



I Congresso Luso-Espanhol de Fixação de Azoto XII Reunião Nacional da Sociedade Espanhola de Fixação de Azoto (SEFIN)

*Fundamentos e aplicações agronómicas e ambientais
da fixação de azoto e microrganismos
benéficos para as plantas*

I Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)

*Fundamentos y aplicaciones agronómicas y ambientales
de la fijación de nitrógeno y microorganismos
beneficiosos para las plantas*

Organizam/Organizan

INRB, I.P.
Instituto Nacional
dos Recursos Biológicos, I.P.



Estoril - Portugal

1 a 4 de Junho de 2008

1 - 4 Junio, 2008

**I Congresso Luso-Espanhol de Fixação de Azoto
XII Reunião Nacional da Sociedade Espanhola
de Fixação de Azoto (SEFIN)**

*Fundamentos e aplicações agronómicas e ambientais da fixação de
azoto e microrganismos benéficos para as plantas*

**I Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno
XII Reunión Nacional de la Sociedad Española
de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)**

*Fundamentos y aplicaciones agronómicas y ambientales de la fijación de
nitrógeno y microorganismos beneficiosos para las plantas*

Estoril-Cascais, Portugal
1 - 4 de Junho/Junio de 2008

Organizam/Organizan:



INRB, I.P.
Instituto Nacional
dos Recursos Biológicos, I.P.

*Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)
Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, INRB, Portugal*

Livro de Resumos do I Congresso Luso-Espanhol de Fixação de Azoto e XII Reunião Nacional da Sociedade Espanhola de Fixação de Azoto, Estoril-Cascais, Portugal, 1-4 de Junho de 2008.

Libro de Resúmenes del I Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno y XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Estoril-Cascais, Portugal, 1-4 de Junio de 2008.

Página web: <http://www.docecongresosefin.com>

Contacto: sefin@ugr.es

Desenho e manutenção da página web/
Diseño y mantenimiento de la web: Margen

Edição do livro/Edición del libro: Paula Fareleira, Belén Rodelas
Composição gráfica do livro/Maquetación libro: Belén Rodelas
Desenho da capa/Diseño portada: Paula Sá-Pereira
Impressão/Impresión: SanPrint S.L. (Granada, España)

© Os autores/Los autores, 2008

COMISSÃO ORGANIZADORA / COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENTE

Dra. Isabel Videira e Castro
Instituto Nacional dos Recursos Biológicos. Oeiras, Portugal.

VICE-PRESIDENTES / VICEPRESIDENTES

Dr. Eugénio Ferreira
Instituto Nacional dos Recursos Biológicos. Oeiras, Portugal.

Dr. Eulogio J. Bedmar
Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada, España.

TESOUREIROS / TESOREROS

Dra. Helena Machado
Instituto Nacional dos Recursos Biológicos. Oeiras, Portugal.
Dra. María Jesús Delgado Igeño
Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada, España.

SECRETÁRIOS / SECRETARIOS

Dra. Paula Fareleira
Instituto Nacional dos Recursos Biológicos. Oeiras, Portugal.
Dra. Belén Rodelas
Universidad de Granada. Granada, España.

VOGAIS / VOCALES

Dra. Amélia Loução
Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal.
Dra. Carmen Lluch
Universidad de Granada. Granada, España.
Dr. José António Matos
Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação- INETI, Lisboa, Portugal.
Dr. Manuel Megías
Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
Dra. Etelvina Figueira
Centro de Biologia Celular, Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal.
Dr. Rafael Rivilla
Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
Dra. Paula Sá Pereira
Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação- INETI, Lisboa, Portugal.
Dr. F. Javier Gutierrez-Mañero
Universidad San Pablo-CEU. Madrid, España.
Dra. Dulce Nombre Rodríguez-Navarro
IFAPA, Junta de Andalucía. Sevilla, España.

COMISSÃO CIENTÍFICA / COMITÉ CIENTÍFICO

Dra. Adília Oliveira

Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. Portugal.

Dra. Solange Oliveira

Universidade de Évora. Évora, Portugal.

Dra. Ana Ribeiro

Instituto de Investigação Científica Tropical. Lisboa, Portugal.

Dra. Cristina Cruz

Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal.

Dra. Fernanda Simões

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação-INETI. Lisboa, Portugal.

Dr. Miguel Ángel Caviedes

Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

Dr. Jesús González-López

Universidad de Granada. Granada, España.

Dr. Antonio J. Palomares

Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

Dr. Tomás Ruiz-Argüeso

Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.

Dr. Manuel Becana

Estación Experimental Aula Dei. CSIC. Zaragoza, España.

Dr. Nicolás Toro

Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada, España.

COMISSÃO CIENTÍFICA DE HONRA / COMITÉ CIENTÍFICO DE HONOR

Dr. José Figueiredo Marques

Agradecimentos/Agradecimientos

A Comissão de Organização agradece o apoio institucional recebido do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (INRB) e da Ordem dos Biólogos, bem como da Sociedade Espanhola de Fixação de Azoto (SEFIN), para a realização deste Congresso.

El Comité Organizador agradece el apoyo institucional recibido del Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (INRB) y de la Ordem dos Biólogos, así como de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), para la realización de este Congreso

Entidades colaboradoras

Câmara Municipal de Cascais
Câmara Municipal de Sintra
Embaixada de Uruguai-Lisboa
Fertiprado

Fundação para a Ciência e a Tecnologia, MCTES, Portugal
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, España
Ministerio de Ciencia e Innovación, España
Secretaría General Iberoamericana (SEGIB)
Sociedade Portuguesa de Microbiologia

*À memória de Antonio Palomares, um grande companheiro e um cientista de corpo e alma,
de quem todos guardamos boas recordações.*

No dia 19 de Novembro de 2007, faleceu o Professor António Palomares, que dedicou a sua vida à Ciência e em particular ao estudo da Fixação Biológica de Azoto. A sua inesgotável energia, o seu entusiasmo e a sua competência científica foram qualidades fundamentais que contribuíram para a vitalidade da Sociedade Espanhola de Fixação de Azoto (SEFIN), de que era um dos sócios fundadores. O seu carácter aberto, a sua simpatia e humanidade permitiram-lhe estabelecer um campo de relações diverso e extenso, contribuindo a sua presença para o sucesso e dinamismo de reuniões científicas e congressos em que tivemos o privilégio da sua participação. O António era um homem culto, afável, sensível e atencioso para com todos e de uma grande sabedoria, criada ao longo de uma vida intensa que lhe proporcionou uma experiência bem mais rica que a esperável no escasso tempo que lhe foi concedido.

A sua recordação permanecerá para sempre nos nossos corações.
Obrigado, António. Até sempre.

A la memoria de Antonio Palomares, un gran compañero y un científico de cuerpo y alma, de quien todos guardamos buenos recuerdos.

El día 19 de noviembre de 2007, falleció el Profesor Antonio Palomares, que dedicó su vida a la ciencia y en particular al estudio de la Fijación Biológica de Nitrógeno. Su inagotable energía, su entusiasmo y su competencia científica fueron cualidades fundamentales que contribuyeron a la vitalidad de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), de la que era uno de los socios fundadores. Su carácter abierto, su simpatía y humanidad le permitieron establecer un campo de relaciones diverso y extenso, contribuyendo su presencia al éxito y dinamismo de las reuniones científicas y congresos en los que tuvimos el privilegio de su participación. Antonio era un hombre culto, afable, sensible y atento con todos, y de gran sabiduría, alimentada a lo largo de una vida intensa que le proporcionó una experiencia mucho más rica que la anticipada por el escaso tiempo que le fue concedido.

Su recuerdo siempre permanecerá en nuestros corazones.
Gracias, Antonio. Hasta siempre.

Índice

Apresentação/Presentación	<i>xí</i>
Conferências plenárias/Conferencias plenarias:	1
CP-1. Sensitivity of <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i> to metals accumulating in soils from long-term sewage sludge applications. McGrath, S., Chaudri, A., Gibbs, P., Chambers, B., Carlton-Smith, C., Bacon, J., Campbell, C., and Aitken, M.	3
CP-2. Fijación biológica de nitrógeno y sostenibilidad de los sistemas productivos. Especial referencia a Uruguay. Labandera, C.	4
CP-3. Uma visão geral da regulação da fixação de nitrogênio nos diazotrofos associativo <i>Azospirillum brasilense</i> e endofítico <i>Herbaspirillum seropedicae</i> . Pedrosa, F.O., Rigo, L.U., Steffens, M.B.R., Yates, M.G., Monteiro, R.A., Chubatsu, L.S., Cruz, L.M., Huergo, L.F., Merrick, M., Klassen, G., Wasseem, R., e Souza, E.M.	5
Sessão I /Sesión I	7
<i>Aplicações agronómicas e ambientais</i>	
<i>Aplicaciones agronómicas y ambientales</i>	
Conferências temáticas/Conferencias temáticas:	
CTI-1. Ingeniería genética de la simbiosis <i>Rhizobium-leguminosa</i> para su uso en biorremediación. Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Lafuente, A., Delgadillo, J., Dary, M., Doukkali, B., Caviedes, M.A., y Palomares, A.J.	9
CTI-2. A fixação biológica do azoto e a produtividade das pastagens em sistemas agrícolas Mediterrânicos. Ferreira, E., e Videira e Castro, I.	10
Comunicações/Comunicaciones:	
SI-1. Respuesta de la soja [<i>Glycine max</i> (L.) Merrill] cv. Osumi a la inoculación con estirpes de <i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>) <i>fredii</i> en el sur de España. Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., y Temprano, F.J.	11
SI-2. Recuperação de inóculo e distribuição de nódulos em cultivares de trevo subterrâneo. Alho, L., Dias, L.S., e Marques, J.F.	12
SI-3. Rizobios tolerantes a salinidad y alcalinidad de suelos de la Pampa Deprimida del Salado representan una fuente de variabilidad genética y simbiótica para mejorar la calidad de los inoculantes para <i>L. tenuis</i> . Bergottini, V.M., Castagno, L.N., Paz, R. C., Ruiz, O.A., y Estrella, M.J.	13
SI-4. Variação sazonal da fixação simbiótica de duas espécies de <i>Lupinus</i> sujeitas a diferentes práticas de preparação do solo. Carranca, C, Madeira, M., Torres, M.O., Pina, J.P., e Marques, P.	14
SI-5. Producción de bioplásticos (PHAs) por cepas de <i>Azotobacter</i> utilizando un residuo orgánico semisólido generado en el proceso de obtención del aceite de oliva: <i>alpeorujo</i> . Cerrone, F., Sánchez-Peinado, M., Pozo, C., y González-López, J.	15

SI-6. Impacto de la interacción de inoculantes de <i>Azospirillum</i> y micorrizas en la productividad de cereales. Collados, C., y Barea, J.M.	16
SI-7. Análisis comparado, ecológico <i>versus</i> convencional, de parámetros biológicos del suelo en dos plantaciones de ciruelos. Daza, A., García-Galavís, P.A., Camacho, M., Montero-Calasanz, M.C., Casanova, L., y Santamaría, C.	17
SI-8. Tolerância ao stress de estirpes de sinorizóbio isoladas de luzernas anuais. Fareleira, P., Matos, N., Marques, J.F., e Ferreira, E.	18
SI-9. Caracterización agrofisiológica de la simbiosis <i>Rhizobium-Phaseolus</i> en diferentes niveles de fósforo. Ghoulam, C., Bargaz, A., Mandri, B., Oufdou, K., Faghire, M., Lluch, C., Tejera Garcia, N., y Herrera-Cervera, J.A.	19
SI-10. Efeito da inoculação com <i>Pisolithus tinctorius</i> na sobrevivência de plântulas micropropagadas de <i>Arbutus unedo</i> L. Gomes, F., Santos, V. Sorzabalbere, I., Ponce Díaz, A., San Martin, E.P., e Canhoto, J.M.	20
SI-11. Estudios de "consorcios de biocontrol" frente a la infección de plantas de arroz por <i>Magnaporthe grisea</i> en Las Marismas del Guadalquivir. Megías, E., Ojeda, J., Del Castillo, I., Delgado, F., Montes, F., Bellogín, R., Gutierrez-Mañero, F.J., y Megias, M.	21
SI-12. Estimulación del enraizamiento, elongación y colonización de raíces en plantas modelo mediante la inoculación de bacterias PGPR productoras de auxinas. Montero-Calasanz, M.C., Santamaría, C., Daza, A., y Camacho, M.	22
SI-13. Aplicación de compost y té de compost en alubia (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su implicación en el establecimiento de la simbiosis con <i>Rhizobium</i> . Mulas, D., Blanco, D., Hernández S., y González-Andrés, F.	23
SI-14. Caracterização de estirpes de <i>Sinorhizobium meliloti</i> isoladas de diferentes variedades de <i>Medicago sativa</i> . Rodrigues, S., Ferreira, E., Figueira, E., e Videira e Castro, I.	24
SI-15. Inoculación de consorcios microbianos en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. involucrados en protección frente a estreses abióticos moderados. Rodríguez-Navarro, D.N., Albareda, M., y Temprano, F.	25
SI-16. Diversidad genética y rango de hospedador en rizobios aislados de leguminosas de interés agronómico de Castilla-La Mancha. Ruiz-Diez, B., Fajardo, S., Morcillo, C., Grijalbo, L., y Fernández-Pascual, M.	26
SI-17. Sistemas microbianos biolixiviadores: caracterização de consórcios. Sá-Pereira, P., Duarte, J.C., e Anselmo, A.	27
SI-18. Efecto del suministro de NH_4^+NO_3 en la respuesta de plantas de alfalfa noduladas al aumento del CO_2 . Sanz Sáez de Jáuregui, A., Irigoyen, J. J., y Sánchez-Díaz, M.	28
SI-19. Inoculantes para tréboles de pastos de dehesa. Temprano, F.J., Rodríguez-Navarro, D.N. y Albareda, M.	29
SI-20. Caracterização de estirpes eficazes de <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lotus</i>) em solos poluídos. Videira e Castro, I., Sá-Pereira, P., Simões F., Matos, J., e Ferreira, E.	30

Sessão II / Sesión II**31****Ecologia, diversidade e evolução****Ecología, diversidad y evolución****Conferências temáticas/Conferencias temáticas:**

- CTII-1. Biodiversidad de bacterias con capacidad formadora de nódulos en leguminosas. Rivas, R., Velázquez, E., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., y Martínez-Molina, E. 33
- CTII-2. Diazotrofia e diversidade microbiana: do isolamento em cultura à metagenómica. Tenreiro, R. 34

Comunicações/Comunicaciones:

- SII-1. Biodiversidad de bifenilo-dioxigenasas en suelo y rizosfera de un sitio contaminado por PCBs. Aguirre de Cárcer, D., Martín, M., y Rivilla, R. 35
- SII-2. Avaliação da diversidade de rizóbios de grão-de-bico em Portugal revela grande variedade de espécies. Alexandre, A., Brígido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S., e Oliveira, S. 36
- SII-3. Caracterización molecular de la película taponante en membranas acopladas a un reactor anaerobio. Calderón, K., Cabirol, N., González-López, J., y Noyola, A. 37
- SII-4. Aislamiento y caracterización genotípica de endosimbiontes de *Cytisus triflorus*. Chahboune, R., Barrijal, S., y Bedmar, E.J. 38
- SII-5. El simbiosoma de altramuz desde la perspectiva de la evolución de los orgánulos celulares. Coba de la Peña, T., Fedorova, E., Santamaría, R., Lucas, M.M., y Pueyo, J.J. 39
- SII-6. Diversidad bacteriana en la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*) en los bosques de Lomas de Atiquipa (Perú). Cordero, I., Coba de la Peña, T., Rincón, A.M., Villegas, L., Ruiz-Diez, B., Fajardo, S., Morcillo, C., Lucas, M.M., Fernández-Pascual, M., Manrique, E., Jiménez, P., Balaguer, L., y Pueyo, J.J. 40
- SII-7. Comparación de los sistemas de resistencia a As/Sb en especies de *Ensifer*. Dary, M., Pajuelo, E., Gamane D., Lafuente, A., Rodríguez-Llorente, I.D., Doukkali, B., Palomares, A.J., y Caviedes, M.A. 41
- SII-8. Aislamiento de rizobios que nodulan habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) en agrosistemas de montaña de la República Dominicana. Díaz-Alcántara, C., Mulas, D., Velázquez, E., Casquero, P., y González-Andrés, F. 42
- SII-9. Diversidad microbiana en suelos contaminados con metales pesados. Doukkali, B., Pérez-Paniagua F., Dary, M., El Aafi, N., Brhada, F., Filali-Maltouf, A., Gamane D., Caviedes, M.A., Palomares, A.J., y Pajuelo, E. 43
- SII-10. Caracterização genotípica de estirpes de rizóbio isoladas de luzernas anuais por M13-PCR. Dourado, A.C., Alves, P.I., Marques, J.F., Tenreiro, T., Tenreiro, R., Barreto Crespo, M.T., e Fareleira, P. 44
- SII-11. Aplicación de la técnica DGGE en el estudio de la diversidad de *Frankia*. Gallina, O., Valverde, A., González-Tirante, M., Santa Regina, I., e Igual, J.M. 45

