of waste, nutrient acquisition, or the secretion of bioactive molecules. Analysing the mechanisms underlying MV biogenesis and cargo packaging is instrumental to develop novel technologies based on MV for biocontrol purposes. To this end, we tested a range of conditions to assess MV yields and morphologies in the model organism *P. putida*. These include extraction of MVs at different physiological phases, grown on different carbon sources, and at different temperatures and iron availability. We analysed the size and concentration of *P. putida* MVs employing Nanosight technology. Complementarily, we used a dye that intercalates in the lipid bilayer of the MVs emitting fluorescence. Subsequently, we visualised the morphology and integrity of the MVs by transmission electron microscopy. Finally, we analysed the proteomic profile of these samples by quantitative proteomics (LC-MS/MS) to identify proteins consistently present across all conditions. This will allow us to deduce which ones are involved in MV biogenesis. Our observations indicate that the size of the MVs ranges between 20– 600 nm depending on the analysed condition, being 100 nm the most frequent size. We observed that while high temperature leads to the formation of smaller MVs (~80 nm), benzoate generates larger ones (~125 nm). Additionally, glycerol increases *P. putida* vesiculation by 5-fold compared with the LB control.

Funding: Junta de Andalucía (ProyExcel_00450) and Agencia Estatal de Investigación (TED2021-130357B-I00).

Designing of a modular plasmid platform for T6SS mediated delivery of antibacterial and antifungal effectors

Mario Araujo Garrido, Eloy Benítez , Diego Romero, Carlos Molina Santiago

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.

Contacto: mario17ag@uma.es

Microorganisms continuously interact between them and with the environment. In plant microbiomes, microorganisms continuously fight for nutrients and space. Among them, phytopathogens are of matter importance due to the crop and economical losses provoked. Therefore, there is a need to develop sustainable strategies to control plagues.

Type VI Secretion System (T6SS) is a syringe-like nanomachine commonly found in Gram-negative bacteria that injects effectors into target cells leading them to death and, therefore, modulating interspecies and interkingdom interactions. Although extensively studied, its biotechnological applications remain challenging due to their specificity.

In this work, using *Pseudomonas putida* KT2440 as bacterial delivery system, we provide this bacterium with new antifungal and antibacterial properties in a T6SS-dependent way. We have developed a genetic system, based on Golden-Standard (1), that easily permits construction of plasmids combining T6SS structure elements with different effectors in one reaction, complemented by searching for T6SS-dependent effectors from soil microorganisms such as *Pseudomonas* sp. 250J. Specifically, Tfe1 effector have shown antifungal activity against *Botrytis* increasing ROS production, vacuolization and cell death, while Tae1 effector have demonstrated antibacterial properties when expressed in *Escherichia coli*. Finally, we explored the potential of non-T6SS-dependent effectors such as chitosanase from *Bacillus subtilis* to target fungal cells, provoking ROS increase and *Botrytis* damage. These findings give us new tools to manipulate T6SS for targeted delivery of exogenous effectors against phytopathogens, paving the way for innovative biotechnological solutions against phytopathogens and promoting sustainable agriculture practices.

1. Blázquez, B., León, D. S., Torres-Bacete, J., Gómez-Luengo, Á., Kniewel, R., Martínez, I., Sordon, S., Wilczak, A., Salgado, S., Huszcza, E., Popłoński, J., Prieto, A., & Nogales, J. (2023). Golden Standard: a complete standard, portable, and interoperative MoClo tool for model and non-model proteobacteria. *Nucleic acids research*, 51(19),e98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad758>.

This work is funded by Consolidación Investigadora 2022 (CNS2022-135744) from Ministerio de Ciencia e Innovación.

Extracellular matrix-driven antagonism: *Bacillus* ECM manipulates *Botrytis* physiology and counterdefence

Alicia Isabel Pérez Lorente¹, Carlos Molina Santiago¹, David Vela¹, Paolo Stincone², Antonio de Vicente³, Daniel Petras⁴, Diego Romero¹

¹IHSM-UMA

²University of Tübingen

³UMA

⁴University of California Riverside (USA)

Contacto: perezlorente@uma.es

Fungi and bacteria coexist in diverse environments, contributing significantly to ecosystem dynamics and the health of the biosphere. These interactions range from mutualistic to antagonistic, driving crucial behavioural adaptations in these microorganisms. Bacterial biofilm formation emerges as a central player in both physical association of bacterial cells to fungal structures and in interspecies dialogues. Previous studies have demonstrated the significance of biofilm formation in the antagonistic interaction between *Bacillus* and the phytopathogenic fungi *Botrytis* in the melon phyllosphere [1]. Our hypothesis is that *Bacillus* Extracellular Matrix (ECM) plays a complementary role to the structural functionality of this microbial interaction.

This study elucidates how TasA, the main ECM protein component, orchestrate bacterial adhesion to *Botrytis* hyphae, potentially facilitating the release of metabolites with complementary antifungal activity. Concurrently, we observed that specific components of fungal cell wall disrupt the assembly of *Bacillus* ECM upon colonization of *Botrytis* hyphae. Along the progression of the interaction, TasA and the metabolite fengycin manipulates *Botrytis* physiology and metabolism. Simultaneously, when damaged, *Botrytis* responds to the aggressiveness of *Bacillus*-produced fengycin by enzymatically degrading this antifungal metabolite and secreting oxylipins that target *Bacillus* as a counter-defence, and lipidic signalling compounds.

Our results underscore the urgency of further investigation of these interactions with the aim of identifying adaptation processes that either lead to the exclusion or coexistence of two initially antagonistic microorganisms.

1. Berlanga-Clavero M V., Molina-Santiago C, Caraballo-Rodríguez AM, Petras D, Díaz-Martínez L, Pérez-García A, et al. *Bacillus subtilis* biofilm matrix components target seed oil bodies to promote growth and anti-fungal resistance in melon. *Nat Microbiol.* 2022;7(7):1001–15.

This work was supported by grants from an ERC Starting Grant (BacBio 637971), Plan Nacional de I+D+i of the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107724GB-I00; PID2022-141664NB-I00), and Junta de Andalucía (P20_00479). A.I.P.L. is funded by the program FPU (FPU19/00289).

Mycorrhizal fungi primes tomato indirect defenses against the pest *Tuta absoluta*

Juan García¹, Marina García-Alonso¹, Zhivko Minchev¹, Beatriz Ramirez¹, Luis España¹, Andrea Ramos¹, Olena Nesterenko¹, Rosa E. Becerra-García², Salva Herrero², Paloma Sanchez Bel³, Juan A. López-Ráez¹, Emilio Benitez⁴, Martin Aguirrebengoa⁴, María J. Pozo¹

¹Soil and Plant Microbiology Department, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada.

²Instituto de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED), Universitat de València.

³Cell signaling and metabolic integration, EEZ-CSIC associated Unit, Department of BBiCN, Universitat Jaume I, Castellón.

⁴Department of Biotechnology and Environmental protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada.

Contacto: jmgarcia@eez.csic.es

The use of beneficial soil microorganisms, such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is receiving increasing attention as a sustainable alternative to traditional fertilizers. AMF are obligate biotrophs that colonize plant roots and establish symbiosis with most terrestrial plants. They can stimulate the plant immune system leading to Mycorrhiza-Induced Resistance (MIR) against a broad range of pests and pathogens, holding a great potential for improving crop protection sustainability. The capacity of AMF to trigger MIR and protect plants against diverse aggressors has been extensively demonstrated under controlled conditions, however their use in agriculture is mostly restricted as biofertilizers and biostimulants. We have confirmed the potential of using AMF inoculants for reducing pest incidence under agronomic settings. A significant reduction of the incidence of leaf and fruit herbivory caused by *Tuta absoluta* in mycorrhizal plants was observed under different production systems, open field and production greenhouse, both following integrated pest management strategies. This prompts us to explore the potential contribution of plant indirect defenses to the observed protection. We tested whether mycorrhizal colonization leads to differences in the host plant attraction to the pest and/or to the myrid predator *Nesidiocoris tenuis*, commonly used as biocontrol agent in horticulture. The results show that the mycorrhizal symbiosis alters the volatile blend released by the plants leading to differential attraction of both insects. Thus, multitrophic interactions have to be considered when addressing the potential of microbial symbionts on crop protection.

This research has been funded by the grants MCIN/AEI/ PDC2022-133600-C21 and PID2021-124813OB-C31 and by “ERDF A way of making Europe” by the European Union, and grant P20_00139 funded by Junta de Andalucía.

The role of nitrate assimilation in the *Bradyrhizobium diazoefficiens*-soybean symbiosis

Alba Hidalgo-García, Ana Salas, Juan José Cabrera, María Jesús Delgado

Department of Soil and Plant Microbiology, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada.

Contacto: alba.hidalgo@eez.csic.es

Bradyrhizobium diazoefficiens is a nitrogen-fixing bacterium widely used as a soybean inoculant. Under free-living conditions, this rhizobacterium assimilates nitrate (NO_3^-) through its reduction to nitrite (NO_2^-) and subsequent reduction of NO_2^- to ammonium (NH_4^+) by the action of NasC and NirA enzymes, respectively. The aim of this work was to explore the role of NO_3^- assimilation under symbiotic conditions. Soybean plants, grown in the presence or absence of KNO_3 , were inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 (WT) and a *nasC* mutant. Analyses of nitrogenase activity in the nodules and nitrate reductase (NR) activity in the bacteroids indicated that NasC does not play a relevant role in bacteroids. These results suggest that *nasC* expression might be repressed by the NH_4^+ produced from N_2 -fixation. To check this hypothesis, we analysed *nasC* expression in the nodules of a *nifH* mutant that is incapable to reduce N_2 to NH_4^+ . We found that expression of *nasC* and NR activity were induced in the bacteroids of *nifH* nodules compared to WT nodules, both in the presence of NO_3^- . Moreover, bacteroids of *nifH* nodules were able to produce NH_4^+ when plants were grown in the presence of NO_3^- . Furthermore, in the absence of NO_3^- , *nifH* nodules were smaller than WT nodules, while in the presence of NO_3^- their size was comparable to that of the WT nodules. This positive effect was not observed in the nodules of plants inoculated with a *nifHnasC* double mutant. Taken together, these results suggest that NO_3^- assimilation is induced in the bacteroids when nitrogen fixation is impaired and this process enhances nodule development.

This research was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”, grants PID2020-114330GB-100 and PID2021-1240070B-100, and also by PAIDI2020 from Junta de Andalucía, grant P18-RT-1401.