SII-12. Evolución de la microbiota en suelos agrícolas con manejo diferenciado, ecológico y convencional, y anulación de la influencia del tipo de manejo por el efecto rizosférico. García-Galavís, P.A., Grande, M.J., Santamaría, C., Herencia, J. F., Ruiz-Porras, J.C., Jiménez, J. A., y Daza, A.	46
SII-13. <i>Robinia pseudoacacia</i> y <i>Mesorhizobium</i> : tal para cual. Gómez-Silván, M.C., Callaway, R., Rodelas, B., González-López J., y Bedmar, E.J.	47
SII-14. Análise filogenética dos genes simbióticos suporta a transferência lateral de genes no género <i>Mesorhizobium</i> . Laranjo, M., Alexandre, A., Rivas, R., Velázquez, E., Young, J.P.W., e Oliveira, S.	48
SII-15. Aislamiento y caracterización de bacterias que nodulan especies del género <i>Lotus</i> procedentes de suelos salinos de la Sierra de Baza (Granada). Lorite, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Olivares, J., y Sanjuán, J.	49
SII-16. Fungos hipógeos associados a arbustos nas regiões interiores de Portugal. Machado, H., Marques, J., Gomes, C., e Ferreira, M.	50
SII-17. Catálogo de bacterias PGPRs asociadas a plantas de arroz. Megias, M., Del Castillo, I., Ojeda, J., Megías, E., Manyani, H., Montes, F., Ollero, F.J., Cubo, M.T., Guasch, B., Espuny, M.R., Bellogín, R., Ramos, B., Lucas, J.A., y Gutierrez-Mañero, F.J.	51
SII-18. Estudo de bactérias diazotróficas num solo contaminado por arsénio. Oliveira, A., Pampulha, M.E., Neto, M.M., e Almeida, A.C.	52
SII-19. Diversidad de hongos micorrícicos asociados a especies endémicas y/o amenazadas de Sierra Nevada. Palenzuela, J., Ruíz-Girela, M., Barea, J.M., y Azcón-Aguilar, C.	53
SII-20. Tolerância à salinidade e eficiência de nodulação em <i>Rhizobium leguminosarum</i> isolado de solos Portugueses com diferentes condições ambientais. Pereira, S., Lima, A., Corticeiro, S., Castro, R., e Figueira, E.	54
SII-21. Estudio de biodiversidad microbiana en suelos de arrozal en las Marismas del Guadalquivir. Romero-Cuadrado, L., Del Castillo, I., Ojeda, J., Megías, E., Barcellos, F., García-Villaraco, A., Manyani, H., y Megías, M.	55
SII-22. Influencia de los sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS) sobre la biodiversidad microbiana de un suelo agrícola. Sánchez-Peinado, M.M., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J., Pozo, C., y Rodelas, B.	56

Sessão III / Sesión III

Interacções plantas-microrganismos

Interacciones plantas-microorganismos

57

Conferências temáticas/Conferencias temáticas:

CTIII-1. Identificación de factores implicados en la colonización de la rizosfera por <i>Pseudomonas</i> . Martín, M., y Rivilla, R.	59
CTIII-2. Papel simbiótico de los polisacáridos superficiales rizobianos. Vinardell, J.M., Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo, J.C., Buendía, A., Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez, M.A., Ollero, F.J., y Ruiz-Sainz, J.E.	60

Comunicações/Comunicaciones:

SIII-1. ¿Es necesaria la capacidad de formar <i>biofilms</i> para la colonización de la rizosfera? Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Martín, M., y Rivilla, R.	61
SIII-2. Caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizosfera de <i>Lotus tenuis</i> . Castagno, L.N., Estrella, M.J. y Ruiz, O.A.	62
SII-3. Identificación de metabolitos exudados por raíces de plantas mediante GC-MS y HPLC-MS/MS. Contreras Sánchez-Matamoras, R., Rodríguez Carvajal, M.A., Manyani H., Megías, M., y Gil Serrano, A.M.	63
SIII-4. Papel simbiótico de los glucanos cíclicos de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103. Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A., Margaret, I., Buendía-Clavería, A., Ollero, F.J., Gil-Serrano, A.M., Ruiz-Sainz, J.E., Lloret, J., y Vinardell, J.M.	64
SIII-5. Estudio de la aplicación de consorcios bacterianos para el control de estrés salino en plantas de arroz. Del Castillo, I., Ojeda, J., Ollero, J., Aguilar, M., y Megías, M.	65
SIII-6. Plasticidad fenotípica en la respuesta a estrés salino por parte de <i>Lotus glaber</i> Mill.: el papel de sus simbiontes micorrízico-arbusculares y rizobianos. Echeverría, L., Scambato, A., Sannazzaro A., Maiale, S., Ruiz, O., y Menéndez, A.	66
SIII-7. Mecanismos implicados en el transporte de nitrógeno en micorrizas arbusculares. Ferrol, N., Pérez-Tienda, J., y Azcón-Aguilar, C.	67
SIII-8. Protección frente a estrés salino por un consorcio bacteriano en plantas de arroz. García Cristóbal, J., Lucas García, J.A., Ramos, B., Barriuso, J., y Gutiérrez Mañero, F.J.	68
SIII-9. Análisis de moléculas implicadas en la percepción de quorum. González Barroso, S., Guasch Vidal, B., Pérez-Montaña, F., Bellogín Izquierdo, R.A., Rodríguez-Carvajal M.A., Gil Serrano, A.M., y Espuny Gómez, M.R.	69
SIII-10. Nodulación de <i>Lotus</i> por cepas de <i>Sinorhizobium meliloti</i> que portan un nuevo grupo de genes simbióticos. León-Barrios, M., Lorite, M.J., Donate-Correa, J., y Sanjuán, J.	70
SIII-11. La proteína NopJ de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 mejora la capacidad simbiótica de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 para nodular soja. López-Baena, F.J., Pérez-Montaña, F., Guasch-Vidal, B., Vinardell, J.M., Cubo, M.T., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., y Ollero, F.J.	71
SIII-12. Caracterización de cepas de <i>Sinorhizobium meliloti</i> competitivas para la colonización y nodulación de alfalfa en condiciones salinas. López-Contreras, J. A., Toro, N., y Fernández-López, M.	72
SIII-13. Un polisacárido de superficie inducible por alta osmolaridad o por simbiosis con <i>Medicago sativa</i> en <i>Sinorhizobium meliloti</i> es constitutivo en <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103. Margaret, I., Reguera, M., Buendía-Clavería, A., Lloret, J., Vinardell, J.M., Bolaños, L., Ruiz-Sainz, J.E., y Bonilla, I	73
SIII-14. A influência de exposições prolongadas a metais pesados na tolerância e na simbiose entre <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>rifolii</i> e o seu hospedeiro. Pereira, S., Castro, I., e Figueira, E.	74

SIII-15. Efecto de la rizodeposición de plantas de arroz y judía sobre bacterias biosensoras de la percepción de quórum. Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, S., Cubo, M.T., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Megías, M., Megías, E., Bellogín, R.A., y Espuny, M.R.	75
SIII-16. Moléculas implicadas en la percepción de quórum en tres estirpes de rizobios. Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, S., Cubo, M.T., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., y Espuny, M.R.	76
SIII-17. Efecto de la inoculación de arroz con bacterias PGPRs aisladas de la Marisma del Guadalquivir. Pérez-Montaño, F., López-Baena, F.J., Guasch-Vidal, B., Cubo, M.T., Bellogín, R.A., Del Castillo, I., Megías, M., Espuny, M.R., y Ollero, F.J.	77
SIII-18. Deficiencia de Boro en la interacción rizobio-leguminosa: ¿simbiosis o patogénesis? Reguera, M., Bolaños, L., y Bonilla, I.	78
SIII-19. Relación del cluster 3 del plásmido pSymb de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 con mecanismos de osmoadaptación y modificaciones de los polisacáridos superficiales en respuesta a hiperosmolaridad. Reguera, M., Buendía-Clavería, A., Martín, M., Rivilla, R., Bolaños, L., Vinardell, J.M., Bonilla, I., Ruiz-Sainz, J.E., y Lloret, J.	79
SIII-20. Implicación de la celulasa CelC2 de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> en la infección secundaria de <i>Trifolium repens</i> . Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J.I., Velázquez, E., Dazzo, F., Martínez, E., y Mateos, P.F.	80
SIII-21. Celulasas y Celulosa de <i>Rhizobium</i> . Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J.I., Rivas, R., Velázquez, E., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., y Mateos, P.F.	81
SIII-22. Actividad de bacterias aisladas de la micosfera de ejemplares de <i>Amanita caesarea</i> sobre el crecimiento micelial de <i>A. caesarea</i> . Santamaría, C., Camacho, M., Grande M.J., Romero de la Osa, L., y Daza, A.	82
SIII-23. Estimulação da nodulação utilizando metabolitos secundários da planta. Simões, F., Possante, M., Mendonça, D., Sá-Pereira, P., e Matos, J.	83
SIII-24. Formación de biofilms en <i>Azospirillum brasilense</i> . Valverde, A., Lerner, A., Igual, J.M., Burdman, S., y Okon, Y.	84
SIII-25 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y biofumigación empleados como métodos agroambientales en el control de <i>Rhizoctonia solani</i> . Sacristán Pérez-Minayo, G., Reguera Useros, J.I., Probanza Lobo, A., García Cristóbal, J., y López Robles, D.J.	85

Sessão IV / Sesión IV

87

Fisiologia e metabolismo

Fisiología y metabolismo

Conferências temáticas/Conferencias temáticas:

CTIV-1. Resposta ao deficit hídrico em <i>Medicago truncatula</i> cv. Jemalong, uma leguminosa modelo. Nunes, C., Araújo, S., Marques da Silva, J., Fevereiro, M.P., e Bernardes da Silva, A.	89
---	----

- CTIV-2. Potencial de la inducción del metabolismo secundario como herramienta biotecnológica para la producción de bioactivos y mejora de los mecanismos de defensa en plantas. Ramos, B., y Gutiérrez Mañero, F.J. 90

Comunicações/Comunicaciones:

- SIV-1. Alteraciones en la producción de bioactivos en *Glycine max* provocados por PGPRs. Algar, E., Ramos, B., Lucas, J.A., García-Villaraco, A., y Gutiérrez Mañero, F.J. 91
- SIV-2. A relação entre o conteúdo em glutatona e a distribuição de cádmio nas células de *Rhizobium leguminosarum*. Corticeiro, S., e Figueira, E. 92
- SIV-3. Un nuevo receptor kinasa de tipo LRR regula la respuesta de las raíces de *Medicago truncatula* en condiciones de estrés salino. De Lorenzo, L., Merchan, F., Thompson, R., Clarke, J., Crespi, M., y Sousa, C. 93
- SIV-4. Respuesta de la simbiosis *Mesorhizobium ciceri*-garbanzo a la sequía. Fatnassi, N., Chedly, A., Bedmar, E.J., y Delgado, M.J. 94
- SIV-5. Fijación de nitrógeno y metabolismo del amonio en plantas de *Medicago sativa*: estrés salino versus estrés hídrico. Gozálvez, M., Lluch, C., y Ocaña, A. 95
- SIV-6. Implicación de la trehalosa y trehalasa en la adaptación al estrés salino en nódulos de leguminosas. López, M., Iribarne, C., Palma, F., Herrera-Cervera, J.A., y Lluch, C. 96
- SIV-7. Efecto del estrés abiótico y del envejecimiento sobre el metabolismo de ascorbato y tioles en nódulos de judía. Loscos, J., Matamoros, M.A., y Becana, M. 97
- SIV-8. A assinatura isotópica do azoto nas bactérias diazotróficas de vida livre. Machado, Z., Cruz, C., e Martins-Loução, M.A. 98
- SIV-9. Efecto del ácido salicílico exógeno en los sistemas antioxidantes de *Medicago sativa* en condiciones de estrés salino. Moreno Linares, E.J., Palma, F., Barranco, J.R., Iribarne, C., y Lluch, C. 99
- SIV-10. Mejora de la respuesta a salinidad en la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* por la aplicación exógena de ABA. Palma, F., Tejera, N.A., Iribarne, C., y Lluch, C. 100
- SIV-11. Glicoproteínas dependientes de boro en el desarrollo de simbiosomas y organogénesis de nódulos. Un modelo para un papel común del boro en el desarrollo vegetal y animal. Reguera, M., Redondo-Nieto, M., Bolaños, L., y Bonilla, I. 101
- SIV-12. Respuestas antioxidantes inducidas por ácido salicílico y NaCl en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*. Tejera, N.A., Palma, F., López, M., y Lluch, C. 102

Sessão V/Sesión V

103

Genética e genómica

Genética y genómica

Conferências temáticas/Conferencias temáticas:

- CTV-1. RNAs no codificantes en los endosimbiontes diazotróficos: identificación y caracterización funcional. Jiménez-Zurdo J.I., Torres-Quesada, O., Del Val, C., Rivas, E., Oruezabal, R., Rivilla, R., y Toro, N. 105

CTV-2. Influencia del estrés abiótico en la interacción entre las plantas y los microorganismos beneficiosos. Manyani, H.	106
---	-----

Comunicações/Comunicaciones:

SV-1. Homeostasis de níquel en <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UPM791. Brito, B., Prieto, R.I., Cabrera, E., Hidalgo, A., Imperial, J., Palacios, J.M., y Ruiz-Argüeso, T.	107
SV-2. Descripción de una línea mutagenizada de garbanzos (<i>Cicer arietinum</i>) caracterizada fenotípicamente como bajo-nodulante. Chamber Perez, M.A., Aguado Puig, A., Daza Ortega, A., y Pajuelo, E.	108
SV-3. Estudio de los genes <i>nod</i> de <i>Ensifer fredii</i> HH103 implicados en la secreción de los factores de nodulación. García Trigueros, C., Dardanelli, M.S., Manyani, H., y Megías, M.	109
SV-4. Estudio del papel del gen <i>nodD1</i> de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 en el establecimiento de la simbiosis. González-Luque, JM., Espuny, M.R., Guasch-Vidal, B., Camacho, M., Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Estevez, J., Sousa, C., Megías, M., y Manyani, H.	110
SV-5. Estudio comparativo de mutantes de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 afectados en la síntesis de los factores de nodulación en condiciones de estrés salino. Guasch-Vidal, B., Rodríguez-Rosado, A.I., Pérez-Montaña, F., Cubo, M.T., Camacho, M., Albareda, M., López-Baena, F.J., Manyani, H., Ollero, F.J., van Brussel, A.A.N., Megías, M., Bellogín, R.A., y Espuny, M.R.	111
SV-6. Caracterización del mutante Cp9 de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 incapaz de sintetizar factores de nodulación en condiciones de estrés salino y ausencia de apigenina. Guasch-Vidal, B., Rodríguez-Rosado, A.I., Pérez-Montaña, F., Cubo, M.T., Camacho, M., Albareda, M., López-Baena, F.J., Manyani, H., Ollero, F.J., Megías, M., Bellogín, R.A., y Espuny, M.R.	112
SV-7. Características simbióticas de los mutantes <i>rkpJ</i> y <i>rkpU</i> de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103. Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo, J.C., Buendía, A., Moreno, J., Rodríguez, M.A., Lloret, J., Ruiz-Sainz, J.E., y Vinardell, J.M.	113
SV-8. El gen <i>rkpM</i> de la región <i>rkp-3</i> de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 no sólo está involucrado en la biosíntesis del KPS sino también en la del LPS. Margaret, I., Bolaños, L., Buendía-Clavería, A., Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A., Lloret, J., Moreno, J., Reguera, M., Rodríguez Carvajal, M.A., Vinardell, J.M., y Ruiz-Sainz, J.E.	114
SV-9. Tres rutas de señalización regulan negativamente la movilidad de <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113. Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Antequera, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., y Martín, M.	115
SV-10. Identificación de dos nuevos genes implicados en la transferencia conjugativa del pSymA en <i>Sinorhizobium meliloti</i> . Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Soto, M. J., Olivares, J., y Sanjuán, J.	116
SV-11. Caracterización funcional de una fitoquelatina sintasa inusual de <i>Lotus japonicus</i> . Ramos, J., Naya, L., Gay, M., Abián, J., y Becana, M.	117