Potential use and valorization of microalgae extracts from wastewater treatment as a biostimulant for beneficial soil microbiota

Ana Sofia Rodrigues dos Santo¹, Verónica Díaz Mendoza², Joana do Carmo Gomes¹, André Sousa¹, Inês Rebelo Romão¹, Jaime Martín Pascual², María del Mar Muñío Martínez³, Juan Ignacio Vílchez¹

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

²Department of Civil Engineering and Institute of Water Research, University of Granada.

³Department of Chemical Engineering, University of Granada.

Contacto: anasofiasantos@itqb.unl.pt

Some practices and abuse of synthetic fertilizers are contributing to a systematic soil damage, challenging crops productivity. A common effect observed on soil health is the reduced microbial diversity, urgently requiring for alternative sustainable practices. This study explores the valorization of a *Nannochloropsis gaditana* microalgae from a wastewater treatment, as soil microbial biostimulant, offering a circular economy solution. Thus, five extracts (AEs) from different stages of the alga cycle were prepared at 10 g/L and applied in raw and filtered formats at 0.5%, 1.5%, and 3%, confirming absence of microbial population. These extracts were profiled by GC-MS approach to identify bioactive compounds. The culturomic analysis identified 12 strains, with 5 selected by their clear behavior after AEs treatment in farm soil microcosms. The strains *Priestia flexa* A and *Pseudescherichia vulneris* B (a possible pathogen) were consistently stimulated and inhibited, respectively; while strain F (unidentified) and *Planococcus koreensis* L increased significantly only under filtered treatments. Moreover, *Bacillus subtilis* strain I, undetectable in controls, was detected across most treatments, indicating a strong stimulation. Metagenomic analysis supported these findings and provided additional insights into microbial diversity shifts. Assessing AEs bioactive capacity, we detected all AEs enhanced the biofilm and siderophore production across the selected strains; meanwhile, auxin production and potassium solubilization were notably stimulated by AE type 5, derived from wastewater treatment eluent. Additionally, some AEs induced antioxidant production and extracellular proline secretion. However, after evaluating for AEs biostimulation effect on tomato plants, we found minimal physiological effects, which may indicate their positive impact is targeting beneficial microbiota in natural soils. Consequently, future research aims to incorporate AEs as biostimulants for microbial bioinoculants, or as a direct amendment and beneficial microbiota boosting treatment for farming soils. More tests are being conducted to further assess their potential use in sustainable agriculture.

Cork-immobilized plant growth promoting bacteria (PGPB) tolerant to high temperature as agrotols for ameliorating thermal stress in tomato

Eloísa Pajuelo Domínguez¹, María Gómez Villafruela¹, Noris J. Flores-Duarte¹, Ignacio D. Rodríguez-Llorente¹, Beatriz Roncero Ramos², Miriam Muñoz Rojas², Enrique Mateos Naranjo², Susana Redondo Góme², Yolanda Cantón Castilla³

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

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

³Departamento de Agronomía, Universidad de Almería.

Contacto: epajuelo@us.es

Climate change poses one of the greatest challenges for society and agricultural production. One of the consequences of climate change are extreme weather events, such as heat waves. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the second most cultivated solanaceous crop next to potato, with high relevance at the nutritional and economic levels. Nevertheless, the increase in day/night temperatures above 26/20 °C, respectively, affects the development of fruits and consequently reduces crop yield.

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are rhizosphere or endophytic bacteria that enhance plant growth and ameliorate abiotic stress. However, one of the bottlenecks for wider application of biofertilizers is the low stability or shelf-life of the inoculants.

In this work, two different bacterial consortiums isolated from saline soils (the Guadiana rivermouth, Ayamonte, Huelva) and from arid biocrusts (the Tabernas desert in Almería), and tolerant to high temperatures, were tested for amelioration of tomato stress under a 3-days heatwave at 40 °C/28 °C day/night temperatures. The consortiums were applied in liquid formulation and immobilized onto cork particles as a carrier.

Our results showed that different effects could be achieved upon inoculation with either consortium: whereas the Ayamonte consortium promoted plant growth, increased height and elongation; the Almería consortium promoted early flowering and fruit setting. Moreover, immobilization onto cork particles led to better physiological parameters in plants, including higher efficiency of the photosystem II, higher net photosynthetic rate and better gas exchange. Furthermore, SEM micrographs showed very dense biofilm colonization of cork particles which was still present after 2 months. In this regard, the positive effect of inoculation could be attributed to extended survival of the immobilized formulations.

In conclusion, our results suggest the necessity to evaluate individual bacterial inoculants in particular plants and environmental situations, and demonstrate the feasibility of using cork particles as carriers for bioformulation of efficient inoculants.

Diseño y aplicación de bioinoculantes basados en la cepa *Pseudomonas* sp. CDVBN10-B en cultivos de interés agrícola

Lihuén Iraí González-Dominici^{1,2}, Celia Nieto^{3,4}, Milena A. Vega^{3,4}, Zaki Saati-Santamaría⁵, Paula García-Fraile^{1,2,6}

¹Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

²Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) Salamanca.

³Departamento de Ingeniería Química y Textil, Universidad de Salamanca

⁴Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Complejo Asistencial de Salamanca.

⁵Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Praga.

⁶Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo, USAL-CSIC (IRNASA) Salamanca.

Contacto: lihuengd@usal.es

La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. CDVBN10-B, aislada originalmente como endófito de raíces de colza, ha demostrado previamente su capacidad para promover el crecimiento vegetal de este cultivo y colonizar el sistema radicular de un amplio rango de hospedadores. En el presente estudio se evaluó la capacidad de esta cepa para promover el crecimiento en cultivos de colza, tomate, alfalfa y cebada, incluso en condiciones de estrés biótico y abiótico. Los resultados obtenidos mostraron una promoción del desarrollo vegetal y una reducción significativa de los efectos negativos causados por exposición a sequía, alto nivel de salinidad e infección por fitopatógenos fúngicos en aquellas plantas inoculadas con la cepa CDVBN10-B, indicando su gran potencial como bioestimulante agrícola. Para optimizar su aplicabilidad, se diseñaron formulaciones basadas en esta cepa, empleando perlas de alginato y productos liofilizados combinados con diferentes polisacáridos. La viabilidad del producto a largo plazo fue evaluada mediante conteo de unidades formadoras de colonias durante un período de 12 meses y en diferentes condiciones de almacenamiento, siendo los formulados LS10 (producto liofilizado con sacarosa al 10%) y BF4C (perlas de alginato almacenadas a 4 °C) los que mejor preservaron la calidad del producto. En ensayos de invernadero, la aplicación de estos formulados resultó en una mejora significativa de la producción, con la excepción del formulado BF en cebada y el formulado LS10 en colza, que no tuvieron un efecto significativo en la producción final. Los resultados obtenidos confirman el potencial de la cepa CDVBN10-B como bioestimulante y resaltan la importancia del diseño adecuado de los formulados para garantizar la viabilidad y efectividad de los bioinoculantes en entornos agrícolas.

Agradecimientos: Subvención TED2021-129157B-I00 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR.

Adaptación al estrés salino y su transferencia: Efectos de la preadaptación en *Bacillus megaterium* y su rol en la aclimatación de *Arabidopsis thaliana*

Antònia Romero Munar¹, Maria Muñoz Carrasco², Ángel Zamarreño Arregui³, José María García-Mina³, Juan Manuel Ruíz-Lozano², Rafael Nuñez Gómez⁴, Ricardo Aroca²

¹Grupo PlantAgro Univesitat de les Illes Balears.

²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

³R&D TAI Roullier Group, Polígono Arazuri-Orkoien, Orkoien.

⁴Servicio de Instrumentación Científica (SIC) Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

Contacto: antonia.romero@uib.cat

Las interacciones entre plantas y bacterias promotoras del crecimiento son estrategias clave en la adaptación de las plantas a estreses abióticos, como la salinización del suelo, un problema agravado por el cambio climático. Este estudio investiga la capacidad de *Bacillus megaterium* para adaptarse a condiciones de estrés salino severo y su influencia en la aclimatación temprana de *Arabidopsis thaliana*. Se realizaron dos experimentos sucesivos: primero, *B. megaterium* se cultivó en medio LB con y sin 1M NaCl, y se midieron parámetros de crecimiento bacteriano a diferentes intervalos. En la cuarta generación bacteriana, se analizó la concentración de hormonas (como ácido salicílico, SA) y el metabolismo primario. Posteriormente, las bacterias de esta cuarta generación fueron inoculadas en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones controladas, con o sin estrés salino (150mM NaCl). Los resultados muestran que el estrés salino severo afectó significativamente los parámetros de crecimiento de las bacterias, pero *B. megaterium* adaptado al estrés salino (crecido en LB + 1M NaCl) mostró cambios en la concentración de SA y en el metabolismo primario, lo que favoreció su supervivencia. En las plantas de *Arabidopsis* tratadas con 150mM NaCl, aquellas inoculadas con *B. megaterium* adaptado presentaron mayor biomasa y vigor, en comparación con las inoculadas con cepas no adaptadas. Además, se observó que esta adaptación bacteriana influyó las vías de señalización de *Arabidopsis* relacionadas con la respuesta al estrés, como la expresión de los genes de SOS1, SOS2 y SOS3. En conclusión, la adaptación de *B. megaterium* a condiciones salinas fue crucial para la mejora del crecimiento de *Arabidopsis* bajo estrés salino, sugiriendo su potencial como biofertilizante preadaptado para mitigar los efectos de la salinización en cultivos.

Rhizosphere microbiome in quinoa: harnessing its potential to enhance nutritional quality and drought stress tolerance

María Reguera¹, Isaac Maestro-Gaitán¹, Miguel Redondo-Nieto¹, Javier Matías², Luis Bolaños¹

¹Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid.

²Agrarian Research Institute “La Orden-Valdesequera” of Extremadura (CICYTEX), Badajoz.

Contacto: maria.reguera@uam.es

Chenopodium quinoa Willd., commonly known as quinoa, is an underutilized crop with significant potential to contribute to food security due to the exceptional nutritional properties of its seeds and its high tolerance to various abiotic stresses. This emerging crop holds promise in the context of climate change, especially in the Mediterranean region, where an increase in the frequency and severity of droughts in rainfed agricultural systems is anticipated. However, quinoa's drought tolerance is influenced by multiple factors, including genotype and the root-associated microbiome. This study focuses on characterizing the quinoa root microbiome and its dual role in conferring drought tolerance and enhancing seed nutritional quality. The research evaluates the influence of genotype and water treatments on the rhizosphere microbiome composition and examines quinoa's ability to recruit potential beneficial microorganisms. Additionally, agronomic, nutritional, and photosynthetic membrane stability parameters were analyzed. Two varieties, F16 and F15, previously identified as drought-tolerant and drought-sensitive, respectively, were subjected to controlled irrigation and water deficit conditions. Rhizosphere microbial communities were enriched using infusions derived from soils of varying origins. The findings aim to identify microbial consortia with potential for commercialization, offering solutions to improve quinoa's nutritional quality and resilience to abiotic stress. This work highlights the importance of leveraging the rhizosphere microbiome in quinoa cultivation as a sustainable strategy to enhance crop performance and adaptability in the face of climate change.

Transcriptome changes induced by *Trichoderma* in leaf of wheat plants promote water stress tolerance

David Mendoza-Salido, Julio Ascaso, Alberto Pedrero-Méndez, Enrique Monte, Narciso M. Quijada, Rosa Hermosa

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

Contacto: dms333@usal.es

Trichoderma is a fungal genus including species used as direct biocontrol agents against phytopathogens (Woo *et al.*, 2023). Some strains can promote plant's growth and improve their defences against abiotic stresses like drought (Illescas *et al.*, 2022). Within the national project FUNDRYWHEAT, greenhouse trials were performed, subjecting Basileo wheat to water stress (WS) under the application or not of different *Trichoderma* strains, showing the best results with *T. simmonsii* T137. RNA-Seq was conducted over total RNA (cDNA) purified from plants with and without WS, the application of T137 and in further recovery conditions, by using an Illumina NextSeq platform. From the raw data, we developed a bioinformatic pipeline that allowed us to: QC the reads, align QC reads to the reference wheat genome (*Triticum aestivum* IWGSCv2.1), obtain expression values (TPM), perform a functional enrichment of genes by sequence homology (KEGG), search for key features involved in plant-stress and plant-microbe interactions and lastly, carry out a Differential Gene Expression Analysis (DGE) among all treatments. Results showed that WS is the main factor impacting the plants' transcriptional profile, modifying mainly routes related to carbohydrate metabolism, proteins synthesis and genetic information processing. Additionally, T137 improved stress tolerance in plants, decreasing the expression of genes related to abiotic stress response, whereas increasing the expression of genes related to plant growth and development.

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

Acknowledgments: D.M.S. (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 grant agreement No PRE2022-105868) thanks the State Research Agency (AEI) of the Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Social Fund plus. N.M.Q. is currently funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 101034371

Deciphering the mechanisms of drought stress alleviation by *Pseudomonas* N122

Cristina Sarmiento-Castañeda¹, Pascal Nuijten², José A. Gutierrez¹, Sofia Stiegert², Arezoo Rahimi²,
Salma Balazadeh², Jos M. Raaijmakers², Víctor J. Carrión¹

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

²Institute of Biology, Leiden University.

Contacto: csarmiento@uma.es

In recent decades, rainfall scarcity due to climate change has become one of the greatest challenges for global agricultural production, driving the search for innovative solutions. A promising alternative is the ability of certain plant-associated microorganisms to mitigate the effects of water stress in plants, thereby maintaining crop yields. A deeper understanding of how the interaction between microorganisms and plants occurs under these water stress conditions opens new avenues for combating the adverse effects of climate change on agriculture.

In response to this challenge, the MicroRES research project isolated a collection of 146 bacterial strains from the rhizosphere of plants grown on Terschelling Island (Netherlands), a region with harsh environmental conditions. Various assays were conducted with this collection to evaluate the ability of each strain to support plants under simulated drought conditions using polyethylene glycol (PEG). Among these strains, *Pseudomonas* sp. N122 stands out for enhancing drought tolerance through the production of volatile organic compounds (VOCs). These VOCs promote the elongation of root hairs, increasing the root's surface area in contact with the soil, thereby facilitating water uptake by the plant under drought conditions.

Thus, the objective of this research is to construct a library of mutants in *Pseudomonas* sp. N122 through random insertion of the Tn5-1063 transposon, to identify genes potentially involved in root hair formation. Following the generation and subsequent screening of approximately 1600 mutants in *Arabidopsis thaliana*, a mutant candidate has been identified that reverses the wild-type phenotype in *A. thaliana* roots and by sequencing the genome we are identifying the gene involved in this phenotype.

Chemotactic responses mediated by three chemoreceptors encoded in a gene cluster of the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum*

Roberta Genova¹, Ashleigh Holmes², Atsushi Ishihara³, Naoki Ube⁴, Miguel A. Matilla¹, Tino Krell¹

¹Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC)

²James Hutton Institute, United Kingdom

³Tottori University, Japan

⁴Toyama Prefectural University, Japan

Contacto: roberta.genova@eez.csic.es

Phytopathogenic bacteria encode significantly more chemoreceptors than the bacterial average, suggesting the importance of chemotaxis in plant infection. However, information on the function of these receptors is scarce. *Pectobacterium* spp. are one of the 10 most relevant phytopathogens and the causative agents of soft rot diseases in many agricultural relevant crops. In particular, *Pectobacterium atrosepticum* causes blackleg disease on potatoes, and its model strain SCRI1043 harbors 36 chemoreceptors that are mostly of unknown function.

Chemoreceptor genes are typically scattered over the genome, but strain SCRI1043 contains a gene cluster encoding four chemoreceptors. To identify the signals that are recognized by these receptors, we have generated their corresponding sensor domains as recombinant proteins that were submitted to high-throughput ligand screening using compound libraries. Microcalorimetric titrations were then conducted to derive the corresponding binding parameters. Our results reveal that the chemoreceptor PacG binds agmatine and its derivatives, whereas the PacH recognizes vanillin and the plant hormone salicylic acid. Additionally, we identified PacI as another receptor for salicylic acid, which also recognizes benzoate and several of its derivatives. In analogy to other four-helix bundle sensor domains, binding occurred with negative cooperativity.

Most of the identified ligands are plant-derived compounds like salicylic acid, a plant hormone that controls many plant physiological features, including the expression of pathogenesis-related proteins. *P. atrosepticum* mediated chemoattraction to all the identified ligands and we have assessed the role of the individual chemoreceptors by phenotypically characterizing the corresponding mutant strains. The impact of these chemoreceptors in *P. atrosepticum* virulence is currently being evaluated using these chemoreceptor mutants.

This study advances our knowledge on the chemoreceptor function and provides valuable insights into the mechanisms of plant host colonization by bacterial phytopathogens.

Financiación: R.G. es beneficiaria de un contrato predoctoral PRE2021-096885. Este estudio se ha financiado a través de los proyectos 2024AEP062, P18-FR-1621, PID2020-112612GB-I00 y PID2023-146216NB-I00 a T.K., PID2019-103972GA-I00 y PID2023-146281NB-I00 a M.A.M.

Mecanismos de la quimiotaxis a la acetilcolina en fitopatógenos bacterianos globales

Manuel J. Gilabert¹, Saray Santamaría-Hernando², Ana Molina-Ollero¹, Míriam Rico-Jimenez¹, Emilia López-Solanilla², Miguel A. Matilla¹

¹Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas CBGP, Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CBGP-UPM).

Contacto: manujgilabert@gmail.com

Las interacciones planta-microorganismo que ocurren en el holobionte vegetal implican una amplia diversidad de señales de origen vegetal y microbiano. Sin embargo, los mecanismos que regulan esta compleja comunicación son aún poco conocidos. La quimiotaxis permite a las bacterias desplazarse de manera dirigida en respuesta a gradientes químicos y constituye un determinante importante para la colonización e infección de las plantas por bacterias fitopatógenas mediante el reconocimiento de señales vegetales. Entre éstas, la amina cuaternaria acetilcolina está emergiendo como una molécula señal clave en la regulación del metabolismo, el crecimiento, la diferenciación celular y la respuesta de las plantas a estreses abióticos. Recientemente, identificamos que bacterias fitopatógenas de los géneros *Agrobacterium* y *Dickeya* presentan quimiotaxis hacia la acetilcolina (Matilla *et al.*, 2022). Para avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados, en este estudio hemos identificado los quimiorreceptores responsables del reconocimiento y la mediación de las correspondientes respuestas quimiotácticas en las bacterias fitopatógenas *Agrobacterium fabrum*, *Dickeya solani* y *Dickeya dadantii*. Estos quimiorreceptores presentan un dominio sensor de tipo dCache_1 y estudios de interacción proteína-ligando revelaron afinidades de unión a la acetilcolina en el rango de 19 y 91 μM . La generación de mutantes en estos quimiorreceptores y ensayos de complementación génica nos permitieron demostrar que este reconocimiento molecular desencadena fuertes respuestas quimioatrayentes. Además, identificamos que la acetilcolina sirve como fuente nutricional para *A. fabrum*, aunque no para *D. solani* ni *D. dadantii*, y que exhibe efectos osmoprotectores en las tres especies fitopatógenas estudiadas. La capacidad de las fitobacterias de detectar la acetilcolina podría representar una estrategia adaptativa para gestionar el estrés osmótico, sugiriendo la existencia de interacciones coevolutivas entre las plantas y sus microbiomas asociados.

Referencias: Matilla *et al.* (2022) *mBio* 13:e0345821.

Financiación: PID2019-103972GA-I00, PID2021-125673OB-I00 y PID2023-146281NB-I00 financiados por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) y 2023AEP002 (CSIC).

Caracterización funcional de los quimiorreceptores de tipo Aer en *Dickeya dadantii* 3937 y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: taxis energética y su relevancia en la interacción planta-patógeno

Cristina L. Gómez-Campo^{1,2}, Martí Munar-Palmer^{1,2}, Saray Santamaría-Hernando^{1,2,3}, Inés Pérez-Miguélez^{1,2}, Elena Iriondo-Delgado^{1,2}, Gema López-Torrejón^{1,2,3}, José Juan Rodríguez-Herva^{1,2,3}, Emilia López-Solanilla^{1,2,3}

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

²Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Parque Científico y Tecnológico de la UPM, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España.

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

Contacto: cristina.gomez.campo@upm.es

Dickeya dadantii 3937 (Dd3937) y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPto) son bacterias fitopatógenas de gran relevancia en la agricultura por su capacidad de causar pérdidas económicas significativas. Dd3937 provoca la podredumbre blanda en diversas plantas de interés alimentario, mientras que PsPto causa la peca bacteriana del tomate.

Los quimiorreceptores (CRs) permiten a las bacterias detectar señales y activar rutas de señalización asociadas a diferentes respuestas. Entre ellos, destacan los CRs asociados a la "taxis energética", que regulan la respuesta quimiotáctica al percibir los niveles de energía intracelular mediante dominios PAS (Per-ARNT-Sim). Estos detectan, entre otros, luz, oxígeno y potencial redox, permitiendo a las bacterias desplazarse hacia nichos energéticamente favorables. En PsPto hay 9 CRs de este tipo, mientras que en Dd3937 hay 4 CRs de taxis energética.