SV-12. Organización transcripcional de la región encargada de codificar la síntesis del flagelo en <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113. Redondo-Nieto, M., Lloret, J., Larenas, J., Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., y Martín, M.	118
SV-13. Análisis de la relevancia de proteínas de exportación Tat-dependiente en <i>Rhizobium leguminosarum</i> . Rey, L., Abad, J., Vega, R.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., y Palacios, J.M.	119
SV-14. Genes de plantas envolvidos em simbioses actinorrízicas. Ribeiro, A., Graça, I., Santos, P., Fortunato, A., Liang, J., Gouveia, M., e Pawlowski, K.	120
SV-15. Sistemas de resistência a metais pesados em <i>Mesorhizobium loti</i> : o operão arsenato. Sá-Pereira P., Pereira, J., e Videira e Castro, I.	121
SV-16. Análisis simbiótico y transcriptómico del operón máster <i>visNR</i> del regulón flagelar de <i>Sinorhizobium meliloti</i> . Soto, M.J., Scharf, B., Schmitt, R., Cuéllar, V., Sanjuán, J., y Olivares, J.	122
SV-17. Análise filogenética de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de <i>Biserrula pelecinus</i> . Vicente, C., Pérez-Fernández, M., Pereira, G., Costa, R., Tavares-de-Sousa, M.M.	123
Índice de Autores	125
Programa	129

Apresentação

Bem-vindos ao I Congresso Luso-Espanhol de Fixação de Azoto e XII Reunião Nacional da Sociedade Espanhola de Fixação de Azoto (SEFIN).

Este evento constitui a primeira organização conjunta de investigadores portugueses e espanhóis que se têm dedicado à fixação biológica de azoto e de um modo geral aos microrganismos benéficos para as plantas. A investigação deste tema requer a participação de distintas áreas de investigação e por isso o programa científico do congresso cobre os diversos campos necessários ao estudo destes sistemas, desde a agronomia e ecologia, à microbiologia, bioquímica e biologia molecular, enfatizando os principais domínios em que as actividades de investigação e desenvolvimento (I&D) encontram aplicações relevantes. Para que isso fosse possível, as Comissões de Organização e Científica participaram na construção de um Programa Científico de grande qualidade e actualidade. O Congresso constará de Conferências Plenárias, proferidas por cientistas de reconhecido prestígio internacional e de Conferências Temáticas apresentadas por investigadores especialistas em distintos campos da fixação biológica de azoto, bem como de um leque de comunicações orais seleccionadas a partir dos trabalhos submetidos para apresentação no Congresso.

É com satisfação que anunciamos que o nível de participação a esta convocatória respondeu às expectativas, tendo a comunidade científica portuguesa ligada à fixação de azoto e aos microrganismos benéficos para as plantas aderido a esta organização conjunta com a SEFIN, que tradicionalmente conta com um nível elevado de participantes. Antecipamos por isso um evento capaz de espelhar a actualidade, a qualidade e a diversidade da investigação realizada nas áreas científicas representadas, que irá certamente incrementar o estreitamento das relações científicas entre investigadores do espaço Ibérico.

A comissão Organizadora espera que as expectativas nela depositadas sejam cumpridas e deseja-lhe uma participação verdadeiramente agradável e frutuosa.

Isabel Videira e Castro

Presidente da Comissão Organizadora

Presentación

Bienvenidos al Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno y XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

Este evento constituye la primera organización conjunta de investigadores españoles y portugueses dedicados a la fijación de nitrógeno y de modo más general a los microorganismos beneficiosos para las plantas. La investigación en este tema requiere de la participación de distintas áreas de investigación, y por ello el Programa Científico del Congreso cubre los distintos campos necesarios para el estudio de estos sistemas, desde los ámbitos de la agronomía, ecología, microbiología, bioquímica y biología molecular, y con especial énfasis en aquellas actividades de investigación y desarrollo (I+D) que encuentran aplicaciones relevantes. Para hacerlo posible, el Comité Organizador y el Comité Científico han colaborado en el diseño de un Programa Científico de alta calidad y actualidad. El Congreso constará de varias Conferencias Plenarias, impartidas por científicos de reconocido prestigio internacional, de Conferencias Temáticas, presentadas por investigadores especialistas en los distintos campos de la fijación biológica de nitrógeno, así como de un grupo de ponencias orales seleccionadas a partir de las comunicaciones recibidas para su presentación en el Congreso.

Nos satisface anunciar que el nivel de participación en esta convocatoria ha respondido plenamente a nuestras expectativas, tras involucrarse la comunidad científica portuguesa ligada a la fijación biológica de nitrógeno y a los microorganismos beneficiosos para las plantas en la organización conjunta con la SEFIN, que tradicionalmente cuenta con un elevado nivel de participantes. Anticipamos por eso un evento capaz de reflejar la actualidad, calidad y diversidad de la investigación realizada en las áreas científicas representadas, que ciertamente incrementará el estrechamiento de las relaciones científicas entre los investigadores del espacio ibérico.

El Comité Organizador confía en que las expectativas en ellos depositadas se hayan cumplido y les desea una participación agradable y fructífera.

Isabel Videira e Castro

Presidenta del Comité Organizador

Conferências plenárias
Conferencias plenarias

CP-1

Sensitivity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to metals accumulating in soils from long-term sewage sludge applications.**McGrath, S.^{1*}, Chaudri, A.¹, Gibbs, P.², Chambers, B.², Carlton-Smith, C.³, Bacon, J.⁴, Campbell, C.⁴, and Aitken, M.⁵**

¹Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, UK; ²ADAS Gleadthorpe, Meden Vale, Mansfield, NG20 9PF, UK; ³WRC plc, Frankland Road, Blagrove, Swindon, SN5 8YF, UK; ⁴Macaulay Institute, Craigiebuckler, Aberdeen, AB15 8QH, UK; ⁵Scottish Environment Protection Agency, Erskine Court, Castle Business Park, Stirling, FK9 4TR, UK. *steve.mcgrath@bbsrc.ac.uk

There is concern as to whether metals in sewage sludge are deleterious to soil microbial processes and sustainable long-term agricultural productivity. Nine field sites with sewage sludge cake experiments were set up across Britain during the period 1994-1997 to try to answer this question. One key aspect of the design of these experiments was that in all the treatments apart from control (untreated) the total amount of sludge and organic matter added to the plots was the same. Therefore, any effects are not due to the N supply, and in fact uniform yearly applications of inorganic fertiliser nitrogen began soon after sludge applications ceased in 1997. In addition, at three of the sites, metal-amended liquid sludge experiments were set up using an uncontaminated liquid sludge was divided up and treated in tanks with Zn or Cu or Cd sulphates before use on the field. At the same three sites, metal salts experiments using Zn or Cu or Cd carbonates were set up to give the same concentration range, but with no added organic material.

This study reports on the effects of Zn, Cu and Cd on the indigenous population size of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, a nitrogen fixing symbiont of clovers, in soils from these experiments over an 11 year period. Previous work has shown that the effects on rhizobia are most clear when the host (clover) is excluded from the experiments, and this was done here to study the effects on the natural population size. Impacts on the population took time (years) to develop and by 2005 significant ($P < 0.05$) reductions in rhizobial numbers occurred on the Zn metal dose-response treatments at eight of the sludge cake sites. The exception was a calcareous site with high soil pH (7.4-8.1) in which metal bioavailability was low. Few consistent effects were evident on the Cu- or Cd-metal dose-response treatments during the 11 y monitoring period. The soil total Zn concentrations at which effects were observed were near to the UK statutory limit of 300 mg kg⁻¹ for soils of pH 6-7 receiving sewage sludge. No significant reductions occurred in any treatments on the metal-amended liquid sludge or inorganic metal salt experiments even though the metals would be expected to be in a more bioavailable form, for example, as measured in NH₄NO₃ extracts, even after 11 years. The effects in the sludge cake experiments were related consistently to increased soil Zn concentrations, with no recovery to date. The reductions in clover rhizobial numbers in the sludge cake experiments are thought to be due to Zn effects on the survival of free-living rhizobia in the soil, with gradual die-off over a long time. To date, no consistent adverse effects on rhizobia have been seen at the UK limits for Cu and Cd of 135 mg kg⁻¹ and 3 mg kg⁻¹, respectively for soils of pH 6-7.

CP-2

Fijación biológica de nitrógeno y sostenibilidad de los sistemas productivos. Especial referencia a Uruguay.

Labandera, C.*

*Secretario Ejecutivo Permanente de ALAR.*clabandera@adinet.com.uy*

El trabajo refiere a las actividades en fijación biológica de nitrógeno (FBN) y uso de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas del Departamento de Microbiología de Suelos (DMS) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay. Se discute la visión institucional de esta tecnología y su impacto en la sostenibilidad. El DMS se creó en los 60 para estudiar el impacto del uso de inoculantes en el establecimiento, productividad y persistencia de las leguminosas forrajeras en el país. Debido al éxito de la propuesta el programa se extendió a otras actividades por la ampliación de la base forrajera, la inserción de la soja en el mercado, y el interés por el estudio de otros sistemas de promoción de crecimiento de las plantas, en particular, bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en arroz y rizosféricas en maíz. La institución es el organismo de referencia para el registro de empresas y productos y para el control de calidad de los inoculantes, y responsable de la colección nacional de cepas. Las actividades se implementan en laboratorio, invernáculo y campo con alta participación del sector productivo en la evaluación de los resultados. Se destaca la importancia de definir criterios y parámetros acertados de selección y el uso de diseños experimentales acordes con los sistemas en estudio. También resulta muy significativo para la adopción el diseño de una investigación a "medida" y la difusión de un mensaje único a los productores. Este enfoque y la alta respuesta al uso de inoculantes han posibilitado un porcentaje de adopción cercano al 100%.

The biological nitrogen fixation and the sustainability of the productive systems. Special reference to Uruguay. This paper refers to activities in biological nitrogen fixation (FBN) and in the use of plant growth promoting microorganisms performed by the Soils Microbiology Department (DMS) – Ministry of Livestock, Agriculture and Fisheries – Uruguay. The institutional vision on the importance of this technology and its impact on the sustainability are discussed. The Department (DMS) was founded in 1960 to study the importance of legume inoculation in the establishment, productivity and persistence of forage legumes in the country. As a result of the success of this proposal the program was extended to other systems because of the increase in the number of forage species, the insertion of soybean in the market, and because of the increased interest in the studies of other plant growth promotion systems, mainly endophytic nitrogen fixing bacteria in rice and rhizospheric in corn. The institution is the reference organism for the firms and products registration and for the inoculants quality control, and responsible for the national strain culture collection. Activities are performed in laboratory, greenhouse and field with high participation of the productive sector in the evaluation of the results. The importance to define qualified criteria and parameters for strain selection and the use of experimental designs according to the studied systems are remarked. It is also very important for adoption the design of a "pragmatic research" and the spreading of only one message to the farmers. This approach and the high response to the use of inoculants have made possible an almost 100% adoption.

CP-3

Uma visão geral da regulação da fixação de nitrogênio nos diazotrofos associativo *Azospirillum brasilense* e endofítico *Herbaspirillum seropedicae*.

Pedrosa, F.O.*, Rigo, L.U., Steffens, M.B.R., Yates, M.G., Monteiro, R.A., Chubatsu, L.S., Cruz, L.M., Huergo, L.F., Merrick, M., Klassen, G., Wassem, R., e Souza, E.M.

*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C. Postal 19046, 81532-990 - Curitiba, PR, Brasil. *fpedrosa@ufpr.br*

A. brasilense, uma α -Proteobacteria associativa, e *H. seropedicae*, uma β -Proteobacteria endofítica, são bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal, encontradas colonizando importantes culturas agrícolas tais como cana de açúcar, milho, sorgo, trigo e arroz, e tem sido nosso interesse de pesquisa desde que 1977. Nesta palestra apresentarei uma revisão geral sobre a regulação da fixação de nitrogênio por ambos organismos e sobre o genoma de *H. seropedicae*. A regulação da expressão dos genes *nif* em *A. brasilense* e *H. seropedicae* envolve primordialmente o controle da expressão e atividade do regulador de transcrição, a proteína NifA. A expressão do gene de *nifA* em *A. brasilense* parece ser constitutiva e transcrito de um promotor dependente de sigma70, insensível a íons amônio, embora amônio e oxigênio ajam sinergisticamente de modo negativo. Ao contrário de *A. brasilense*, a transcrição do gene de *nifA* de *H. seropedicae* está sob controle de um promotor dependente de sigma54 e NtrC, portanto com envolvimento do sistema de Ntr. A atividade de NifA em ambos organismos é controlada negativamente por amônio e oxigênio. O efeito de amônio sobre a atividade de NifA é mediado por proteínas PII (GlnB ou GlnK) e tem com alvo o N-terminal de NifA. A inativação de NifA por oxigênio em ambos diazotrofos, como em rizobia, parece envolver resíduos de cisteína conservados, presentes nas regiões Central-C- terminal. Atividade da nitrogenase em *A. brasilense*, como em outras Rhodospirillales, é reversivelmente inativada *in vivo* por NH_4^+ ou anaerobiose. A inativação ocorre via ADP-ribosilação da Fe-Proteína (dinitrogenase redutase) catalisada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT) e é revertida, após o esgotamento de NH_4^+ pela glycohydrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DraG). O controle das atividades de DraT e DraG pelas proteínas PII (GlnB e GlnZ) e canal de amônio (AmtB) foi recentemente revelado, e o mecanismo envolve o seqüestro de DraG por AmtB ligado à membrana, tendo GlnZ como elemento de ligação. Um mecanismo adicional de inibição transitória da nitrogenase por NH_4^+ , provavelmente envolvendo desvio de elétrons ou despolarização da membrana, é também operacional em *A. brasilense*, *H. seropedicae* (que não contem os para DraT e DraG) e em outros diazotrofos. Inativação reversível da nitrogenase de *A. brasilense* por anaerobiose envolve ADP-ribosilação da Fe-Proteína, mas nenhuma proteína PII. O genoma de *H. seropedicae* estirpe Z78 foi sequenciado e anotado pelo consórcio Genopar. O tamanho de genoma é de aproximadamente 5.5 Mbp. A identificação automática de ORFs potenciais seguida de análise manual revelou um total de 4.720 genes. O genoma o *H. seropedicae* mostrou alta similaridade com os de outras β - Proteobacteria especialmente *Janthinobacterium* sp. Marseille, *Ralstonia* spp. e *Burkholderia* spp. Uma avaliação do genoma de *H. seropedicae* será apresentada.