En este estudio, se han caracterizado los CRs de PsPto y Dd3937 homólogos al CR Aer de *Escherichia coli*, un CR asociado a aerotaxis y cuyo cofactor es el FAD. En Dd3937 se han identificado los CRs de tipo Aer DDA3937_RS12290, DDA3937_RS17070 y DDA3937_RS12165 y en PsPto los CRs PSPTO_1648 y PSPTO_2014 como posibles componentes clave de la taxis energética. Se ha llevado a cabo el análisis fenotípico de cepas deficientes en estas proteínas para evaluar su función en crecimiento, motilidad, aerotaxis, virulencia, formación de biopelículas y producción de c-di-GMP; además de estudiar su posición filogenética respecto a otros CRs con dominios PAS y su capacidad de unión a FAD mediante docking molecular. En Dd3937, se ha realizado también un análisis transcriptómico para identificar cambios en la expresión génica durante el crecimiento de los mutantes en condiciones *in vitro* y simulando el entorno de una infección en planta. Estos resultados aportarán información novedosa sobre el rol de estos CRs en la interacción planta-microorganismo, ofreciendo dianas para desarrollar nuevas estrategias de control.

***Bacillus mycooides* as a shield for plant health against *Botrytis cinerea*.**

Marta Orero Bayo¹, Samia Mokh¹, Nadira Oukala², Victoria Pastor Fuentes¹

¹Plant Immunity and Biochemistry Group, Biochemistry and Molecular Biology Section, Department of Biology, Biochemistry and Natural Sciences, Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.

²Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources, Department of Biology, University of M'hamed Bougara.

Contacto: morero@uji.es

Plants constantly interact with environmental threats, which can be either beneficial or harmful. Understanding how plants perceive and respond to their environment is crucial for developing new strategies to support their defense mechanisms. Endophytic bacteria (EB) are the good ones since they can colonize plants without causing any damage and promote their adaptation to stresses. In our lab, we have selected the EB *Bacillus mycooides* strain O₂ because its ability to colonize the plant and to interfere in *Botrytis cinerea* development. In this work we are trying to understand how O₂ enhances the defenses of tomato plants against *Botrytis cinerea*. By one side, in vitro experiments (without direct contact between fungus and bacteria) show lower and stressful expansion of *B. cinerea*, demonstrating the power of volatiles from O₂. These volatiles include hydrocarbons, Sulphur-Nitrogen containing compounds, and ketones. In planta experiments, demonstrate that despite the O₂ ability to colonize the plant, there is a scarce and irregular presence of the bacterium in shoots, which in turn display perfect priming profile of defences, with minimum impact on plant immunity when *B. cinerea* is not present. Classical defense-related genes showed that O₂ pre-treated plants had elevated expression of PR1, ACO1 and LOXD. Furthermore, untargeted metabolomics revealed that compounds over accumulated in O₂ pre-treated plants belong to primary metabolism pathways. RNA-seq analysis supported the metabolomic data, confirming that primary metabolic pathways are predominantly induced in *B. mycooides* pre-treated plants at 24 hpi.

Interestingly, the presence of the bacterium alone does not affect plant physiology in plants, suggesting that *B. mycooides* essentially acts as a plant immunity inducer. Further studies are needed to clarify the role of these pathways in *B. mycooides*-induced resistance against *B. cinerea*.

Cyclo(Pro-Tyr) induces cellular damage in fungi by targeting the [H⁺] ATPase Pma1 within plasma membrane domains

David Vela-Corcía¹, Jesus Hierrezuelo¹, Alicia Perez-Lorente¹, Paolo Stincone², Axelle Grelard³, Antonio De Vicente¹, Alejandro Perez-Garcia¹, Lin Bai⁴, Daniel Petras², Diego Romero¹

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

²University of Tuebingen, CMFI Cluster of Excellence, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine, Tuebingen.

³L’Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-Objets (CBMN), Unité Mixte de Recherche (UMR) 5248, Centre National de la Recherche (CNRS), University of Bordeaux, Pessac.

⁴Department of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing.

Contacto: dvela@uma.es

Bioactive metabolites play a pivotal role in mediating interactions among diverse organisms, influencing both competition and cooperation within shared environments. In this study, we identified cyclo(Pro-Tyr), a bioactive metabolite produced by the bacterium *Bacillus velezensis*, as a potent inhibitor of *Botrytis cinerea* and the nematode *Caenorhabditis elegans*. Our investigation revealed that cyclo(Pro-Tyr) disrupts plasma membrane polarization, induces oxidative stress, and increases membrane fluidity, all of which severely compromise fungal membrane integrity. These cytological and physiological changes appear to be triggered by the destabilization of membrane microdomains that contain the [H⁺] ATPase Pma1, a key enzyme for maintaining membrane homeostasis. In response to the stress induced by cyclo(Pro-Tyr), fungal cells initiate complex transcriptomic and metabolomic responses. These responses focus primarily on lipid metabolism, which is essential for restoring membrane integrity, and the detoxification of Reactive Oxygen Species, which helps mitigate oxidative damage caused by disrupted membranes. Interestingly, a similar defensive response is observed in the nematode *C. elegans*, suggesting a conserved mechanism of action where cyclo(Pro-Tyr) broadly targets eukaryotic cellular membranes.

The ability of cyclo(Pro-Tyr) to interfere with membrane homeostasis highlights its significance as a bioactive compound that can disrupt essential cellular processes in diverse eukaryotic organisms. This dual effect on both fungi and nematodes underscores its potential ecological role in microbial competition and its broader implications for the development of novel antifungal and antiparasitic strategies. Understanding the molecular mechanisms underlying these effects provides valuable insight into metabolite-mediated interspecies interactions.

Funding: This work was partially supported by grants from ERC Starting Grant (BacBio 637971), Plan Nacional de I+D+I of Ministerio de Economía y Competitividad (PID2019-107724GB-I00, PID2022-141664NB-I00), research contract 8.06/60.4086 with KOPPERT B.V. (The Netherlands), and Proyecto Jóvenes Investigadores from Plan Propio de Universidad de Málaga (B1-2021_34). D.V.C. is funded by the program Incorporación de Doctores PAIDI from Junta de Andalucía (DOC_00266).

Modelos metabólicos a escala genómica como herramienta para el estudio de la interacción *Podosphaera xanthii*-*Cucumis melo*

Alejandro Jimenez-Sanchez, Álvaro Polonio, Dolores Fernández-Ortuño, Alejandro Pérez-García

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

Contacto: alexjisa@uma.es

Los hongos fitopatógenos representan una gran amenaza para la producción agrícola a nivel global. Entre ellos, los oídios (familia *Erysiphaceae*) destacan por ser los agentes causales de la enfermedad homónima, que afecta a más de 10.000 especies de plantas. Este grupo de ascomicetos son biotrofos obligados, lo que significa que dependen completamente de su hospedador como resultado de una pérdida progresiva de genes del metabolismo primario. Sin embargo, los motivos que subyacen a la pérdida de tan solo ciertos genes es aún una cuestión abierta. En este trabajo, se presenta un modelo metabólico preliminar que describe la interacción entre *Podosphaera xanthii*, el principal responsable del oídio de las cucurbitáceas, y el melón (*Cucumis melo*). La reconstrucción del borrador permite explorar las asociaciones gen-proteína-reacción en los diferentes compartimentos celulares de ambos organismos, atendiendo también a los genes perdidos identificados en los oídios. Asimismo, el modelo posibilita la integración de datos transcriptómicos para simular los flujos de metabolitos que serían esenciales para el desarrollo del hongo. Este enfoque no solo permite conocer más sobre las capacidades metabólicas de *P. xanthii*, sino que también sienta las bases para la selección racional de genes diana en el diseño de estrategias de control de la enfermedad.

Financiación: Este trabajo forma parte del proyecto de I+D+i PID2022-136240OB-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE.

Estudio del bucle regulatorio de la ruta Gac-Rsm de *Pseudomonas syringae* pv. tomato

Adriana Vásquez Rodríguez, María Trinidad Gallegos

Dpto. de Microbiología del Suelo y de la Planta, Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Contacto: avasquezro@correo.ugr.es

Pseudomonas syringae pv. tomato (Pto) es un patógeno que infecta plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) utilizando un repertorio de efectores que se secretan a través de un sistema de secreción tipo III (T3SS) y la fitotoxina coronatina, que interrumpe la señalización mediada por ácido jasmónico [1]. La ruta de señalización Gac-Rsm controla diversos aspectos importantes para la virulencia de Pto DC3000, como la motilidad o la producción de metabolitos secundarios. Esta señalización comienza con el sistema de dos componentes GacS/GacA, que detecta una señal y activa la transcripción de los ARN reguladores Rsm [2]. En el caso de Pto DC3000, se han identificado siete ARN (RsmX1-5, RsmY y RsmZ) y cinco proteínas de unión a ARN (RsmA, C, D, E y H), de las cuales solo RsmE y RsmA han demostrado ser funcionales in vivo [3,4]. La regulación de la ruta Gac-Rsm es aún más compleja, ya que la expresión de los ARN reguladores Rsm se reduce al eliminar rsmE y/o rsmA, pero aumenta considerablemente al sobreexpresarlos [5].

Este trabajo pretende estudiar el bucle regulatorio de la ruta Gac-Rsm generado por RsmE. Previamente, habíamos observado que la inducción de la expresión de los promotores de *rsmX5*, *rsmY* y *rsmZ* por RsmE era estrictamente dependiente de GacA y GacS. Ahora mostramos que ocurre lo mismo en el resto de los ARN rsm. Además, hemos comprobado que otras histidina-quinasas, como LadS o RetS, no parecen intervenir en este bucle regulador y hemos avanzado en el estudio de la expresión de *gacA* a nivel transcripcional y postranscripcional.

Referencias:

- [1] Xin *et al.* (2018) *Nat Rev Microbiol.* 16: 316-328
- [2] Ferreiro & Gallegos (2021) *Environ Microbiol.* 23: 5670-5689
- [3] Ferreiro *et al.* (2018) *Mol. Plant Microbe Interact.* 31:525-536.
- [4] Vásquez *et al.* (2024) *Microbiol. Res.*, in press.
- [5] Ferreiro *et al.* (2021) *RNA Biology* 18: 1818-1833.

Participation of FleN, HkmA, HdmA and HdmB in the regulation of *Pseudomonas ogarae* F113 motility and biofilm formation.