An overview on the regulation of nitrogen fixation in the associative and endophytic diazotrophs *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. *A. brasilense*, an associative α -Proteobacteria, and *H. seropedicae*, an endophytic β -Proteobacteria, are nitrogen-fixing and plant-growth promoting bacteria, found colonizing important crops such as sugarcane, maize, sorghum, wheat and rice, and have been our research interest since 1977. In this talk I will present an overview on the regulation of nitrogen fixation by both organisms and on the genome of *H. seropedicae*. Regulation of the expression of *nif* genes in *A. brasilense* and *H. seropedicae* involves primarily the control of expression and activity of the transcription regulator, the NifA protein. Expression of the *nifA* gene in *A. brasilense* appears to be constitutive and transcribed from a sigma 70-dependent promoter, insensitive to ammonium ion levels, although ammonium and oxygen act synergistically in a negative way. Contrary to *A. brasilense*, in *H. seropedicae* *nifA* gene transcription is under control of a sigma54-, NtrC-dependent promoter, thus with the involvement of the Ntr system. NifA activity in both organisms is negatively controlled by ammonium and oxygen. The ammonium effect on NifA activity is mediated by PII proteins (GlnB or GlnK) and target at the N-terminus of NifA. NifA inactivation by oxygen in both diazotrophs, as in rhizobia, appears to involve conserved cysteine residues present in the Central-C-terminal region. Nitrogenase activity in *A. brasilense*, as in other Rhodospirillales, is reversibly inactivated *in vivo* by NH_4^+ or anaerobiosis. Inactivation occurs via ADP-ribosylation of the Fe-protein (dinitrogenase reductase) catalysed by dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and is reversed after NH_4^+ exhaustion by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (DraG). Control of DraT and DraG activities by PII (GlnB and GlnZ) and ammonium channel (AmtB) proteins has been recently revealed and the mechanism involves sequestration of DraG by membrane-bound AmtB, with GlnZ as a bridging element. An additional mechanism of transient inhibition of nitrogenase by NH_4^+ , probably involving membrane depolarization and/or diversion of electron, is also operational in *A. brasilense*, *H. seropedicae* (which lacks the ADP-ribosylation system) and other diazotrophs. Reversible inactivation of *A. brasilense* nitrogenase by anaerobiosis involves ADP-ribosylation of the Fe-protein, but no PII proteins. The genome of *H. seropedicae* strain Z78, was sequenced and annotated by the Genopar consortium. The genome size is approximately 5,5 Mbp. Potential ORF's identified by automatic annotation platform and manual curation revealed a total of 4,720 genes. The genome the *H. seropedicae* showed high similarity to those of other β -Proteobacteria, especially *Janthinobacterium* sp. Marseille, *Ralstonia* spp. and *Burkholderia* spp. An appraisal of the genome of *H. seropedicae* will be presented.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) e SETI Paraná Estado.

SESSÃO I / SESIÓN I

Aplicações agronómicas e ambientais

Aplicaciones agronómicas y ambientales

CTI-1

Ingeniería genética de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa para su uso en biorremediación.

Pajuelo, E.*, Rodríguez-Llorente, I.D., Lafuente, A., Delgadillo, J., Dary, M., Doukkali, B., Caviedes, M.A., y Palomares, A.J. ^(†)

(†) *In memoriam*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Profesor García González, 2, 41012-Sevilla. epajuelo@us.es*

La biotecnología de plantas permite ampliar la utilización de las plantas más allá de la producción de alimentos y fibras, en lo que se ha dado en llamar “agricultura molecular”. Una de las principales aplicaciones de esta tecnología es la fitorremediación. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se ha utilizado tradicionalmente en la regeneración de suelos degradados, dada su capacidad para enriquecer el nitrógeno de los suelos, y más recientemente está despertando un interés creciente en biorremediación. Nuestro grupo lleva varios años trabajando en la aplicación de la simbiosis entre diferentes géneros de leguminosas y *Rhizobium* resistentes a As y metales pesados como una nueva herramienta para la biorremediación de metales pesados. Las leguminosas acumulan As y metales pesados fundamentalmente en raíces, por lo que su uso preferente sería en fitoestabilización de metales. La inoculación con *Rhizobium* y un consorcio de bacterias rizosféricas resistentes a As y metales pesados produjo un efecto protector sobre la planta, disminuyendo la acumulación de metales. Se ha diseñado una estrategia biotecnológica para incrementar la capacidad de fitoextracción de Cu a la parte aérea de la planta, mediante la introducción de genes de resistencia a Cu bacterianos modificados bajo el control de promotores específicos. Al mismo tiempo se ha diseñado la modificación genética de *Rhizobium* para incrementar su resistencia a Cu. Presentamos datos preliminares de la capacidad de biorremediación de esta “simbiosis modificada genéticamente” frente a la simbiosis silvestre.

The design of genetic traits through plant biotechnology allows the use of plants far beyond the production of food and fibers. Molecular farming expands the use of plants to the production of compounds, biofuels or their use in phytoremediation. Legumes have been traditionally used in soil regeneration, given their capacity to increase soil nitrogen content due to biological nitrogen fixation in nodules. More recently, legumes are getting an increasing interest in bioremediation. Our group has been working for the last years on the *Rhizobium*-legume symbiosis as a new tool in bioremediation of heavy metals polluted soils. Legumes accumulate As and heavy metals mainly in roots, being the main application of these plants in metal phytostabilisation. Furthermore, inoculation of legume plants with *Rhizobium* and a consortium of rhizosphere bacteria resistant to As and heavy metals produced a protective effect on the plant, together with a diminution of metal accumulated. We have developed transgenic plants in order to increase the Cu-phytoextraction potential. Modified bacterial copper resistance genes have been introduced in plants, under the control of tissue specific promoters. On the other hand, copper resistance genes have been transferred to *Rhizobium*, in order to increase copper resistance and/or copper accumulation. Preliminary data on the bioremediation capacity of the “genetically engineered symbiosis” are presented.

CTI-2

A fixação biológica do azoto e a produtividade das pastagens em sistemas agrícolas Mediterrânicos.

Ferreira, E.*, e Videira e Castro, I.

*Laboratório de Microbiologia, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Oeiras, Portugal. *eugeniomferreira@gmail.com*

As zonas mediterrânicas são caracterizadas por verões secos quentes e invernos húmidos e frios. Neste ambiente peculiar das regiões do sul da Península Ibérica, desenvolveu-se um sistema agro-silvopastoril, associado à produção animal em regime extensivo. As pastagens naturais são compostas por uma mistura de plantas anuais e perenes desempenhando as leguminosas um papel fundamental, suportando o pastoreio directo de vacas, ovelhas e de porcos.

Neste ecossistema de sequeiro, a fixação biológica do azoto pelas leguminosas, processo complexo dependente das plantas, bactérias, condições climáticas e propriedades físico-químicas e biológicas do solo bem como da gestão agronómica do sistema, é o principal processo para o fornecimento de azoto aos solos. As leguminosas são aqui uma das componentes fundamentais de uma estratégia para a sustentabilidade e aumento da produtividade deste sistema agrícola.

Referem-se os principais resultados de estudos científicos de importância agronómica, relacionados com a fixação biológica do azoto em pastagens naturais com leguminosas da zona mediterrânica Portuguesa. Sublinham-se os aspectos relacionados com as bactérias *Rhizobium* associadas a trevos, luzernas anuais e luzernas perenes: quantidade e qualidade da microflora rizobiana natural, selecção de estirpes, inoculação de sementes de leguminosas e fixação biológica do azoto em condições de campo.

Biological nitrogen fixation and pastures productivity in Mediterranean farming systems. Mediterranean environments are characterized by hot dry summers and cool wet winters. In this peculiar environment of the regions of southern of Iberian Peninsula, an agrosilvopastoral system, associated to extensive livestock production was developed. Occurring natural pastures comprise a mixture of annual and perennial plants, where legumes play a key role, supporting the direct grazing by cows, sheep and pigs.

In this rain-fed ecosystem, the symbiotic nitrogen fixation, an interconnected process dependent of plants, bacteria, climatic variables, soil physical, chemical and biological properties and agronomic management is a major process of providing nitrogen to the soils. Legumes are in this area an important component of a strategy for increasing farming systems productivity and sustainability.

An overview on research studies of agronomic importance, related to nitrogen fixation by legume-based pastures of the Portuguese Mediterranean area are reported, being underlined those ones related to rhizobia bacteria associated to clovers, annual medics and lucernes: natural rhizobial microflora properties, rhizobial strains evaluation, seed legumes inoculation and biological nitrogen fixation in field conditions.

SI-1

Respuesta de la soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. Osumi a la inoculación con estirpes de *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* en el sur de España.**Albareda, M.^{1*}, Rodríguez-Navarro, D.N.¹, y Temprano, F.J.¹**

¹IFAPA, Centro Las Torres y Tomejil. Ctra. Sevilla-Cazalla km. 12,2. C.P.41200 Alcalá del Río (Sevilla), España.*marta.albareda.ext@juntadeandalucia.es

Los regadíos del sur de España poseen características edafoclimáticas adecuadas para el cultivo de la soja, pudiéndose obtener, bajo condiciones favorables, rendimientos superiores a 5000 Kg/ha. En los suelos españoles y en muchos países de Europa, no existen rizobios específicos para nodular la soja ya que es un cultivo de reciente introducción y tiene una gran especificidad para nodular con el microsimbionte. En estas circunstancias, y para aprovechar el nitrógeno fijado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, es necesario proceder a la inoculación.

Se han realizado ensayos de inoculación de soja en condiciones de campo con estirpes de *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* seleccionadas previamente por su capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones de invernadero. Los ensayos se realizaron en dos localidades del sur de España que poseen suelos de distinta naturaleza. Los resultados mostraron que, para ambas localidades, las estirpes de *S. fredii* dieron lugar, en la mayoría de los casos, a rendimientos similares a aquellos alcanzados con la inoculación de la estirpe de referencia USDA110 de *B. japonicum*.

***Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* inoculation responses in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. Osumi in South of Spain.** Irrigated land in South of Spain has an edaphic and climate characteristics appropriated for soybean cultivation. Under favourable conditions it can be obtained seed yields higher than 5000 Kg/ha. Soybean-rhizobia are absent in Spanish soils and many European countries because of soybean is a recently introduced crop and shows a high specificity to nodulate with its microsymbiont. In this situation, and to take advantage of nitrogen fixation from the symbiotic association *Rhizobium*-leguminous, it is necessary to inoculate the crop.

Field experiments of soybean inoculation were performed with *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* strains selected previously by their high effectiveness in nitrogen fixation under greenhouse conditions. Field assays were carried out in two localities, with different types of soils. The results showed that, in both sites, inoculation of soybean with *S. fredii* strains produced, in most of the cases, seed yields similar to those obtained by inoculation with *B. japonicum* USDA110.

SI-2

Recuperação de inóculo e distribuição de nódulos em cultivares de trevo subterrâneo.

Alho, L.^{1*}, Dias, L.S.², e Marques, J.F.³

¹Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora, Évora, Portugal, ²Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal, ³Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal. *luisalho@uevora.pt

Estudou-se a capacidade competitiva de uma estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* com tolerância a pH ácido e toxicidade de alumínio, usada como inoculante em quatro cultivares de trevo subterrâneo, semeadas em solo ácido com evidências de toxicidade de manganês e elevadas populações nativas de rizóbio. O número de nódulos presentes em cada um dos 15 segmentos de raiz avaliados, apenas revelou diferenças significativas entre cultivares no primeiro centímetro da raiz principal, sem que tais diferenças se tenham observado na recuperação do inóculo. Em 3 dos 15 segmentos das raízes detectaram-se diferenças significativas entre cultivares na recuperação do inóculo, mostrando que a distribuição deste não é uniforme ao longo da raiz, dependendo de variações das condições ambientais e de características do hospedeiro. O uso de técnicas estatísticas de análise de correspondências e classificações automáticas permitiu avaliar a distribuição de nódulos e recuperação de inóculo ao longo da raiz em cada uma das cultivares estudadas. A validade dos métodos de amostragem de nódulos para avaliação da recuperação de estirpes inoculantes é discutida.

Inoculant recovery and nodules distribution in cultivars of sub clover. The competitive ability of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain tolerant to low pH and aluminum toxicity, used as inoculant into four cultivars of sub clover, was studied in an acidic soil with evidences of manganese toxicity and high numbers of native rhizobia. The number of nodules present in the 15 root segments studied, only revealed significant differences among cultivars in the first centimeter of the tap root, without differences in the recovery of the inoculant strain. In 3 out of 15 root segments, differences in inoculant recovery among cultivars were detected, showing that nodule occupation by the inoculant strain depends on environmental conditions and characteristics of the host plant. The use of statistical methods based on correspondence analysis and automatic classification made clear the pattern of nodules distribution and inoculant recovery along the segments of the root system. Sampling methods for nodule recovery for the evaluation of the competitive ability of strains are discussed.

SI-3

Rizobios tolerantes a salinidad y alcalinidad de suelos de la Pampa Deprimida del Salado representan una fuente de variabilidad genética y simbiótica para mejorar la calidad de los inoculantes para *L. tenuis*.**Bergottini, V.M., Castagno, L.N., Paz, R.C., Ruiz, O.A.* , y Estrella, M.J.***IIB-INTECH, UNSAM-CONICET, Chascomús, Bs. As., Argentina. *ruiz@intech.gov.ar*

La Pampa Deprimida del Salado (PDS) es una de las principales zonas ganaderas de la Argentina, basada en la utilización de pastizales naturales, debido a las condiciones edafo-climáticas de la región que dificultan la implantación y persistencia de leguminosas "tradicionales", particularmente en los suelos bajos salino-alcálinos. *L. tenuis* es una leguminosa exótica adaptada a estas condiciones, sin embargo presenta problemas de supervivencia en el estadio de plántula (su etapa demográfica crítica). Una alternativa para mejorar la implantación de *L. tenuis* es optimizar su simbiosis con rizobios específicos utilizando inoculantes de alta calidad. Sin embargo el uso de inoculantes comerciales no siempre es efectivo y frecuentemente es afectado por la presencia de cepas nativas. Por este motivo se evaluó la diversidad genética de rizobios nativos de la PDS y se seleccionaron cepas tolerantes a condiciones de estrés salino que tuvieron una eficiencia simbiótica superior a los inoculantes comerciales. Los resultados obtenidos demuestran que existe una alta diversidad genética entre los rizobios de la PDS y que la eficiencia simbiótica de dos aislamientos fue superior a los inoculantes comerciales bajo condiciones de estrés salino y control. Por lo tanto, las poblaciones de rizobios nativos constituyen una fuente de variabilidad genética y simbiótica que puede ser aprovechada para la obtención de cepas de alta calidad en la formulación de inoculantes específicos para los suelos de una determinada región.

Salt and alkalinity-tolerant rhizobia from the Salado River Basin as a source of genetic and symbiotic variability to improve the quality of inoculants for *L. tenuis*. The Salado river Basin (SRB) is the most important area for cattle raising in Argentina. This activity relies on natural pastures, given that the edaphic and climatic conditions restrict the implantation and persistence of 'traditional' legumes' in saline-alkaline lowlands (30% of the total area). *L. tenuis* is an exotic legume well adapted to these conditions, but in spite of its successful naturalization, the survival of this species during the seedling stage is limited and is a critical step for further implantation. With the aim of improving seedling survival and forage quality, the genetic diversity of native rhizobia was evaluated, for further selection of isolates with a better symbiotic efficiency than commercial inoculants in saline soils. A high genetic diversity was found among the rhizobia of the SRP. The symbiotic performance of two native isolates was superior to that of strains used as commercial inoculants both under control and salt stress conditions. It can be concluded that populations of rhizobia in soils of the SRP are a source of genetic and symbiotic variability that can be used to obtain high quality inoculants for *L. tenuis*.

SI-4

Variação sazonal da fixação simbiótica de duas espécies de *Lupinus* sujeitas a diferentes práticas de preparação do solo.