Laura Carrera Ruiz, David Durán Wendt, Miguel Redondo Nieto, Marta Ballesteros, Marta Martín, Rafael Rivilla

Universidad Autónoma de Madrid.

Contacto: laura.carrera@uam.es

Pseudomonas ogarae F113, is a model bacterium for rhizosphere colonization with agronomic relevance, due to its role as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Its PGPR role is determined by its ability to colonize the rhizosphere, shifting from a motile to a sessile phase. This transition is regulated by the levels of the second messenger cyclic diguanylate monophosphate (c-diGMP), whose production is carried out by guanylate cyclases and its degradation by phosphodiesterases, both regulated by the AmrZ/FleQ node. This regulatory node is on top of a regulatory cascade that in response to environmental stimuli results in the regulation of the synthesis and function of the flagellar apparatus and in the regulation of biofilm formation. Within this framework, we investigated four proteins: FleN, HkmA, HdmA and HdmB. FleN is involved in the regulation of FleQ. HkmA, an orphan histidine kinase, may act as an environmental sensor, phosphorylating an undetermined response regulator. HdmA and HdmB are two proteins that possess an HDOD domain, which is also found in SadB, another protein implicated in the synthesis of the flagellar apparatus that shows interaction with c-diGMP. Mutants affected in the genes encoding these proteins show phenotypic differences with the wild-type strain in motility and biofilm formation. The *hkmA*- mutant is hypermotile, conversely to the reduced motility phenotype of *fleN*-, *hdmA*- and *hdmB*- mutants. Regarding biofilm formation, *hkmA*- showed increased production, while *fleN*- showed a reduction. The *hdmA*- and *hdmB*- mutants were not affected in biofilm formation. Finally, Bacterial two-hybrid experiments have shown the protein-protein interaction of FleQ and FleN. These results show that in *P. ogarae*, HkmA and FleN are implicated in the regulation of motility and biofilm formation, while HdmAB only participates in the regulation of motility.

Funding: MICIN FEDER/EU Grant PID2021-125070OB-I00. Laura Carrera is the recipient of a FPI grant from MICIN.

Unveiling the genetic secrets of MLG production: a mixed-linkage β -glucan essential for effective rhizobial colonization

Lucía Ruiz Sáez¹, Pedro José Pacheco Márquez¹, J. Peinado², Francisco Javier Lloret Romero², Socorro Muñoz Rodríguez¹, Juan Sanjuán Pinilla¹, Daniel Pérez Mendoza¹

¹Department of Soil and Plant Microbiology, Zaidín Experimental Station, CSIC, Granada, Spain.

²Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Contacto: lucia.ruiz.saez@csic.es

Several agriculturally relevant rhizobia, including *Ensifer meliloti* 8530 and *Rhizobium etli* CFN42, produce a linear Mixed-Linkage β -Glucan (MLG) regulated by the bacterial second messenger c-di-GMP [1,2]. MLG plays a critical role in bacterial aggregation, biofilm formation, and attachment to host plant roots and also adds to the growing list of promising biopolymers with potential biotechnological applications. Rhizobia produce other exopolysaccharides (EPS), such as EPS I, EPS II, APS, and cellulose, all of which are regulated by c-di-GMP and also contribute to the interaction with the plant [3]. We previously described the *bgsBA* operon required for MLG production, where *bgsA* encodes an inner membrane glycosyltransferase and *bgsB* a companion HlyD-like periplasmic protein [1]. In this study we identified *tolC* as another essential gene for MLG production. TolC is an external membrane porin involved in the secretion of other EPS, in tolerance to toxic compounds and abiotic stresses in *Ensifer meliloti* [4]. Furthermore, the overexpression of the three identified biosynthetic genes: *bgsBA* and *tolC*, significantly increased MLG production in presence of high intracellular levels of c-di-GMP. To explore the interplay between MLG and other c-di-GMP-regulated EPS, we also analysed the effect of a triple mutant (EPS I, EPS II, and APS) in *E. meliloti* 8530 and a cellulose mutant in *R. etli* CFN42 on MLG production. While disruption of EPS I, EPS II, or APS biosynthesis did not increase MLG production in *E. meliloti*, a mutation in the cellulose operon led to a significant increase in MLG production in *R. etli*. These results suggest that c-di-GMP-regulated MLG production is strongly influenced by the bacterial genetic background.

References:

- [1] Pérez-Mendoza D, et al. *PNAS*. 2015; 112(7): E757-E765.
- [2] Pérez-Mendoza D, et al. *Biology*. 2022; 11(9):1364.
- [3] Krol E, et al. *Biol Chem*. 2020 Nov 26;401(12):1335-1348..
- [4] Cosme AM, et al. *MPMI* 2008 21:947-957.

Funding:

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

New functions associated to RelA of *Sinorhizobium meliloti*

Carvia-Hermoso, C., Bernabéu-Roda, L.M., Cuéllar, V., van Dillewijn, P., Soto, M.J.

Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Contacto: cristina.carvia@eez.csic.es

RelA is a bifunctional enzyme responsible for the synthesis and hydrolysis of phosphorylated nucleotides [(p)ppGpp], also known as alarmones. These alarmones are key players of the stringent response (SR), a bacterial regulatory mechanism that aids adaptation to stressful conditions. In addition to its function in managing stress, SR is important during normal cellular growth and essential for a specialized type of bacterial motility [1]. In a forward genetic approach aimed at deciphering the molecular mechanisms governing surface motility in the alfalfa endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* GR4, a *relA*::Tn5 transposant (GRS3009) was isolated. This mutant showed swimming motility similar to that of the wild-type strain, but impaired surface translocation and response to 2-tridecanone, a volatile compound that triggers surface spreading in *S. meliloti* [2]. Analyses of the GRS3009 volatilome also revealed reduced volatile production. Interestingly, and in contrast to Rm1021-derived *relA* mutants, which fail to nodulate alfalfa [3], our *relA*::Tn5 transposant is able to induce nitrogen-fixing nodules. To continue deciphering the role of SR in the free-living phenotypes of *S. meliloti* as well as its impact on the establishment of symbiosis, a GR4-derived *relA* deletion mutant and complementing strains have been characterized. The transcriptome of the *relA* deletion mutant upon growth on surfaces will also be presented.

References

- [1] Pletzer *et al.* *PLoS Pathog*, 2020, 16(3), e1008444.
- [2] López-Lara *et al.* *Environ Microbiol*, 2018, 20, 2049-2065.
- [3] Wippel and Long. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2019, 32, 717-728.

Funding

Grant PID2021-123540NB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”. C.C.-H. is supported by grant FPU23/03069 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Cell cycle regulation by the *Sinorhizobium meliloti* small RNA NfeR1

José I. Jiménez Zurdo, **Natalia I. García-Tomsig**, Sabina K. Guedes-García

Estación Experimental del Zaidín, CSIC (Granada).

Contacto: natalia.garcia@eez.csic.es

The nitrogen-fixing root nodule symbioses between rhizobia and legume plants involve a wide genetic and metabolic reprogramming of rhizobia from the free-living state in soil to morphologically differentiated bacteroids into nodules. To date, the genetic regulation of this transition has been almost exclusively attributed to proteins. However, post-transcriptional regulation by small RNAs (sRNAs) is expected to play major roles in the establishment of these mutualistic symbioses. NfeR1 (Nodule Formation Efficiency RNA) is a nitrogen stress-induced sRNA that is also upregulated during all stages of the symbiotic interaction, and its loss-of-function compromises nodule development and overall symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa roots (Robledo *et al.* 2017; García-Tomsig *et al.* 2023).

Here, we used MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) to decipher the post-transcriptional regulon of NfeR1. This approach revealed a group of candidate target mRNAs related to cell division and bacteroid differentiation, whose regulation by NfeR1 was experimentally confirmed. Remarkably, NfeR1 overexpression seemingly arrests cell elongation, whereas nitrogen stress-induced Y-shaped bacteria display aberrant morphologies in cells lacking NfeR1. Interestingly, we also found that NfeR1 targets the dual-function sRNA SmelC549, which encodes a small peptide of yet unknown function, referred to as SEPr6. NfeR1 represses SEPr6 translation whilst promoting SmelC549 processing to a shorter stable transcript. SmelC549 knockout promotes NfeR1 accumulation, recapitulating the morphology phenotypes of NfeR1 overexpressing cells. Together, our findings anticipate novel roles of the negative NfeR1-SmelC549 feedback loop in the control of cell cycle progression and bacteroid differentiation in the legume symbiont *S. meliloti*.

References

1. Robledo, M. *et al.* 2017. *Environ. Microbiol.* 19, 2661-2680.
2. García-Tomsig N.I. *et al.* 2023. *mBio* 14(6), e0200323.

This work was supported by grant PID2020-114782GB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Understanding the molecular basis of *Sinorhizobium fredii* HH103-soybean compatibility conferred by NopM effector

Ana María Cutiño, Paloma Requena Martín, María López Beltrán, Francisco Javier López Baena, Jose María Vinardell, Francisco Javier Ollero, María del Rosario Espuny, Catherine Nancy Jacott, Pablo del Cerro

Universidad de Sevilla.

Contacto: acutino@us.es

To establish nitrogen-fixing symbiosis with host legumes, rhizobial bacteria must bypass the plant immune system. Similar to plant pathogenic bacteria, many rhizobial strains suppress plant defenses by delivering effector proteins into host cells via the Type III Secretion System (T3SS). However, these protein effectors do not always suppress plant immunity. Plants have evolved host resistance (R) genes that can directly or indirectly recognize T3SS effectors, blocking bacterial infection through the activation of effector-triggered immunity (ETI). The molecular mechanisms by which plants recognize rhizobial effectors remain poorly understood. *Sinorhizobium fredii* HH103 is a promiscuous strain symbiotically compatible with the agronomically important soybean cultivar William 82 (W82). We hypothesize that HH103's symbiotic compatibility and nodulation phenotypes are driven by evolutionary processes involving the recognition of T3SS-secreted effectors.

Our goal is to investigate the role of the HH103 NopM effector in the soybean host. Using a loss-of-function mutant strain, we observed a significant reduction in nodule number in W82 plants compared to those inoculated with the wild-type strain. Additionally, we confirmed that NopM contains a signal peptide in its terminal region that facilitates secretion through the T3SS.

To identify NopM's role during symbiosis, we have identified its targets in W82 through yeast two-hybrid screenings and IP-mass spectrometry analyses. This work has revealed a list of candidate targets, including R proteins, nodule development-related genes, and ethylene-response transcriptional regulators, that might be relevant for root-nodule symbiosis.