Carranca, C.^{1*}, Madeira, M.², Torres, M.O.², Pina, J.P.³, e Marques, P.²

¹L-INIA, Quinta do Marquês, Av. República, Nova Oeiras, 2784-505 Oeiras, Portugal,

²Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal,

³CELBI, Furadouro, Óbidos, Portugal. *c.carranca.ean@clix.pt

As cultivares portuguesas de *Lupinus*, quer o tremoceiro doce 'Estoril', quer a tremocilha, cultivadas em solos arenosos de Portugal (Pegões e Óbidos), fixaram grandes quantidades de azoto (N) com o rizóbio nativo ($>100 \text{ kg N ha}^{-1}$), apresentando taxas constantes durante os ciclos culturais. O tremoceiro doce apresentou uma taxa $\geq 87\%$, não influenciada pela mobilização do solo, devido à fraca destruição da sua estrutura. Na 1ª floração, em Janeiro do 1º ano, em Pegões, o tremoceiro doce apresentou uma taxa de fixação de 74% devido à baixa temperatura média do solo (4 °C) e formação de geada. Em Óbidos, a tremocilha fixou mais que o tremoceiro, apresentando uma taxa superior no 2º ano (99%) comparativamente à do 1º ano (97%) devido às elevadas temperaturas e défice hídrico neste ano. O benefício em N do *L. luteus* L., determinado à maturação e incluindo a biomassa aérea e raiz ($+32 \text{ kg N ha}^{-1}$, i.e., 11% do N da planta), evidenciou o valor fertilizante desta leguminosa para a cultura seguinte na rotação. No tremoceiro doce, o benefício em N estimado na fase de enchimento da vagem foi de $+61 \text{ kg N ha}^{-1}$ (80% do N da cultura). A incorporação de resíduos de eucalipto no solo de Óbidos não afectou a produtividade da tremocilha, mas aumentou ligeiramente a sua capacidade de fixação (aumento de 24%) comparativamente ao solo não corrigido.

Seasonal pattern of N₂ fixation by lupine species under different soil practices. The Portuguese *Lupinus albus* L. 'Estoril' and *L. luteus* L. species fixed larger quantities of nitrogen (N) with the indigenous rhizobium in two Portuguese regions (Pegões and Óbidos) with coarse sandy soils, at constant rates during the growth cycles. Percent N derived from atmosphere (%Ndfa) was $\geq 87\%$, not influenced by soil disturbance (94%) since no great disruption of soil structure by tillage occurred. A low %Ndfa value (74%) was determined at first bloom (January) of the grain pulse in year 1 at Pegões and was explained by the extremely low mean soil temperature at that time (4 °C), with the occurrence of frost. At Óbidos, the fodder crop was supplied with N₂ from the air considerably better than the sweet pulse, but fixation rate was higher in year 2 (99%) by a better crop establishment than under drought conditions in year 1 (97%). Potential N input from *L. luteus* L., determined by including the above- and below-ground biomass N, amounted to $+32 \text{ kg N ha}^{-1}$ (11% crop N), showing the potential fertilizer N value of this residue for the subsequent crop in the rotation. Considering the pods of sweet lupine at formation phase, an N input of $+61 \text{ kg N ha}^{-1}$ (80% crop N) was estimated, but a smaller gain of N to the soil at crop maturity is expected due to greater N mobilization from shoots to the pods. Incorporation of eucalyptus residue as soil organic amendment at Óbidos led to similar fodder legume productivity with a slightly greater fixation capacity (24% increase) compared with unamended soil.

SI-5

Producción de bioplásticos (PHAs) por cepas de *Azotobacter* utilizando un residuo orgánico semisólido generado en el proceso de obtención del aceite de oliva: *alpeorujo*.**Cerrone, F.^{1*}, Sánchez-Peinado, M.¹, Pozo, C.¹, y González-López, J.¹**¹Grupo de Microbiología Ambiental, Instituto del Agua, Universidad de Granada, Granada, España. *fcerrone@ugr.es

La obtención del aceite de oliva en dos fases conlleva la generación de un residuo semisólido (*alpeorujo*) altamente contaminante debido a su carga orgánica (DQO 180000 mg/l) y su contenido polifenólico. El objetivo de nuestro estudio ha sido utilizar este residuo para obtener bioplásticos (PHAs) utilizando bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre (*Azotobacter* sp.); estos biopolímeros han demostrado tener propiedades químico-físicas parecidas al termoplástico convencional. El esquema experimental se divide en dos fases: 1) una digestión anaeróbica previa del *alpeorujo* ajustando los tiempos de retención hidráulica con un doble fin: reducción de la acción inhibidora de los polifenoles y la obtención de ácidos orgánicos volátiles-VFAs; 2) producción de bioplástico en cultivo puro aeróbico (*Azotobacter* sp.), utilizando como sustrato el *alpeorujo* digerido en la fase anaeróbica anterior. La máxima producción de bioplástico se obtuvo al utilizar una concentración de *alpeorujo* del 60% transcurridas 72 h de incubación. Este resultado, el cuál duplica la cantidad obtenida en medios químicamente definidos, pone de manifiesto la idoneidad del uso de este residuo como sustrato para la producción industrial de bioplásticos.

Bioplastics production (PHAs) by *Azotobacter* strains utilizing a semisolid organic waste obtained in the olive oil manufacture (*alpeorujo*). Two phase olive oil production lead to generation of a semisolid waste (*alpeorujo*) highly pollutant due to its organic charge (COD 180000 mg/l) and its polyphenolic content. The objective of our study was to use this waste as a substrate to get bioplastics (PHAs) utilizing free living, N fixing bacteria (*Azotobacter* sp.); this biopolymer demonstrated physical-chemical properties similar to conventional thermoplastics. Experimental setting was composed by two phases: 1) preliminary anaerobic digestion of *alpeorujo* setting hydraulic retention times with a double purpose: reduction of inhibitory action of polyphenols and volatile fatty acids (VFAs) acquisition; 2) bioplastics production in a pure aerobic culture (*Azotobacter* sp.), using anaerobically previous digested *alpeorujo* as a substrate. Maximum yield was obtained utilizing a 60% concentration of *alpeorujo* after 72 hours of incubation. This result, which double the quantity obtained in chemically defined media, make evident the suitability of this waste as substrate for industrial production of bioplastics.

Acknowledgement: This research work has been supported by European Union as part of the project named *Production of polyhydroxyalkanoates from olive oil mills wastewater* (acronyms: POLYVER) N° COOP-CT-2006-032967.

SI-6

Impacto de la interacción de inoculantes de *Azospirillum* y micorrizas en la productividad de cereales.

Collados, C., y Barea, J.M.*

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. *josemiguel.barea@eez.csic.es*

Las especies de *Azospirillum* se han utilizado como biofertilizantes basado en sus efectos como fijadores de N₂ (discutidos) y como fitoestimuladores. Efecto este último debido a que estas PGPR favorecen el desarrollo del sistema radical de la planta (particularmente cereales), lo cual conlleva una mejora de la capacidad de esta para utilizar de forma más eficaz el N del suelo. La interacción de tales bacterias con hongos formadores de la micorriza arbuscular (MA) hace esperar resultados positivos en el desarrollo de cultivos de cereales dados los efectos de las MA como biofertilizantes, fitoestimuladores y bioprotectores de los cultivos.

Tal posibilidad se evaluó en experimentos en condiciones de campo en los que se cultivaron plantas de maíz y trigo conducidos hasta producción de grano. Se utilizaron como inoculantes *A. brasilense* Sp 245 y *A. lipoferum* CRT1 (inoculante comercial). Se incluyeron un tratamiento fertilizado con N (a dosis equivalentes a 60 kg de N/ha y otro no inoculado ni fertilizado. Todas las plantas recibieron un inoculo de hongos MA.

La inoculación de ambas cepas de *Azospirillum* favoreció la formación de MA, y como resultado de la interacción, se evidenció un incremento en la producción de grano y en el contenido en NPK de este superior al producido por la fertilización química.

Impact of *Azospirillum* and mycorrhiza inoculant interaction on the productivity of cereal crops. *Azospirillum* strains have been used as biofertilizers, based on their role as N₂-fixers (effectiveness discussed) and as phytostimulators, because they can improve root system development in plant crops, particularly cereals. This activity usually increases the ability of these plants for the capture of nutrient, particularly N, from the soil solution. Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi are known to act as biofertilizers, bioprotectors and phytostimulators. They are known to interact with other components of the rhizosphere microbiota to benefit plant fitness and soil quality.

The interactions between *Azospirillum* strains and AM fungi are expected to improve productivity of cereal crops therefore a series of experiments were designed to investigate this possibility under field conditions.

Both *A. brasiliensis* Sp 245 and the commercial strain CRT1 of *A. lipoferum* were assayed and challenged with a N-fertilization equivalent to 60 kg/ha of N. All plants received an AM inoculum. Both strains benefited AM formation and grain yield of both AM-inoculated wheat and maize plants. Grains from microbized plants had a higher NPK content than those added of the N-fertilizer.

SI-7

Análisis comparado, ecológico *versus* convencional, de parámetros biológicos del suelo en dos plantaciones de ciruelos.

Daza, A.^{1*}, García-Galavís, P.A.¹, Camacho, M.¹, Montero-Calasanz, M.C.¹, Casanova, L.², y Santamaría, C.¹

¹IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil", Apto. Oficial 41200 Alcalá del Río (Sevilla),

²Departamento de Ciencias Agroforestales, EUITA, Universidad de Sevilla.

*antonio.daza@juntadeandalucia.es

En la finca experimental del IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil" en Sevilla (España) se plantaron en enero de 2005 dos campos de 5500 m² cada uno conteniendo 14 variedades diferentes de ciruela japonesa. Una de las parcelas está sometida a manejo ecológico y la otra se lleva según las normas de producción integrada. La fertilización de la parcela ecológica se ha llevado a cabo mediante la siembra de diferentes abonos verdes de soja, habas y veza, y la aplicación de estiércol de origen animal. Se ha realizado un análisis comparativo de varios parámetros biológicos del suelo: poblaciones de bacterias y hongos heterótrofos totales, lombrices y hongos formadores de micorrizas. Los resultados han mostrado que las poblaciones de bacterias y hongos totales fueron similares en ambas parcelas, pero los hongos micorrícicos y las lombrices fueron más abundantes en el suelo sometido a manejo ecológico.

Organic *versus* conventional soil biological parameters in two plum orchards.

Two similar field assays, 5500 m² each, containing 14 different Japanese plum varieties were planted in January 2005 in the IFAPA Experimental Station "Las Torres-Tomejil" in Sevilla (Spain) and are being comparably conducted, one according to organic production practices and the other following a conventional production system. Soil fertilization in the organic orchard consisted of sowing of different green manures of soybean, bean and vetch or the application of mature manure from animal origin. A comparative analysis of several soil biological parameters has been performed, including bacteria, fungi, earthworms and mycorrhizal fungi. Results showed that populations of viable soil bacteria and fungi were similar in both treatments but other soil components as mycorrhizal fungi and earthworms seem to be more abundant in the organic plot.

SI-8

Tolerância ao stress de estirpes de sinorizóbio isoladas de luzernas anuais.

Fareleira, P.^{1*}, Matos, N., Marques, J.F., e Ferreira, E.¹

¹Laboratório de Microbiologia do Solo, L-INIA, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Oeiras, Portugal. *paula.fareleira@gmail.com

Muitas zonas de Portugal apresentam solos degradados, com baixos teores de matéria orgânica e fraca capacidade de retenção de água, associados a baixos níveis de precipitação e extremos de temperatura. Nestes locais, a introdução de estirpes de rizóbio capazes de sobreviver em situações de agressão edafo-climática pode constituir uma estratégia importante para o melhoramento da produtividade agrícola. Neste trabalho, procedeu-se à caracterização de 12 estirpes de sinorizóbio, provenientes de solos do Alentejo e Estremadura, quanto à tolerância a secura, salinidade e alta temperatura. As estirpes foram isoladas pelo método de infecção de plantas, usando como hospedeiro a luzerna anual *Medicago polymorpha* cv. Santiago, e a actividade de fixação de azoto foi avaliada pela massa seca das plantas noduladas. A tolerância à salinidade e às altas temperaturas foi avaliada pela capacidade de crescimento em meio de cultura líquido. Várias estirpes cresceram à temperatura de 45 °C, muito superior ao óptimo de crescimento. A tolerância à salinidade (30 mM-1,4 M NaCl) foi variável, mas todas as estirpes cresceram em meio contendo 300 mM NaCl. A sobrevivência à secura foi avaliada em suporte de solo sujeito a secagem lenta, por contagem de células viáveis durante e após o período de secagem. Algumas estirpes sobreviveram na ausência total de água no solo durante 60 dias. O estudo permitiu seleccionar estirpes com boa capacidade de fixação de azoto e resistentes a diferentes tipos de stress, aparentemente bem adequadas a sobreviver em solos sujeitos a estes tipos de agressão ambiental.

Stress tolerance of sinorhizobial strains isolated from annual medics. Many soils in Portugal are suffering from progressive degradation, presenting low organic matter content and weak water retention capacity, associated with low levels of precipitation and extremes of temperature. In these areas, the introduction of rhizobial strains able to survive under stressful conditions may increase soil fertility and become an additional profit to farmers. In this work, a selection of 12 sinorhizobial strains native from soils in Baixo Alentejo and Estremadura was characterized in what concerns drought, salinity and temperature tolerance. The strains were isolated from soils by the plant infection method using the annual medic *Medicago polymorpha* cv. Santiago as host, and nitrogen fixing activity was determined by the weight of nodulated plants. Salt and temperature tolerance were evaluated through the growth capacity in liquid cultures. Several strains were able to grow at 45 °C, a temperature much above the optimal for growth. Salt tolerance (30 mM-1.4 M NaCl) varied among strains, but all isolates were able to grow in medium containing 300 mM NaCl. Drought survival was evaluated in soil submitted to slow drying, by counting the number of viable cells during and after the dryness period. Some of the strains showed good survival capacity in the total absence of water for 60 days. This study allowed for the selection of strains with good nitrogen fixing ability and highly resistant to different types of stress, apparently well adequate to survive in soils affected by these harsh conditions.

Trabalho realizado no âmbito do Projecto POCTI/AGG/46371/2002, co-financiado pelo FEDER.

SI-9

Caracterización agrofisiológica de la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus* en diferentes niveles de fósforo.

Ghoulam, C.^{1*}, Bargaz, A.^{1,2}, Mandri, B.^{1,2}, Oufdou, K.², Faghire, M.^{1,2}, Lluch, C.³, Tejera Garcia, N.³, y Herrera-Cervera, J.A.³

¹Faculty of Sciences and Techniques, B.P 549, Gueliz, Marrakech, Morocco, ²Faculty of Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco, ³Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain. *ghoulamcherki@yahoo.fr

El estudio se llevó a cabo con nueve genotipos de judía *Phaseolus vulgaris* (cinco variedades y cuatro líneas). La caracterización agronómica se realizó mediante experimentos en cinco parcelas que diferían en sus niveles de fósforo y nitrógeno, situadas en la región de Haouz de Marrakech. En estos experimentos los resultados mostraron diferencias entre las diferentes parcelas en la mayoría de las determinaciones realizadas. Las diferencias más significativas se registraron en dos parcelas y estaban relacionadas con el crecimiento y el contenido de fósforo y nitrógeno en la planta. La inoculación en campo incremento significativamente los parámetros estudiados en relación con las plantas de parcelas no inoculadas.

Otros experimentos encaminados a la caracterización fisiológica de la respuesta de la simbiosis en deficiencia de fósforo se realizaron en condiciones de laboratorio, en cámaras de crecimiento y en medios semihidropónicos. Las plantas se inocularon con dos cepas de *Rhizobium* (aislamientos autóctonos) y crecieron con dos niveles de fósforo. Fueron recolectadas en floración, observándose que la deficiencia de fósforo afectó negativamente a la tasa de fijación de nitrógeno y a la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa nodular, mientras que la actividad fosfatasa se incrementó con la deficiencia de P en diferente grado según la cepa que formaba la simbiosis.

Agro-physiological characterization of common bean-Rhizobia symbiosis responses to different phosphorus levels. The study was undertaken on nine common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes consisting of five varieties and four lines. The agronomical characterization was carried out through field trials in five farmer's fields, differing for their phosphorus (P) and nitrogen (N) levels, at the Haouz region of Marrakech. In this experiment, the results showed differences between fields for almost all the considered parameters. The more significant differences in plant growth parameters, P and N contents were registered between fields 1 and 2 that showed contrasting soil P and N levels before culture installation. The field inoculation has increased significantly the considered yield parameters in comparison to non-inoculated plants.

Other trials were conducted under controlled conditions for physiological characterization of the symbiosis responses using the more contrasting bean genotype-rhizobia strain combination under phosphorus deficiency. The plants were inoculated by two rhizobia strains, and cultivated under two P concentrations in a semihydroponic culture using a Leonard jar system. At the flowering stage, the plants were harvested and assessed for their performances using agro-physiological parameters. The P deficiency has negatively affected nitrogen fixation rate in nodules and reduced their cell membrane integrity. Also, the phosphoenolpyruvate carboxylase activity in nodules was reduced but phosphatases activities were increased under phosphorus deficiency with some differences depending on the rhizobia strain.

SI-10

Efeito da inoculação com *Pisolithus tinctorius* na sobrevivência de plântulas micropropagadas de *Arbutus unedo* L.**Gomes, F.^{1*}, Santos, V.¹, Sorzabalbere, I.¹, Ponce Díaz, A.¹, San Martin, E.P.¹, e Canhoto, J.M.²**

¹CERNAS, Dep. Florestal, Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3040 – 316 Coimbra, Portugal, ²Laboratory of Plant Biotechnology, Centre for Pharmaceutical Studies, Department of Botany, University of Coimbra, P- 3004-516 Coimbra, Portugal. *fgomes@esac.pt

Arbutus unedo L. é uma espécie mediterrânica da família *Ericaceae* tolerante ao stress hídrico e com um crescente valor comercial. Plantas adultas foram seleccionadas pela produção de fruto. Ápices meristemáticos e segmentos nodais foram estabelecidos *in vitro*. Na multiplicação das culturas utilizou-se o meio FS (8,9 µM BA). Após a indução de enraizamento (Ri; 24,6 µM IBA, 7 dias), e para o desenvolvimento das raízes, comparou-se com o controlo, o efeito da repicagem dos rebentos para substrato inoculado com *P. tinctorius*. Foram testados os seguintes tratamentos: 1) controlo - repicagem dos rebentos para o mesmo meio Ri, sem hormonas e com CA 1,5%; 2) igual a 1, com posterior transferência para substrato inoculado; 3) transferência directa para substrato inoculado e 4) semelhante ao controlo, mas com substrato não inoculado. Ao fim de 6 semanas procedeu-se à aclimatização das plântulas (enraizamento de 94,1±15,4%, P> 5%). As raízes nos tratamentos com *P. tinctorius* eram mais pequenas mas, mais ramificadas. Após a aclimatização (2 meses), observaram-se diferenças significativas no crescimento dos rebentos, o que sugere o estabelecimento de associações simbióticas. Em plantas propagadas em viveiro, comparou-se com a testemunha o efeito de rega com caldo esporal ou com micélio produzido *in vitro* de *P. tinctorius*, no acréscimo em altura em 153 plantas. As plantas sujeitas à rega com caldo esporal apresentaram um acréscimo em altura (19,1±4,9 cm) significativamente superior ao fim de 4 meses em viveiro. Foram instalados posteriormente ensaios no campo.

Effect of *Pisolithus tinctorius* inoculation on survival of micropropagated *Arbutus unedo* plants. *Arbutus unedo* L. is a Mediterranean species of the *Ericaceae* family tolerant to drought and with an increasing commercial value. Shoot tips and nodal segments were established *in vitro*. Shoot proliferation was achieved on FS medium (9.0 µMBA). After root induction (24.6 µM IBA, 7 days), root development, was compared with the control being the shoots transferred to a substrate (peat: vermiculite) previously inoculated with *P. tinctorius*. The following treatments were tested: 1) control – transfer to the same medium without PGR and charcoal 1.5 %; 2) like 1 with further transfer to inoculated substrate; 3) direct subculture in the inoculated substrate and 4) as in the control but in flasks which substrate wasn't inoculated. Root formation was similar in all conditions tested (94.1±15.4% root rate). Roots formed in the assays with *P. tinctorius* were shorter, but showed more ramifications. After 2 months of acclimatisation significant differences were found on shoot growth, suggesting mycorrhizae establishment. Propagated plants were watered with spores or with mycelium grown *in vitro* and compared with the control. After 4 months plants treated with spores were higher than others (19,1±4,9 cm; P<0.05), and are now growing in the field for further evaluation.

SI-11

Estudios de “consorcios de biocontrol” frente a la infección de plantas de arroz por *Magnaporthe grisea* en Las Marismas del Guadalquivir.

Megías, E.^{1*}, Ojeda, J.¹, Del Castillo, I.¹, Delgado, F.¹, Montes, F.², Bellogín, R.³, Gutierrez-Mañero, F.J.⁴, y Megias, M.¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, España, ²Federación de Arroceros de Sevilla, España, ³Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, España. ⁴Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Universidad San Pablo-CEU, España.* mesau@us.es

El hongo *Magnaporthe grisea* es el causante de la piriculariosis del arroz, la enfermedad con mayor incidencia en los cultivos de arroz a nivel mundial. Estudios de la diversidad bacteriana en Las Marismas del Guadalquivir, nos permitió seleccionar y desarrollar un consorcio bacteriano con propiedades PGPRs, y de inducción de resistencia sistémica en condiciones de fitotrón e invernadero en plantas de arroz. Con el fin de estudiar el comportamiento del consorcio en condiciones naturales de cultivo, se llevaron a cabo ensayos en parcelas de experimentación con alta incidencia de *M. grisea*, aunque sin infestación adicional del patógeno. La variedad de arroz elegida fue J. Sendra (tipo Japónica), una variedad con alta tolerancia a la enfermedad. Se estudiaron los siguientes parámetros, tomados en los diferentes estados fenológicos de la planta desde la siembra hasta la recogida: número de plantas infectadas, superficie foliar afectada (escala de evaluación J.P. Marín), producción, peso de 1000 granos y rendimientos totales y enteros. Los análisis estadísticos dieron resultados positivos y significativos para los parámetros de biocontrol (número de plantas infectadas y superficie foliar afectada), no así para valores de producción y rendimiento de cultivo. Los resultados obtenidos en parámetros de biocontrol fueron significativos, pero, la baja incidencia de la enfermedad (2007) y la utilización de una variedad muy tolerante, no permitieron compararlos con los obtenidos al aplicar un fungicida químico. AGL2006-13758-C05-01.

Application of bacterial inoculants mixed as biocontrol agents against infection of rice plants by *Magnaporthe grisea* in the wetland Guadalquivir.

Magnaporthe grisea is the fungus that causes rice blast, the disease with the highest incidence in rice crops in the world. Studies made on bacterial diversity of the Guadalquivir wetland, enabled us to identify and develop a bacterial consortium with PGPRs and SIR properties in rice plants under controlled conditions (phytotron and greenhouse). In order to study the behaviour of the consortium under natural conditions of crops, tests were conducted on experimental plots with a high incidence of *M. grisea*. No additional infestation was made. The rice variety chosen was J. Sendra (type Japónica), a variety with high tolerance to the disease. The following parameters were studied, taken at different phenological stages of the plant from sowing to harvest: the number of infected plants, leaf surface affected (scale of assessment JP Marín), production, weight of 1000 grains, total harvest yields and the number of whole grains. Statistical analysis were positive and significant for biocontrol parameters (number of plants infected and affected leaf surface), but not for the values of production and crop yield. The results obtained in biocontrol parameters were significant. However, low incidence of the disease in the 2007 campaign and the use of a variety of rice very tolerant to the disease prevented making a comparative study with application of a chemical fungicide.

SI-12

Estimulación del enraizamiento, elongación y colonización de raíces en plantas modelo mediante la inoculación de bacterias PGPR productoras de auxinas.

Montero-Calasanz, M.C., Santamaría, C., Daza, A., y Camacho, M.*

IFAPA, Centro Las Torres- Tomejil. Carretera Sevilla-Cazalla, Km 12,200. Sevilla, 41200. España. Tlfno: +34 955045504. *maria.camachomartinez.ext@juntadeandalucia.es

Las auxinas, principalmente el ácido 3-indol acético (AIA), son fitohormonas que controlan procesos fisiológicos tan importantes como el crecimiento y la división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y a la gravedad.

La producción de AIA está ampliamente extendida en las bacterias rizosféricas y se ha demostrado que las bacterias PGPR productoras de AIA promueven el crecimiento radical imitando los efectos producidos en las plantas por adición de AIA exógeno, una práctica habitual en el sector viverista actual.

De muestras de suelo extraídas de un olivar ecológico, se han aislado un total de 500 bacterias que han sido caracterizadas por sus capacidades PGPR clasificándose varias de ellas como altas productoras de auxinas.

En este trabajo se ha estudiado la estimulación del enraizamiento y la elongación de raíces producida por la inoculación de cepas PGPR productoras de AIA en estaquillas y semillas de plantas modelo (*Vigna unguiculata* y *Brassica napus*) en condiciones de laboratorio. Así mismo, se ha monitoreado el proceso de colonización bacteriana mediante la introducción en algunas de las cepas de proteínas de fluorescencia (GFP).

Rooting stimulation, elongation and colonization of roots on model plants by means of auxin producer PGPR inoculation. The auxin IAA (phytohormone) stimulates some physiological processes as plant cell proliferation, cell elongation and plant tissues differentiation, and it is also responsible of light and gravity responses.

IAA production is widespread among plant-associated bacteria. It has been reported that IAA producing bacteria promote the rooting growth and their effect on plants mimics that of exogenous IAA, a common practise in nursery industries.

Previously, we have isolated 500 strains from an organic olive grove. All of them have been classified on the bases of PGPR activities and some of them have showed a high auxin producing capacity.

In this work, we have studied rooting stimulation and root elongation by gnotobiotic assays using cuttings and seeds of model plants (*Vigna unguiculata* and *Brassica napus*) treated with different IAA producing bacteria. In addition, we have monitored bacterial root colonization using GFP as reporter gene.

SI-13

Aplicación de compost y té de compost en alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) y su implicación en el establecimiento de la simbiosis con *Rhizobium*.

Mulas, D.^{1*}, Blanco, D.², Hernández S.¹, y González-Andrés, F.¹

¹Área de Producción Vegetal. ²Área de Ingeniería Química. Instituto de Recursos Naturales. Universidad de León, 24071 León. *dmulg@unileon.es

El compost, como enmienda orgánica, eleva el contenido en materia orgánica del suelo y actúa como fertilizante. Además de estas aplicaciones, es importante su capacidad supresora de enfermedades en plantas, tanto del compost como de su té, asociada a la carga microbiana del compost. Este efecto se atribuye principalmente a la antibiosis, hiperparasitismo o competencia en la rizosfera. Pero además pueden aparecer interacciones con microorganismos del suelo beneficiosos para la planta o con la propia planta.

La aplicación del té de compost en alubia tiene como objetivos la evaluación de la presencia de PGPRs (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) y otros microorganismos, así como la interacción planta-microorganismo que pueda ser beneficiosa para la planta en el proceso de nodulación, fijación de nitrógeno y desarrollo vegetal. Otro objetivo es observar la forma en que afectan estas interacciones a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y la posible presencia de compuestos químicos en el compost y su té que afectan a todos estos procesos.

En este estudio se aplicó compost a partir de estiércol de bovino, té de compost y té estéril a plantas de alubia de la variedad local "Riñón de León" cultivadas *in vitro* en fitotrón, inoculadas y no inoculadas con una cepa efectiva de *Rhizobium leguminosarum* capaz de formar nódulos y fijar nitrógeno en simbiosis con su hospedador

Application of compost and compost tea in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their role in the *Rhizobium* symbiosis establishment. Compost is an agricultural organic amendment with capacity to suppress plant diseases is important apart from its fertilizer utility, either that of the compost or its tea, related to the microbial population. Antibiotic effects, hyperparasitism or rhizosphere competitiveness are the main agents for the plant disease suppression. Moreover, other interactions can occur within the microbial population, with soil beneficial microorganisms or even with the plant.

The aim of the use of compost and compost tea in common bean is to assess the presence of PGPRs (plant growth promoting rhizobacteria) and other microorganisms, as well as to evaluate the plant-microorganism interaction that exerts a beneficial effect to the plant, nodulation and nitrogen fixation. Another aim is to observe the origin and mechanisms of these interactions affecting the symbiosis *Rhizobium*-common bean and the presence of chemicals from the compost with influence these processes.

Compost (from cattle manure), compost tea and sterilized compost tea were applied to common bean plants grown under *in vitro* conditions in a growth chamber. Either inoculated or not inoculated plants with a effective *Rhizobium leguminosarum* strain were tested.

SI-14

Caracterização de estirpes de *Sinorhizobium meliloti* isoladas de diferentes variedades de *Medicago sativa*

Rodrigues, S.^{1,2*}, Ferreira, E.¹, Figueira, E.², e Videira e Castro, I.¹

¹Laboratório de Microbiologia do Solo. L-INIA, INRB, Oeiras, Portugal. ²Centro de Biologia Celular. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

A utilização de luzernas (*Medicago sativa*, L.) em pastagens na zona mediterrânica requer, a inoculação de sementes com estirpes de *Sinorhizobium meliloti* eficazes e bem adaptadas às condições de clima semi-árido que prevalecem nesta região.

Este trabalho teve como objectivo caracterizar a população de *S. meliloti* de um solo do Alentejo (Elvas-ENMP), associada a diferentes variedades de *M. sativa* (ABT, Coussouls e Magali), através da avaliação da diversidade genética e da eficácia simbiótica bem como da tolerância a temperaturas elevadas (28 a 40 °C) e à salinidade (20 a 1000 mM de NaCl). A análise dos perfis obtidos mediante REP e ERIC PCR permitiram determinar a existência de diversos “clusters”, indicando uma elevada diversidade genética entre a população de *S. meliloti* estudada. Nos restantes parâmetros o comportamento das estirpes variou consoante a sua origem. Verificou-se a existência dum maior número de estirpes isoladas da variedade ABT com eficácia elevada contrariamente às isoladas da variedade Coussouls que foram menos eficazes. Relativamente à tolerância a 40 °C as estirpes tiveram comportamentos muito diferenciados desde muito sensíveis a muito tolerantes existindo um grande número de estirpes da variedade Coussouls entre estas últimas. Nos ensaios de salinidade, a maioria das estirpes tolerou a concentração de 500 mM.

Characterization of *Sinorhizobium meliloti* strains isolated from different varieties of *Medicago sativa*. The use of alfalfa (*M. sativa*, L.) in pastures in the Mediterranean area needs the seed inoculation with *S. meliloti* bacteria effective and well adapted to the semi-arid environmental conditions which prevails in this area.

The aim of this work was to characterize *S. meliloti* natural population present in an Alentejo soil (Elvas-ENMP), associated to different *M. sativa* varieties (ABT, Coussouls and Magali). Genetic diversity and symbiotic efficiency as well tolerance to high temperatures (28 to 40 °C) and salinity (20 to 1000 mM of NaCl) were evaluated. Analyzing the different patterns obtained by REP and ERIC PCR, it was verified the existence of several clusters indicating a high genetic diversity among the *Sinorhizobium* population studied. In the remaining parameters the strains behavior changed with cultivars. It was verified a great number of strains isolated from variety ABT with high effectiveness whereas strains isolated from variety Coussouls were poor effective. For tolerance to 40 °C, strains had different behaviors since very sensible to very tolerant, existing a great number of strains from variety. Coussouls among the last ones. Salinity tests showed that almost all the strains tolerate 500 mM.

This work was supported by the project INCO-2004-CT-PL 509140 (PERMED)

SI-15

Inoculación de consorcios microbianos en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. involucrados en protección frente a estreses abióticos moderados.