Previous work revealed that NopM acts as a ubiquitin-ligase enzyme (E3), suggesting that NopM may bind these targets and mediate their degradation through the ubiquitin–proteasome system. Future work will elucidate the precise molecular mechanisms by which NopM facilitates symbiosis in nodule development. Understanding the molecular mechanisms of NopM in symbiosis could be relevant for enhancing legume-rhizobia interactions in agriculture.

Extracellular membrane vesicle-encapsulated Auxin Transporter (AuxT) enhances the symbiotic performance of *Sinorhizobium fredii* HH103

Natalia Moreno de Castro¹, Paula Ayala García¹, Irene Jiménez Guerrero¹, Susanne Sievers²,
Francisco Pérez Montaña¹, José Manuel Borrero de Acuña¹

¹Universidad de Sevilla.

²University of Greifswald.

Contacto: nmdecastro@us.es

Rhizobia are a group of proteobacteria capable of establishing symbiosis with legumes. In this process, rhizobia infect the roots of these plants and induce the formation of a new organ called nodule, where rhizobia differentiate into bacteroids, that fix atmospheric nitrogen into ammonium. This nutrient is supplied to the legumes in exchange for carbon and other compounds. The symbiosis starts with a molecular dialogue between both partners: root exudates from legumes that contain flavonoids are sensed by rhizobia, that in exchange, secrete Nod factors, which are signal molecules that trigger different responses in the legumes, as root hair curling and nodule organogenesis. The establishment and maintenance of this molecular dialogue throughout all symbiotic stages is also sustained by other players including surface polysaccharides, protein secretion systems, quorum sensing molecules and extracellular membrane vesicles (MVs). MVs are lipidic conveyors detached from the cell surface that exchange biomolecules between host and microbe.

This research interrogates the role of MV-contained proteins in the later stages of the symbiotic process. Proteomic and immunodetection analyses of MVs originated from bacteroids of soybean infected with *S. fredii* HH103, revealed the presence within the MV cargo of an auxin transporter i.e. AuxT. We performed comprehensive studies on AuxT encompassing structural and functional *in silico* analyses, symbiotic phenotype assessment upon mutagenesis of the encoding gene, MV-AuxT mediated auxin reuptake examination and localization of MV-encapsulated AuxT by fluorescence microscopy. Collectively, our results indicate that AuxT plays a crucial role in phytohormone sequestration, which is essential for optimal symbiotic interactions between *S. fredii* HH103 and soybean.

Funding: EMERGIA20_00048; PID2021-122395OA-I00; FPU20/06902

Proteomic analysis of *Rhizobium tropici* CIAT 899 reveals *lalB* as a potential effector in symbiosis with legumes

Irene Herrero Gómez¹, Paula Ayala García¹, Susanne Sievers², Irene Jiménez Guerrero¹, Sebastián Acosta Jurado¹, José Manuel Borrero de Acuña¹, Francisco Pérez Montaña¹

¹University of Seville.

²University of Greifswald.

Contacto: iherrero-ibis@us.es

The symbiotic relationship between rhizobia and leguminous plants results in nitrogen-fixing nodules in plant roots. Within these nodules, rhizobia convert atmospheric nitrogen into a form usable by the plant, enhancing soil fertility and reducing reliance on synthetic fertilizers. The symbiotic partners establish a complex molecular dialogue exchanging Nod factors (NFs), flavonoids, secreted proteins, and extracellular membrane vesicles (EVs), among others. EVs are lipidic vessels detached from the surface of bacteria and eukaryotes. EVs are attracting attention in the field of plant-microbe interactions as they carry bioactive molecules, including proteins, between symbiotic partners. We aim to dissect the EV-mediated crosstalk between *Rhizobium tropici* CIAT 899 and its legume host, *Phaseolus vulgaris*. To this end, we performed proteomic analyses of the CIAT 899 secretome and EVs, identifying numerous proteins of potential interest in the symbiotic dialogue. Among them, invasion associated locus B (*lalB*) was selected for further inspection due to its potential role in enhancing root colonization and infection by rhizobia. Bioinformatic analyses revealed that *lalB* harbors an N-terminal signal peptide, and it is encoded within a Type 5 Secretion System (T5SS) operon, suggesting its potential role as an effector. This protein secretion system is involved in host invasion, immune modulation, and pathogenesis. The presence of *lalB* in both extracellular vesicles and the secretome hints at a dual secretion mechanism, one facilitated by the T5SS and the other by extracellular vesicles. Current experiments involve interactomic studies to identify plant proteins interacting with *lalB*. Simultaneously, bacterial colonization assays are underway to assess the root colonization abilities of the wild-type bacteria and the *lalB* mutant. Additionally, immune response assays are being conducted to determine whether *lalB* modulates immune signaling in *P. vulgaris*, providing insights into its potential role in symbiotic interactions.

Funding: EMERGIA20_00048; PID2021-122395OA-I00, FPU21/06452, EMBO Scientific Exchange Grant 10886.

Identification and characterization of T6SS effectors in *Pseudomonas ogarae* F113

David Vázquez-Arias¹, David Durán¹, Patricia Bernal², Miguel Redondo-Nieto¹, Rafael Rivilla¹, Marta Martín¹

¹Universidad Autónoma de Madrid.

²Universidad de Sevilla.

Contacto: david.vazqueza@estudiante.uam.es

Pseudomonas ogarae F113 is a model rhizobacterium with biocontrol capability, essentially through antimicrobial mechanisms involving the production of antibiotic and antifungal compounds. The genome of *P. ogarae* F113 encodes three Type Six Secretion Systems (T6SSs), a bacterial nanomachine involved in interbacterial competition named as: F1-, F2- and F3-T6SSs, and additional five orphan VgrG complex unrelated to specific T6SS clusters. An *in silico* and proteomic analysis of F113 revealed genes encoding ten T6SSs effectors, some with their immunity protein, associated either with the T6SSs operons or with orphan the 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*). In the case of *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 effectors *tfe6*, *tfe7*, *tfe8*, *tfe9* and *tfe10*. *Tfe8* contains a MatE domain that might disrupt the membrane of the target cells, 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. *Tfe9* seems to have an immunity protein and unknown function. Tfe10 is orthologue to *Salmonella typhimurium* Tae4 (type VI amidase effector) without an immunity protein. Analysing the secretome of the wild-type strain and T6SSs mutants allowed us to determine that Tfe1, Tfe2, Tfe3, Tfe7, Tfe9 and Tfe10 are secreted by F1-T6SS. A rhizosphere colonization analysis and bacterial killing assays with the different T6SSs reveal the critical importance of these elements for rhizosphere adaptation.

Funded by MICIN FEDER/EU Grant PID2021-125070OB-I00. David Vázquez has been granted by FPI-UAM program (SFPI/2021-00458).

***Ralstonia solanacearum* genes required for soil survival and rhizosphere microbiome establishment**

Mercedes Rocafort¹, Qingshan Zhang¹, Marc Reyes¹, Myrto Kostareli¹, Marc Valls¹, Yue Yin², Adam³, Ville-Petri⁴, Marc Valls¹

¹CRAG.

²University of Helsinki.

³Deutschbauer.

⁴Friman.

Contacto: mercedes.rocafort@cragenomica.es

Ralstonia solanacearum is the causal agent of bacterial wilt, an emerging disease that affects more than 200 crop species, including many economically important crops such as tomato. This soil-borne pathogen infects plants through natural root wounds and spreads to the xylem vessels, causing the characteristic wilting symptoms. Despite its economic importance, there are no efficient control methods against this disease. One promising source of resistance is the rhizosphere microbiota that surrounds the plant roots, which has been shown to serve as the first layer of defence against soil-borne pathogens. Although the importance of the plant microbiome in plant health has been widely recognized, the mechanisms by which pathogens establish and manipulate the rhizosphere microbiota remain unclear. Here, we used genome-wide screening studies and transcriptomics to identify candidate genes required to survive in the soil and to interact with the rhizosphere microbiota. Notably, one key pathway identified is phenylacetic acid degradation pathway. We show through targeted gene deletions of each step in this metabolic pathway that it is crucial for bacterial survival in the soil. Specifically, the phenylacetic acid pathway enables the bacterium to cope with environmental stresses such as oxidative stress and desiccation. Given that the soil is a critical niche for disease establishment and a reservoir for future outbreaks, understanding the strategies used by the pathogen for niche establishment is key to develop novel methods for disease control.

Disentangling plant colonization at the genomic level

Marta Torres¹, Adam Deutschbauer², Gabriella Pessi¹, Inmaculada Sampedro Quesada³, Inmaculada Llamas³, Leo Eberl¹

¹University of Zurich, Switzerland.

²Lawrence Berkeley National Laboratory.

³Universidad de Granada.

Contacto: marta.torres@botinst.uzh.ch

The diverse community of soil microorganisms inhabiting the rhizosphere plays an important role in plant nutrition and protection against pathogens. Consequently, promoting plant growth by harnessing the soil microbiome stands as a promising and sustainable alternative to agrochemicals. In order to increase crop yield and quality, numerous efforts have aimed at better understanding how plant colonization by soil bacteria is shaped. One needed step is having a genome-wide map of fitness determinants involved in plant colonization by a given bacterium, which offers a starting point for future actions such as the targeted improvement of plant colonization capabilities of beneficial bacteria, or the development of protection strategies against plant pathogens.

Despite the great advances in our understanding of bacterial plant colonization, the extent to which factors such as plant growth substrate, abiotic and biotic stresses influence the fitness molecular mechanisms enabling bacteria to efficiently colonize plants remains poorly understood. To evaluate how genes that are important for plant colonization are influenced by such factors we use a genome-wide approach called randomly barcoded transposon mutagenesis sequencing (RB-TnSeq) in *Paraburkholderia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Variovorax* and *Rhizobium* species.

Altogether, our results show that RB-TnSeq is a useful tool to find functions for poorly annotated genes and discover novel plant colonization genes. We demonstrate that this approach can robustly define subtle colonization differences across conditions and that bacterial fitness for plant colonization is strongly influenced by different factors, notably plant growth substrate. Globally, our data shows the importance of considering how different parameters impact bacterial fitness in plant colonization studies. This is specially relevant when the aim is to identify fitness genes to design more effective rhizosphere management strategies or engineer strains to improve their plant colonization efficiency.

Iniciación al estudio de la interacción entre el agente causal de la muerte regresiva y el aguacate

Lucía Guirado Manzano¹, Dolores Fernández Ortuño¹, Emilio Guirado Sánchez¹, David Sarmiento Sarmiento², Antonio de Vicente Moreno³, Francisco M. Cazorla López¹, Clara Pliego Prieto⁴, Eva Arrebola Díez¹

¹Departamento de Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", IHSM-UMA-CSIC, Málaga.