Rodríguez-Navarro, D.N.^{1*}, Albareda, M.¹, y Temprano, F.¹

¹Laboratorio de Inoculantes. IFAPA. Centro Las Torres-Tomejil. C^a Sevilla-Alcalá del Río km. 12,2. 41200 Alcalá del Río (Sevilla) España.

*dulcenombre.rodriguez@juntadeandalucia.es

El empleo de inoculantes mixtos, basados en más de una estirpe bacteriana o bien de estirpes pertenecientes a más de una especie es un área emergente dentro de la Microbiología Agraria aplicada. La inoculación de leguminosas con estirpes efectivas de *Rhizobium*/*Bradyrhizobium* tiene una larga y exitosa tradición de más de un siglo. No obstante, en las últimas décadas, la co-inoculación de estirpes de *Rhizobium* y otras bacterias PGPR es un área de estudio muy extendida, sobre todo en condiciones de cultivo limitantes del desarrollo vegetal y de las asociaciones simbióticas.

Se han realizado estudios, en condiciones controladas de invernadero, con plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) cultivar BBL bien sometidas a condiciones moderadas de salinidad (25 mM de ClNa) creciendo en un sustrato inerte, o bien en un suelo deficiente en P asimilable. En todos los ensayos, las plantas se inocularon con un consorcio bacteriano específico: estirpe ISP42 de *R. etli* más distintas PGPRs según el tipo de estrés (solubilizadores de fosfato o protectores frente a sal). Así mismo, se inocularon plantas con las combinaciones binarias: *R. etli* ISP42 + cada miembro del consorcio bacteriano.

La inoculación de plantas de judía con algunos tratamientos binarios o el consorcio bacteriano representa una mejora del desarrollo vegetal, en comparación con las plantas inoculadas sólo con *Rhizobium*; sin embargo, la nodulación (número de nódulos y masa nodular) sólo se vio positivamente afectada en presencia de P soluble.

Inoculation of *Phaseolus vulgaris* plants with microbial consortia grown under abiotic stress. The employ of mixed inoculants based in more than one strain or based on several strains of different microbial species 'consortia' is an emerging agronomic area of research to overcome some cropping constrains. There is a large and successful tradition in employing rhizobia-based inoculants for legumes and, more recently the co-inoculation of selected rhizobia plus other so-called PGPRs bacteria is taking a great interest.

We have performed, under greenhouse conditions, plants trials with bean plants (*Phaseolus vulgaris*) cv. BBL growing in sand under salty conditions (25 mM of NaCl) or in a soil with a low content of phosphorus. Inoculated plants either with a consortia of *R. etli* strain ISP42 plus different PGPRs, depending upon the type of stress, or with dual inocula (*R. etli* plus each member of the consortia) were compared with single rhizobia inocula.

Some bacterial treatments, dual inocula or microbial consortia, led to a superior plant development in comparison with single *Rhizobium* inoculation; however, nodulation parameters (number and nodule mass) were only increased after P addition.

SI-16

Diversidad genética y rango de hospedador en rizobios aislados de leguminosas de interés agronómico de Castilla-La Mancha.

Ruiz-Diez, B., Fajardo, S., Morcillo, C., Grijalbo, L., y Fernández-Pascual, M.*

*Departamento de Fisiología y Ecología Vegetal. Instituto de Recursos Naturales. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid, España. *mfernandezp@ccma.csic.es*

Se ha realizado un estudio comparativo de la biodiversidad de microorganismos simbioses fijadores de nitrógeno a partir de leguminosas de interés agronómico en suelos de Castilla-La Mancha, con el fin de obtener una colección de rizobios de suelos con diferentes características. Además se ha determinado el rango de hospedador de las cepas aisladas. Se han obtenido 29 cepas a partir de 12 especies de leguminosas, que se agruparon en 4 patrones por ARDRA. Se seleccionaron una cepa de cada origen y patrón, con dos de referencia para su identificación genética por secuenciación del 16S rDNA. Los resultados demuestran una gran homogeneidad genotípica: 24 están muy próximos a la especie *R. leguminosarum*. bv. *trifolii* que parece ser capaz de nodular diferentes especies de leguminosas en distintos ambientes. Estos datos indican que cepas relacionadas genéticamente pueden estar ampliamente distribuidas. La caracterización a nivel intraespecífico de aislados de esta cepa, se realizó por análisis de restricción de IGS-PCR. La diferenciación se debe más al tipo de suelo que a la especie de leguminosa. Los resultados de la determinación del rango de hospedador indican que la nodulación ha funcionado como en los grupos de inoculación cruzada tradicionales. Sin embargo, en cuanto a los patrones de nodulación no se observa la homogeneidad de la caracterización genética: la cepa aislada de trébol no noduló *Vicia narbonensis*, *Lathyrus sativus* o *Lens culinaris*, pese a que las cepas aisladas de estas leguminosas tenían una homología del 99-100% con *R. leguminosarum*. bv. *trifolii*.

Comparative study on the diversity of nitrogen fixing symbiotic microorganisms of agronomic legumes from Castilla-La Mancha. The aim of this work was to produce a collection of rhizobia from soils with different features. Also, the range of host of each strain has been performed. Four different ARDRA patterns from 29 strains from 12 legume species have been obtained. From each pattern and provenance one strain together with two reference isolated were selected in order to sequence the 16S rDNA. The results show great genotypic homogeneity: 24 strains belong to *R. leguminosarum*. bv. *trifolii*, which is able to nodulate different species in diverse environments. These results indicate that genetically related strains may be widely distributed. Intraespecific characterization of isolates was performed by means of IGS-PCR restriction analysis. Differences between strains seem to be soil type rather than legume species related. Range of host results showed that nodulation has proceeded as the traditional groups of crossing inoculation. Concerning nodulation pattern, it was not observed the homogeneity of the genetic characterization: the strain isolated from *Trifolium* did not nodulate *Vicia narbonensis*, *Lathyrus sativus* and *Lens culinaris*, although the strains isolated from these legumes had 99-100% homology with *R. leguminosarum*. bv. *trifolii*.

SI-17

Sistemas microbianos biolixiviadores: caracterização de consórcios.

Sá-Pereira, P.^{1,2*}, Duarte, J.C.^{1,3}, e Anselmo, A.^{1,3}

¹Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia e Inovação, Grupo de Biologia Molecular, Lumiar, Portugal, ²L-INIA, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, Oeiras, Portugal, ³Laboratório Nacional de Energia e Geologia, IP. *paula.sapereira@gmail.com

Metais como o chumbo, arsénio, cádmio, cobre, zinco, níquel, e mercúrio são continuamente adicionados aos solos através de actividades agrícolas, por incorporação de agro-químicos, pela aplicação continuada de lamas urbanas em terras agrícolas, por actividades industriais tal como tratamento do lixo, incineração, e poluição automóvel, e de outras fontes antropogénicas. Os microrganismos de origem telúrica, sejam associações simbióticas com plantas, sejam fungos micorrizicos são parte integrante da rizosfera. A globalidade das interações da planta-rizosfera, conduzem a um aumento da densidade microbiana e consequentemente a uma maior actividade e diversidade metabólica, que é afectada pela presença de metais pesados. O estudo da dinâmica populacional microbiana é muito importante para caracterizar consórcios que mostram capacidades específicas de biolixiviação. A sequenciação do rDNA 16S está a ser usada como ferramenta para caracterização de metagenomas extraídos de solos de mineração. Foram usados, para bactérias, os primers universais 7F e 1510R e para archaea os primers 23FPL e 1492R. Os resultados obtidos permitem determinar as divergências entre sequências e assim inferir sobre o perfil genético destes consórcios, e daí identificar novos genes de interesse.

Bioleaching microbial systems: Characterization of soil communities. Metals such as lead, arsenic, cadmium, copper, zinc, nickel, and mercury are continuously being added to our soils through various agricultural activities such as agrochemicals usage and long-term application of urban sewage sludge in agricultural soils, industrial activities such as waste disposal, waste incineration and vehicle exhausts, as well as from anthropogenic sources. Soil microorganisms, including plant root associated free-living as well as symbiotic rhizobacteria and mycorrhizal fungi in particular, are integral part of the rhizosphere biota. The overall plant-rhizosphere interactions lead to increasingly higher microbial density and consequent metabolic activity in the rhizosphere, regardless of soil contamination with heavy metals. Study of dynamic changes in bacterial community structure is very important in order to characterize important microbial consortia with specific bioleaching abilities. 16S rDNA sequencing is being used as a means to characterize metagenome obtained from mining areas. It was used 7F and 1510R primers and archaeal 23FPL and 1492R primers to determine the sequence divergences, in order to infer about the species present in the mixed samples by sequence comparison. Interpretation of the sequences was hampered by a percentage of position ambiguities higher than 1% (+/-15 positions) either in the query sequence or in database sequences.

D. van der Lelie, Biological interactions: the role of soil bacteria in the bioremediation of heavy metal polluted soils. In: J. Vangronsveld and S.D. Cunningham, Editors, *Metal contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*, Springer and RG Landes Co., Austin, TX, USA (1998), pp. 31–50 [Chapter 3].

SI-18

Efecto del suministro de NH_4^+NO_3 en la respuesta de plantas de alfalfa noduladas al aumento del CO_2 .

Sanz Sáez de Jáuregui, A., Irigoyen, J.J.*, y Sánchez-Díaz, M.

*Departamento de Biología Vegetal, Sección Biología Vegetal, Unidad Asociada al CSIC (EEAD), Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, c/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Navarra, España.*jirigo@unav.es*

La alfalfa nodulada responde al CO_2 elevado con un aumento del crecimiento, si bien ello depende de la interacción con otros factores ambientales. Esta respuesta al CO_2 está limitada por un proceso de aclimatación, que se manifiesta con un descenso de la fotosíntesis y de la proteína soluble en hojas y nódulos. El objetivo de este trabajo fue investigar si, tal como sugieren diversos autores, la aclimatación al CO_2 elevado se debe a una disponibilidad limitada de N y, por lo tanto, a una actividad nodular deficiente. Plantas de *Medicago sativa* cv. Aragón, inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*, crecidas en cámaras de crecimiento, se sometieron a distintos tratamientos de NH_4^+NO_3 (0, 5, 10, 15 mM) y CO_2 (700, 400 ppm). Se analizó el crecimiento, estado hídrico, fotosíntesis, proteínas y azúcares solubles, almidón, pigmentos fotosintéticos, etc. Las plantas nutridas con NH_4^+NO_3 crecieron más y respondieron mejor al aumento de CO_2 ; sin embargo, la aclimatación se mantuvo incluso en el tratamiento con la mayor dosis de NH_4^+NO_3 , en el que descendieron hasta en un 70% las proteínas solubles foliares. Se concluye que la aclimatación no se debió a una actividad deficiente del nódulo y por tanto a una insuficiencia en el suministro de N, sino más bien a una limitación de los sumideros.

Effect of NH_4^+NO_3 supply on nodulated alfalfa response to elevated CO_2 .

Nodulated alfalfa plants respond to elevated CO_2 by increasing growth, despite the rate depends of the interactions with other environmental factors. Alfalfa response to high CO_2 is also limited by acclimation, process expressed by significant reduction in photosynthetic rates as well as in leaf and nodule soluble proteins. The aim of this study was to investigate whether the N availability and therefore nodule activity, is inducing alfalfa acclimation as suggested by several authors. *Medicago sativa* cv. Aragón plants, inoculated with *Sinorhizobium meliloti*, were grown in growth chambers and subjected to NH_4^+NO_3 (0, 5, 10, 15 mM) and CO_2 (700, 400 ppm) treatments. Growth, water status, gas exchange, soluble proteins and sugars, starch, photosynthetic pigments, etc. were analyzed. Although plants fed with NH_4^+NO_3 respond better to high CO_2 , acclimation was also observed. In fact the highest NH_4^+NO_3 treatment (15 mM) showed significant (70%) reduction in leaf soluble proteins. It is concluded that the acclimation observed in nodulated alfalfa when growing under elevated CO_2 is not due to limited N availability or to deficient nodule activity, but to a sink limitation.

Agradecimientos: Ministerio de Educación y Ciencia (BFU-2004-05096/BFI), Fundación Caja Navarra, Fundación Universitaria de Navarra (PIUNA-2004), y Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

SI-19

Inoculantes para tréboles de pastos de dehesa.

Temprano, F.J.^{1*}, Rodríguez-Navarro¹, D.N. y Albareda¹, M.

Laboratorio de Inoculantes. IFAPA. Centro Las Torres-Tomejil. C^a Sevilla-Alcalá del Río km. 12,2. 41200 Alcalá del Río (Sevilla), España.

*francisco.temprano@juntadeandalucia.es

En los pastos de las dehesas del suroeste español, las leguminosas, entre las que se encuentran varias especies de tréboles, tienen gran importancia para mantener la fertilidad de los suelos al aportar el nitrógeno fijado en la simbiosis con *Rhizobium*. En ocasiones es conveniente inocular las semillas de tréboles en el momento de la implantación de la pradera para mejorar la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Se han seleccionado, bajo condiciones controladas en invernadero, 2 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* que muestran una alta efectividad en la fijación de nitrógeno con *Trifolium subterraneum*, *T. glomeratum*, *T. hirtum*, *T. cherleri* y *T. striatum*.

Se han preparado inoculantes sólidos, con turba de Padul o compost de corcho como soportes, utilizando esas estirpes de *Rhizobium*. Los estudios de supervivencia muestran que las poblaciones bacterianas, con ambos tipos de soportes, se mantienen en densidades superiores a 10^8 rizobios/g después de 6 meses de almacenamiento a 20-25 °C. También se ha estudiado la evolución de las densidades de esas estirpes de *Rhizobium*, sobre semillas de *T. subterraneum* inoculadas o peletizadas con carbonato cálcico o sepiolita. Se observó que el tiempo de reducción decimal de las poblaciones de los rizobios sobre las semillas, en los casos más favorables, fue de 20 días aproximadamente, bajo condiciones de conservación de 25 °C y 60 % de humedad relativa.

Inoculants for clovers in “dehesa” pastures. Legumes, including clovers, play an important role in pastures from “dehesa”, in Southwest Spain, because they maintain soil fertility by means of fixing nitrogen in symbiosis with rhizobia. Occasionally it is convenient to inoculate clover seeds, before seeding, to improve nodulation and nitrogen fixation in the pasture.

Two *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains were selected, under controlled conditions in greenhouse, which are highly effective in nitrogen fixation with *Trifolium subterraneum*, *T. glomeratum*, *T. hirtum*, *T. cherleri* and *T. striatum*.

Inoculants using those selected strains and peat from Padul or cork compost as carriers were prepared. Survival studies have shown that bacterial densities in both carriers were over 10^8 rhizobia/g after 6 months of storage at 20-25 °C. The survival of the *Rhizobium* strains on inoculated or pelleted seeds of *T. subterraneum*, using calcium carbonate or sepiolite as coating materials, were also studied. Mean decimal reduction times of approximately 20 days of the *Rhizobium* populations on seeds were observed in the best treatments under 25 °C and 60 % relative humidity of storage conditions.

SI-20

Caracterização de estirpes eficazes de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) em solos poluídos.**Videira e Castro, I.^{1*}, Sá-Pereira, P.², Simões F.², Matos, J.², e Ferreira, E.¹**¹Laboratório de Microbiologia do Solo, L-INIA, INRB, Oeiras, Portugal. ²Dep. Biotecnologia, Grupo de Biologia Molecular, INETI, Lisboa, Portugal.

*isabelvcastro@net.sapo.pt

A contaminação dos solos por metais pesados é um problema ambiental à escala mundial. Além da sua ocorrência natural, os metais pesados podem entrar no ambiente através de actividades antropogénicas. O estabelecimento de vegetação é uma importante actividade para a regeneração de solos poluídos industrialmente e as leguminosas podem aqui ter um importante papel, devido à sua capacidade de fixar azoto atmosférico e à sua adaptação a sistemas agrícolas de baixo "input".