²Departamento Técnico de TROPS-SAT 2803, El Trapiche, Málaga.

³Departamento de Microbiología y Patología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

⁴Departamento de Genómica y Biotecnología, Unidad Asociada IHSM-IFAPA-Málaga.

Contacto: luguirado@uma.es

El aguacate es uno de los cultivos subtropicales más importante de la Península Ibérica y su producción en España se concentra mayoritariamente en la provincia de Málaga y la costa tropical de Granada. Uno de los principales desafíos para su producción es la enfermedad conocida como muerte regresiva de rama causada en esta ocasión mayoritariamente por especies del género *Neofusicoccum*, y cuyo síntoma principal es la muerte de ramas completas, incluyendo las yemas florales y frutos. El conocimiento de los mecanismos de infección del patógeno es importante a la hora de diseñar y evaluar métodos de control. Por ello estamos llevando a cabo ensayos de susceptibilidad/tolerancia en diferentes variedades de aguacate frente a *Neofusicoccum parvum*, *N. luteum* y *Lasiodiplodia theobromae*. Además, estamos realizando ensayos de incidencia de la enfermedad frente a distintos estreses abióticos para el análisis del grado de influencia de la situación de estrés sobre la gravedad en el desarrollo de la muerte regresiva.

Por otro lado, en este estudio se está llevando a cabo un análisis transcriptómico de la interacción de *Neofusicoccum luteum* con rama y fruto de aguacate comparándolos con su crecimiento en medio de cultivo. Entre los genes sobreexpresados en la interacción hongo/rama/fruto se identificaron genes relacionados con la producción de micotoxinas, degradación de pared, detoxificación de compuestos nocivos, degradación de proteínas y proteínas efectoras candidatas, tres de las cuales mostraron una probabilidad del 100% (Effector P3) y localización apoplástica.

Este trabajo ha sido financiado por los acuerdos 806/60.5345 y 806/60.5952 suscrito entre la Universidad de Málaga y la empresa del sector productivo del aguacate TROPS SAT-2803. Proyectos RTA2017-00040 y AVA2019.008 cofinanciado por fondos FEDER y Junta de Andalucía.

***Burkholderia alba* is a new nodule endophyte of *Phaseolus vulgaris* that in consortium with *Rhizobium leucaenae* enhances nodule development and plant growth.**

Sara Pérez-González¹, Manuel J. Gilabert¹, Antonio M. de Ron², Ana P. Rodiño², Germán Tortosa¹,
María J. Delgado¹

¹Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

²Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC).

Contacto: sara.perez@eez.csic.es

Rhizobia-legume symbiosis is able to perform biological nitrogen (N₂) fixation, offering an alternative in sustainable agriculture. This process reduces the dependence on synthetic fertilisers, which are associated with water pollution and emissions of the greenhouse gas nitrous oxide (N₂O). To improve the sustainable production of bean crops, the objective of this work was the identification of new endosymbionts with an efficient symbiotic N₂ fixation (SNF) and reduced N₂O emissions. Using the “trap-plant” method, two strains were isolated from soil samples from the MBG-CSIC and partially identified by 16S rRNA gene sequencing as *Burkholderia alba* and *Rhizobium leucaenae*. First, the ability of these isolates to emit or reduce N₂O under free-living conditions was investigated. Subsequently, the symbiotic efficiency of *B. alba* and *R. leucaenae* was evaluated by inoculating seeds of the Matterhorn bean variety. As inoculants we used each strain individually and co-inoculated, utilising *Rhizobium etli* as a positive control. After plant growth, physiological parameters related to SNF were analysed. Furthermore, the production of indole acetic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, and the capacity for phosphate solubilisation in the isolated strains was assessed, emphasising their significance to promote plant growth.

Our results show that *B. alba* and *R. leucaenae* do not emit N₂O. Moreover, plants inoculated with the *B. alba*+ *R. leucaenae* consortium increased plant and nodule biomass and exhibited higher nitrogen content than plants inoculated with *R. etli* or *R. leucaenae*. Therefore, we propose *B. alba* as a new common bean endophyte that, co-inoculated with *R. leucaenae* promotes nodule development and, consequently, N₂ fixation. This advantage may be due to the plant growth promoting properties of *B. alba*. Hence, this consortium is presented as a promising biofertiliser, enhancing plant growth while minimising environmental impact.

This research was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”, grant PID2021-1240070B-100.

La inoculación de plantas de zarzamora con la bacteria endofítica *Rhizobium* sp. CRRU65 mejora el perfil fenólico de las moras y aumenta la producción del cultivo en condiciones de invernadero.

Rocío Roca Couso^{1,2}, José David Flores Félix^{1,2}, Begoña Ayuda Durán³, Rebeca Ferreras Charro³, Ignacio García Estévez³, Paula García Fraile^{1,2,4}, Raúl Rivas^{1,2,4}

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

²Institute for Agribiotechnology Research (CIALE), Salamanca.

³Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca.

⁴Unidad Asociada, USAL-CSIC (IRNASA), Salamanca.

Contacto: rociroca@usal.es

La aplicación de bacterias endofíticas pertenecientes al género *Rhizobium* representa una estrategia prometedora para mejorar la productividad agrícola y el contenido nutricional de los cultivos. En este estudio evaluamos el impacto de la inoculación de plantas de zarzamora con la bacteria endofítica *Rhizobium* sp. CRRU65 en la producción de frutos y en la composición en compuestos fenólicos de los mismos. Estos compuestos están relacionados con el potencial antioxidante de las moras, por lo que en este trabajo estudiamos también el efecto de las moras en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

Los ensayos en invernadero mostraron que la inoculación con *Rhizobium* sp. CRRU65 incrementó significativamente el número de frutos producidos. La composición en compuestos fenólicos de los frutos fue analizada mediante HPLC-DAD-MS, lo que mostró un aumento en la concentración de la sustancia H6 en los frutos obtenidos de las plantas inoculadas.

Para evaluar el potencial impacto de estas moras en un organismo vivo, analizamos el efecto de la exposición del organismo modelo *Caenorhabditis elegans* a los extractos de mora en condiciones de estrés térmico como reflejo del estrés oxidativo. Los nemátodos expuestos a los extractos de moras recogidas de plantas inoculadas mostraron una supervivencia significativamente mayor que la de los nemátodos control. Por último, analizamos la expresión genética de varios genes involucrados en la tolerancia al estrés térmico en el nemátodo. Los resultados mostraron la sobreexpresión del gen del factor de transcripción SKN-1 y del gen de la proteína de choque térmico HSP-16 en los nemátodos expuestos a los extractos de moras recogidas de las plantas inoculadas.

En conclusión, la inoculación de plantas de zarzamora con *Rhizobium* sp. CRRU65 mejora tanto la producción de zarzamora como el contenido en compuestos fenólicos de los frutos, lo cual parece impactar en las características bioactivas de los frutos.

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

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

¹Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid.

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

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

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

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

Contacto: isaac.maestro@uam.es

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

Rol de enzimas con actividad aldehído deshidrogenasa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en *Pseudomonas*

Adrián Pintado¹, Antonio Arroyo-Mateo¹, Victoria Pastor², Víctor Flors², Luis Rodríguez-Moreno¹, Cayo Ramos¹

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

²Metabolic Integration and Cell Signalling Group, Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I (UJI), Campus del Riu Sec, Castelló de la Plana.

Contacto: apintado@uma.es

El ácido indol-3-acético (IAA) es una fitohormona perteneciente al grupo de las auxinas cuya síntesis está ampliamente distribuida entre bacterias asociadas a plantas. En la bacteria fitopatógena *Pseudomonas savastanoi* la producción de IAA es un factor de virulencia clave que contribuye al desarrollo de tumores o excrescencias en la parte aérea de plantas leñosas. Esta especie se clasifica en cinco patovares: savastanoi (Psv, olivo), nerii (Psn, adelfa), retacarpa (Psr, retama), fraxini (Psf, fresno) y mandevillae (Psm, mandevilla). Excepto Psf, todas las cepas de *P. savastanoi* producen IAA mediante la ruta de la indol-3-acetamida (operón *iaaMH*), utilizando el triptófano (Trp) como precursor. Estudios previos han demostrado que un mutante Psv $\Delta iaaMH$ reduce drásticamente los niveles de IAA producidos. Sin embargo, esta cepa mutante aún produce cantidades de IAA comparables a las detectadas en Psf o *P. syringae* pv. tomato (Pto) DC3000, carentes de estos genes. Recientemente, se identificó en Pto una ruta de síntesis de IAA, mediada por proteínas con actividad aldehído deshidrogenasa, que catalizan la formación de IAA a partir de indol-3-acetaldehído (IAAld). En este trabajo se ha demostrado que la producción de IAA en Psv $\Delta iaaMH$ podría depender de una ruta similar. En cultivos suplementados con Trp, se detectó una acumulación diferencial de compuestos indólicos, como IAAld. El análisis bioinformático identificó genes *ald* que codifican proteínas aldehído deshidrogenasa homólogas a las descritas en Pto, mientras que estudios transcriptómicos revelaron una regulación inducida por Trp de estos. Por último, un análisis genómico comparativo a nivel del género *Pseudomonas* demostró que las rutas asociadas a proteínas aldehído deshidrogenasa están ampliamente distribuidas en bacterias productoras de IAA, independientemente de su ecología. Este trabajo sugiere que la biosíntesis de IAA mediada por aldehído deshidrogenasas es un mecanismo metabólico conservado dentro del género *Pseudomonas*, aunque estas enzimas no están especializadas en su síntesis.

***Pseudomonas syringae* lipopolysaccharide synthesis gene *wbpL* displays heterogeneous expression within *in vitro* and in *planta* populations**

Laura Mancera-Miranda, José S. Rufián, Nieves López-Pagán, Javier Ruiz-Albert, Carmen R. Beuzón

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga.

Contacto: lauramm@uma.es

Phenotypic heterogeneity usually refers to phenotypic variation not associated to genetic variation, nor induced by environmental stimuli. The phenotypic heterogeneity processes described for some complex bacterial traits is causing a shift on how bacterial phenotypes are studied, from traditional assessments by averaging populations to single-cell analysis focused on bacterial individual phenotypes and how these distribute within the population. The structure of the lipopolysaccharide (LPS) layer on the outer membrane in gram-negative bacteria is often subjected to phase variation, a form of phenotypic variation critical for virulence in animal pathogens. Here, we apply single-cell expression analyses to *wbpL*, a conserved *Pseudomonas syringae* glycosyltransferase-encoding gene essential for the synthesis of the o-antigen component of LPS.

We show that expression of *wbpL* displays phenotypic heterogeneity in *P. syringae* pv. phaseolicola growing in rich medium, reaching bistable expression in minimal media, where the population splits into WbpLON and WbpLOFF subpopulations. In planta, *wbpL* expression is also heterogeneous, displaying intermingled ON/OFF with comparable viability. Finally, we followed expression of *wbpL* within the spatial context of apoplastic microcolonies. detecting heterogeneity within each microcolony, but also found that microcolonies displayed overall differences in fluorescence intensity that correlated size, with smaller microcolonies displaying higher levels of *wbpL* expression.

Clonación y purificación de dominios de antígenos de *Xylella fastidiosa* ampliamente conservados en diferentes cepas, involucrados en viabilidad y formación de biofilm para el desarrollo de una terapia amplia frente al patógeno.

Francisco José Mancebo Pascual, Rubén Izquierdo, Cristina Valls, **Gaspar Pérez Martínez**

IATA (CSIC)

Contacto: fj.mancebo@iata.csic.es

Xylella fastidiosa es una bacteria limitada al xilema de plantas, capaz de infectar una amplia variedad de especies, provocando entre otras, la enfermedad de Pierce en la vid, la clorosis variegada de los cítricos o el síndrome de declive rápido del olivo. En la Unión Europea, *X. fastidiosa* figura como fitopatógeno de cuarentena. Desde el primer brote detectado en el sur de Italia en 2013 *X. fastidiosa* ha ido propagándose de manera muy rápida afectando ya a 174 hospedadores, 25 de los cuales fueron identificados por primera vez en 2021 (Trkulja et al., 2022).

En este trabajo se describe la metodología de selección, clonación, expresión y purificación de tres dominios proteicos de superficie conservados en distintas cepas de *X. fastidiosa* con el objetivo de emplearlos para la selección de ligandos scFV que reconozcan estos antígenos, y permitan facilitar la entrega de compuestos antibacterianos en plantas infectadas. El dominio OmpA de la proteína MopB el cual participa en la agregación célula a célula, la adhesión a la superficie y la formación de biopelículas, lo que la hace muy importante para la virulencia de *X. fastidiosa* (Chen et al., 2017). La región conservada de PilA, una proteína pequeña secretada por sistema secretor tipo IV que permite a la bacteria moverse dentro de los vasos del xilema en contra del flujo (Kandel et al., 2018) y XadA1 que sirve para fijarse a las superficies sólidas de la planta (Lee et al., 2020). Nuestros resultados indican la unión de manera diferencial de estos antígenos a proteínas de superficie de *Xylella*. El empleo de regiones conservadas de *Xylella*, podría mejorar el desarrollo de una terapia que cubriera un mayor número de cepas, debido a la gran variabilidad genética y capacidad infectiva que presenta en distintos huéspedes.

Effect of diesel contamination on bacterial populations in a pristine soil during rhizoremediation

Pieter van Dillewijn, Irene Hurtado, Lázaro Molina, Zulema Udaondo, Félix Velando, Ana Segura

Departamento de Biotecnología y Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, CSIC.

Contacto: pieter.vandillewijn@eez.csic.es

Contamination by hydrocarbons such as diesel is a major concern requiring efficient clean up strategies. Rhizoremediation is a technology which could offer solutions to eliminate diesel from contaminated soil. With the aim to determine which bacterial populations help plants to grow and restore contaminated sites, we study the changes in rhizosphere and bulk soil bacterial populations induced in a natural soil when faced with an upset with diesel and how the presence of white clover (*Trifolium repens*) apart or together with perennial ryegrass (*Lolium perrene*) speeds up diesel removal from soil. Here we present our results with regard to the disappearance of aromatic components of diesel in an outdoor microcosm experiment under the different conditions over time. Also, using 16S rRNA amplicon sequencing of metagenomic DNA extracted from each condition tested, we follow how bacterial populations respond to the presence and absence of diesel, or to presence of the plants in bulk soil or the rhizosphere. We show the differences observed in alpha and beta diversity of the bacterial communities under each condition. We also identify bacterial taxa affected by the different conditions by determining which of the most abundant ASVs (amplicon sequence variants) are differentially affected using LefSe, ANCOM and heatmap analysis.

Funding: This study was supported by grant PID2020-116766GB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe” and by grant TED2021-129398B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and by the “European Union NextGenerationEU/PRTR”.

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

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

¹Microbial Systems Biology laboratory ENS KOUBA, Algeria.

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

Contacto: belloutimanel@correo.ugr.es

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

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

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

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

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

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

Alejandro Arce-Rodríguez

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

Contacto: aarce1@us.es

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

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

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

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

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

Contacto: khashiurahman@usal.es

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

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

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

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

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

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

Contacto: amaliaroca@ugr.es

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

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

El potencial del desierto aplicado a la agricultura

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

¹Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

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

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

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

Contacto: marinagarcia Gomez@usal.es

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

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

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

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

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

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

Contacto: jgomes@itqb.unl.pt

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

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

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

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

Contacto: dkozikova@alumni.unav.es

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

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

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

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

Contacto: tamara.sanchez@uva.es

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

Molecular responses of chestnut to *Phytophthora cinnamomi* infection

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

¹MBG, sede Santiago, CSIC

²Vivero de Maceda, TRAGSA

Contacto: conchi@mbg.csic.es

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

Estrategias adaptativas de PGPR en la rizosfera

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

Estación Experimental del Zaidín. CSIC

Contacto: manuel.espinosa@eez.csic.es

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

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

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

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

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

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

Contacto: ffuentesr@us.es

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

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

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

Reference:

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

Funding:

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

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

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

Departamento de microbiología. Facultad de biología. Universidad de Sevilla

Contacto: mari.san.ag@gmail.com

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

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

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

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

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla

²Hebrew University of Jerusalem

³Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla

Contacto: dgrodriguez@us.es

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

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

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

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

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

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

Contacto: juan.lopezraez@eez.csic.es

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

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

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

Pósteres

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

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

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

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

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

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

Contacto: esthermenendez@usal.es

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

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

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

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

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

Contacto: ines.rromao@itqb.unl.pt

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

Analysis of the type VI secretion system in pea nodulating rhizobia

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

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

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

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

Contacto: nassim.chafiqi@um5r.ac.ma

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Contacto: zitlalpopocahz@gmail.com

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

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

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

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

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

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

Contacto: asousa@itqb.unl.pt

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

Construction of a c-di-GMP biosensor for Rhizobiaceae

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

¹Soil and Plant Microbiology Department, Zaidin Experimental Station

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

³Department of Biology, Philips-Universität Marburg

Contacto: pedro.pacheco@eez.csic.es

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

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

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

References:

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

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

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

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

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

Contacto: JulioAscaso@usal.es

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

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

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

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

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

Universidad de Valladolid

Contacto: jorge.poveda@uva.es

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

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

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

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

²Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

Contacto: josemariabarcia Piedras@gmail.com

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

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

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

Referencias:

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

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

Financiación:

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

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

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

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

²Tragsa, Empresa de Transformación Agraria, Delegación de Valencia

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

Contacto: ruben.izquierdo@iata.csic.es

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

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

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

¹Universidad de Sevilla

²Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences

³IFAPA-Las Torres

Contacto: cjacott@us.es

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

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

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

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

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

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

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

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

Contacto: dcorrea@ugr.es

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

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

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

¹Universidad de Málaga.

²Estación Experimental del Zaidín-CSIC.

³IHSM-CSIC-UMA.

⁴UCSD.

Contacto: luisacarregalo@uma.es

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

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

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

Polyamines, new players in the microbe-induced pest resistance

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

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

²Superior Polytechnic School of Zamora, University of Salamanca.

³Biochemistry and Biotechnology Group, Universitat Jaume I.

Contacto: ivan.fernandez@csic.es

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

Levaduras, miles de años facilitando la vida al ser humano

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

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

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

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

Contacto: b42lulec@uco.es

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

Symbiotic microorganisms meet medicinal plants: accident or arrangement?

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

¹Microbiology and Genetics Department, University of Salamanca.

²School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University.

Contacto: zhubo@zcmu.edu.cn

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

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

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

Desarrollo de herramientas microbianas para control de cultivos estratégicos

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

¹SEIPASA.

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

Contacto: cizquierdo@seipasa.com

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

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

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

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

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

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

²Institute of Microbiology, Technische Universität Braunschweig, Germany.

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

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

Contacto: payala@us.es

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

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

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

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

Seipasa.

Contacto: idelcastillo@seipasa.com

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

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

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

Bacterias metanotrofas contra el estrés hídrico en plantas

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

¹Universidad de Granada.

²VitaNtech Biotechnology.

Contacto: manzanera@ugr.es

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

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

A novel ANL tomato transcription factor regulates mycorrhiza induced resistance

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

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

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

Contacto: beatriz.romero@eez.csic.es

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

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

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

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

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

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

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

Contacto: alberto.pedrerom@usal.es

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Contacto: saray.santamaria@upm.es

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

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

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

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

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

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

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

²Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdisNA).

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

Contacto: sestarriagan@unav.es

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

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

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

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

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

¹Universidad de Salamanca.

²IRNASA-CSIC.

Contacto: jdflores@usal.es

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

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

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

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

¹Universidad de Sevilla.

²Durham University.

Contacto: raqthu@alum.us.es

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

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

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

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

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

Universidad de Sevilla.

Contacto: ijimgue@us.es

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

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

Funding

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

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

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

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

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

Contacto: blancarui_@uma.es

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

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

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

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

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

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

Contacto: raroa@eez.csic.es

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

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

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

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

Contacto: sabina.guedes@eez.csic.es

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

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

References

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

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

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

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

¹Universidad de Valladolid.

²CSIC.

Contacto: jorge.poveda@uva.es

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

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

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

¹Estación Experimental del Zaidín (EEZ), CSIC.

²Instituto Ciencias Agrarias, CSIC.

Contacto: socorro.mesa@eez.csic.es

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

⁴The Ohio State University (EEUU).

Contacto: elizabet.monteagudo@eez.csic.es

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

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

Iron modulates the development and function of arbuscular mycorrhiza

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

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

Contacto: nuria.ferrol@eez.csic.es

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

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

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

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

¹CRAG.

²Universitat de Barcelona.

Contacto: marcvals@ub.edu

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

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

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

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

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

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

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

¹Universidad de Guanajuato

²Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria

Contacto: ej.medranoespino@ugto.mx

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