Este trabalho teve como objectivo a caracterização da população rizobiana isolada de plantas de *Lotus uliginosus* crescidas em solos duma zona industrial com reconhecidos problemas de poluição (principalmente Hg e As). Foram avaliados diversos parâmetros designadamente a diversidade genética, especificidade de hospedeiro, eficácia da fixação de azoto e a tolerância ao Hg e As. Os padrões obtidos por REP e ERIC PCR revelaram a existência duma pequena diversidade genética entre a população de *Bradyrhizobium* analisada. No entanto, estes isolamentos foram eficazes na fixação de azoto e alguns deles tolerantes às concentrações mais elevadas de arsénio testadas. Estes resultados sugerem que algumas destas simbioses parecem estar bem adaptadas às condições ambientais adversas e poderão ser uma ferramenta útil para a biorremediação de solos contaminados.

Characterization of symbiotically effective *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) strains in polluted soils. Heavy metal contamination in soil is of major environmental concern on a world scale. Besides their natural occurrence, heavy metals may enter in the ecological environment through anthropogenic activities. The establishment of vegetation is an important activity for regeneration industrially polluted soils and leguminous plants can have here an important role, due their capacity to fix N₂ and adaptation to low input agricultural systems.

The aim of this work was to characterize rhizobial population isolated from *Lotus uliginosus* growing in soils from an industrial area with known pollution problems (mainly Hg and As). Genetic diversity, host specificity nodulation tests, efficiency to fix N₂, tolerance to Hg and As were evaluated. The patterns obtained by REP and ERIC PCR, indicated a small genetic diversity among the *Bradyrhizobium* isolates. However, these isolates were effective for nitrogen fixation and some of them showed tolerance to the highest As concentration tested. Our results suggested that some of these symbioses seem to be well adapted to the harsh environmental conditions and could be a suitable tool for bioremediation.

This work was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia - FCT (POCTI/AGG/46707/2002) and also by FEDER.

SESSÃO II/ SESIÓN II

Ecologia, diversidade e evolução

Ecología, diversidad y evolución

CTII-1

Biodiversidad de bacterias con capacidad formadora de nódulos en leguminosas.

Rivas, R.^{1*}, Velázquez, E.¹, Mateos, P.F.¹, Trujillo, M.E.¹, y Martínez-Molina, E.¹

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

*raulrg@usal.es

Las leguminosas comprenden alrededor de 18,000 especies que juegan un importante papel ecológico con representantes en casi cada uno de los sistemas biológicos de la Tierra. El éxito de las leguminosas puede ser atribuido a su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis con un tipo de bacterias conocidas como rhizobia. Los rhizobia forman en las raíces de las leguminosas unos nódulos donde reducen el nitrógeno atmosférico hasta una forma asimilable por la planta. Los rhizobia descritos hasta la fecha son muy diversos y su taxonomía ha cambiado considerablemente en los últimos 20 años dividiendo el género original *Rhizobium*, un miembro de las α -Proteobacteria, en varios géneros diferentes. Estos géneros de rhizobia son: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, (actualmente *Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Aparte de los rhizobia, en los últimos años, se ha documentado la nodulación y fijación de nitrógeno en leguminosas por bacterias no pertenecientes a los habituales géneros de rhizobia. Estas bacterias han sido agrupadas en las clases α y β de Proteobacteria e incluyen especies de los géneros *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* y *Burkholderia*. Todas estas bacterias son filogenéticamente (en referencia al gen ribosómico 16S) diferentes de los rhizobia pero, portan genes de nodulación similares. Con probabilidad, los genes *nod* fueron adquiridos mediante transferencia horizontal genética. Los estudios recientes indican que es posible que existan más bacterias simbiotes de leguminosas filogenéticamente alejadas de los tradicionales géneros de rhizobia.

Biodiversity nodulation in legumes. Members of the Leguminosae, comprising about 18,000 species, play an important ecological role, with representatives in nearly every type of biologic system on Earth. The success of legumes can be attributed to their ability to form nitrogen-fixing symbioses with specific bacteria known as rhizobia. Rhizobia forming nodules in roots in which they reduce atmospheric nitrogen to ammonia for the benefit of plant. The rhizobial species described so far are very diverse and their taxonomy has changed considerably over the last 20 years, with the original genus *Rhizobium*, a member of the alpha-Proteobacteria, now divided into several genera: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, (renamed as *Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium*. Apart from Rhizobia, in the past years, reports of nodulation and nitrogen fixation with legume hosts by bacteria that are outside the traditional rhizobial phylogenetic lineages have been documented and grouped under α and β class of Proteobacteria, which include the genera *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* and *Burkholderia*. All these new nodulating bacteria are phylogenetically (16S rDNA) distinct from the rhizobia, but do carry *nod* genes similar to those of rhizobia. The *nod* genes were most probably obtained by these new nitrogen fixing legume symbionts through lateral-gene transfer. Recent reports confirm that it is quite likely that more such bacteria, capable of effective nodulation will be discovered outside the traditional rhizobia.

CTII-2

Diazotrofia e diversidade microbiana: do isolamento em cultura à metagenómica.

Tenreiro, R.*

*Faculdade de Ciências, BioFIG-Centro de Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa. *rptenreiro@fc.ul.pt*

A diazotrofia, capacidade de fixação de azoto, é uma propriedade exclusiva de organismos procariotas e baseia-se no sistema enzimático da nitrogenase, embora possa ocorrer numa variedade de contextos metabólicos em ambientes aeróbios e anaeróbios. Tendo em conta que os diazotrofos isolados em cultura se distribuem por vários grupos filogenéticos de bactérias e arqueas e que o estudo comparativo das nitrogenases e dos genes *nif* associados revelou um elevado grau de conservação, mesmo entre as nitrogenases convencionais (nitrogenases de Mo) e as alternativas (nitrogenases de V ou Fe), o processo de fixação de azoto parece ter surgido num estado muito inicial da evolução dos microrganismos procariotas sendo a sua distribuição actual resultante de transmissão vertical, eliminação e transferência horizontal de genes. Esta ocorrência em distintas linhas filogenéticas de procariotas limita o uso da abordagem habitual baseada no gene de rRNA 16S como marcador para revelar a diversidade global de diazotrofos numa comunidade ou ecossistema, devido à impossibilidade de desenhar oligonucleótidos iniciadores de PCR exclusivamente selectivos para um grupo microbiano tão diverso. Consequentemente, os genes *nif* posicionam-se como alvos genómicos suficientemente conservados para revelar de modo fiável a diversidade de diazotrofos num ambiente particular, recorrendo a uma estratégia baseada em DNA extraído da comunidade. Além disso, os genes *nif* podem também ser usados, numa abordagem transcriptómica baseada em RNA extraído da comunidade, para avaliar os padrões espaciais e temporais da diversidade funcional de diazotrofos no ambiente e elucidar os mecanismos de regulação da expressão dos genes *nif*. De modo a ilustrar estes assuntos serão utilizados vários exemplos com o objectivo adicional de apresentar uma visão geral das várias estratégias experimentais que são actualmente usadas para avaliar, numa abordagem baseada em DNA or RNA, a diversidade de diazotrofos em ecossistemas.

Diazotrophy and microbial diversity: from culture-based approaches to metagenomics. Diazotrophy, the ability to fix nitrogen, is restricted to prokaryotic microbes and in all known diazotrophs, isolated by a culture-based approach, relies on the nitrogenase enzyme system, although occurring in diverse metabolic contexts in both aerobic and anaerobic environments. Diazotrophs are widely distributed across both the bacterial and archaeal domains of life and their nitrogenases, either conventional (Mo-dependent) or alternative (V-dependent and Fe-dependent), show high levels of structural conservation, pointing to a very early occurrence of the process of nitrogen fixation in prokaryotic evolution, with its present distribution being shaped by vertical transmission, gene loss and lateral gene transfer. This overall spread amongst prokaryotic lines of descent limits the use of the common 16S rRNA gene marker approach to unveil the hidden/uncultivable diversity of diazotrophs at a community or ecosystem level, since no broad-range/universal PCR primers can be designed to encompass such a diverse group. As a consequence, the relatively conserved nitrogenase genes (*nif*) are more suitable genomic targets to assess, in a reliable way, the diversity of diazotrophs of a particular environment, using a whole-community DNA strategy. Furthermore, *nif* genes can also be used in a transcriptomic approach with whole-community RNA to evaluate both spatial and temporal patterns of functional diversity of diazotrophs in the environment, also providing clues about the regulating mechanisms of *nif* genes expression. To illustrate these issues several examples will be presented aiming to additionally provide an overview of the several experimental strategies that are currently used to assess, in a DNA or RNA-based approach, the diversity of diazotrophs in ecosystems.

SII-1

Biodiversidad de bifenilo-dioxigenasas en suelo y rizosfera de un sitio contaminado por PCBs.

Aguirre de Cárcer, D., Martín, M., y Rivilla, R.*

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid. España.

**rafael.rivilla@uam.es*

La bifenilo dioxigenasa es la primera enzima en la vía aeróbica de degradación de bifenilo y PCBs. Esta enzima multimérica, es la responsable de la especificidad por el sustrato y la región hidrofóbica donde se une éste, se localiza en la subunidad α (ISP α), que es una proteína que contiene Fe y S. Hemos estudiado la biodiversidad de genes de ISP α en suelo y rizosfera utilizando muestras de un sitio contaminado por PCBs en Lhenice (R. Checa). Se amplificó ADN extraído de ambos habitat utilizando cebadores que incluían la región que codifica el centro activo y el sitio de unión al sustrato. Los productos de PCR se clonaron para generar una genoteca. Las secuencias de ISP α recuperadas de la librería indican un alto grado de diversidad filogenética y catabólica. Muchas secuencias agruparon con secuencias de bifenilo dioxigenasas de bacterias Gram -. Un grupo distinto, que se compone de secuencias de este estudio, algunas secuencias descritas previamente de muestras ambientales y una posible ISP α de *Sphingomonas wittichii* RW1, parece contener mayor diversidad que la que se reconoce para toda la subfamilia de las tolueno/bifenilo dioxigenasas. Además, la rizosfera seleccionó dos secuencias ISP α que representaron casi el 60% de la librería, que son muy similares a secuencias de *Pseudomonas*. Estamos utilizando una librería de metagenoma para aislar genes que codifiquen nuevas bifenilo-dioxigenasas que pueden ser útiles en la biorremediación de PCBs.

Biodiversity of biphenyl-dioxygenases in soil and rhizosphere from a PCB polluted soil. Biphenyl dioxygenase is the first enzyme in the aerobic pathway for biphenyl and PCBs degradation. This enzyme is also responsible for substrate specificity and the hydrophobic pocket that binds the substrate is located in the Iron Sulfur subunit α (ISP α). In order to study the biodiversity of ISP α genes in soil and rhizosphere from a soil with a history of PCBs contamination, we amplified and cloned DNA extracted from a site in Lhenice (Czech Republic) with primers that span a region containing the active centre and the substrate binding site. The ISP α sequences retrieved from the library indicate a high degree of catabolic and phylogenetic diversity. Many sequences clustered with biphenyl dioxygenase sequences from Gram- bacteria. A distinct cluster, that was composed of sequences from this study, some previously described environmental sequences and a putative ISP α from *Sphingomonas wittichii* RW1, seems to contain greater diversity than the presently recognized toluene/biphenyl dioxygenase subfamily. Moreover, the rhizosphere selected for two ISP α sequences that accounted for almost 60% of the gene library and were very similar to sequences harboured by *Pseudomonas* spp. We are using a metagenome library to try to isolate genes encoding novel biphenyl dioxygenases that can be useful in PCBs bioremediation.

SII-2

Avaliação da diversidade de rizóbios de grão-de-bico em Portugal revela grande variedade de espécies.

Alexandre, A., Brígido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S., e Oliveira, S.*

ICAM (Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas), Universidade de Évora, Portugal.

*ismo@uevora.pt

O grão-de-bico é uma das mais importantes leguminosas no mundo sendo cultivada pelas suas sementes ricas em proteína. Para além dos dois microsimbiontes específicos de grão-de-bico, *Mesorhizobium ciceri* e *M. mediterraneum*, estirpes próximas de outras três espécies também induziram nódulos efectivos em grão-de-bico [1, 2]. O objectivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de populações naturais de rizóbio de grão-de-bico no território Português. Os rizóbios foram isolados de solo das 13 províncias Portuguesas. Foram obtidos 110 isolados de 11 províncias, capazes de nodular grão-de-bico em ensaios de re-inoculação. Todos os isolados pertencem ao género *Mesorhizobium* e estão distribuídos em quatro grandes grupos, tal como revelado pela filogenia baseada no 16S rDNA. Além disso, os isolados são muito diversos agrupando com quase todas as espécies de *Mesorhizobium*, excepto *M. albiziae*, *M. chacoense* e *M. thiogangeticum*. É de salientar que apenas 37% agrupam com *M. ciceri* e *M. mediterraneum*. A associação detectada entre grupo de espécies e local de origem dos isolados sugere uma distribuição geográfica das espécies. 40% dos isolados revelaram eficiência simbiótica (SE) superior a 50% e cerca de 10% dos isolados revelaram SE>75%. Tanto quanto sabemos este é o primeiro estudo sobre rizóbios abrangendo todas as províncias Portuguesas e mostra que várias espécies de *Mesorhizobium* são capazes de nodular eficientemente grão-de-bico.

A survey of chickpea rhizobia in Portugal shows high diversity of species.

Chickpea is one of the most important legumes worldwide, being cultivated for its rich protein seeds. Besides the two specific chickpea microsymbionts, *Mesorhizobium ciceri* and *M. mediterraneum*, strains close to other three species were able to induce effective nodules in chickpea [1, 2]. The aim of this study was to evaluate the diversity of chickpea rhizobia natural populations from Portugal. Rhizobia were isolated using soil from the 13 provinces of Portugal. A total of 110 isolates, able to nodulate chickpea in the re-inoculation assay, were obtained from 11 provinces. All isolates are assigned to the genus *Mesorhizobium* and are comprised in four main clusters, as revealed by the 16S rDNA-based phylogeny. Furthermore, isolates are highly diverse grouping with almost all *Mesorhizobium* species, with the exception of *M. albiziae*, *M. chacoense* and *M. thiogangeticum*. Interestingly, only 37% grouped with *M. ciceri* and *M. mediterraneum*. The association found between species group and origin site of the isolates suggests a geographical distribution of species. 40% of the isolates showed a symbiotic effectiveness (SE) above 50% and about 10% of the isolates showed SE>75%. To our knowledge this is the first study focusing on indigenous rhizobia from all Portuguese provinces and it shows that several *Mesorhizobium* species are able to effectively nodulate chickpea.

Funding: FCT project POCTI/BME/44140/2002, co-financed by EU-FEDER; FCT grants to M.L. (SFRH/BD/6772/2001, SFRH/BPD/27008/2006), A.A. (SFRH/BD/18162/2004) and C.B. (SFRH/BD/30680/2006).

1. Laranjo et al. (2004) FEMS Microbiology Ecology 48: 101-107

2. Rivas et al. (2007) Letters in Applied Microbiology 44: 412-418

SII-3

Caracterización molecular de la película taponante en membranas acopladas a un reactor anaerobio.

Calderón, K.^{1*}, Cabirol, N.¹, González-López, J.², y Noyola, A.¹.

¹*Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.* ²*Grupo de Microbiología Ambiental, Facultad de Farmacia, UGR, España.*

**kcalderona@iingen.unam.mx*

Los Biorreactores anaerobios de membrana (BRAM) ofrecen una muy buena alternativa para el tratamiento y reuso del agua residual tanto industrial como municipal, consiguiendo la eliminación de materia orgánica y compuestos de nitrógeno en el agua tratada. Sin embargo existe un fenómeno inevitable y difícil de controlar en el proceso, que es el *biofouling* o biotaponamiento de membranas, lo cual se explica por acumulación de material orgánico, inorgánico y adhesión de microorganismos, así como por su crecimiento y proliferación en la superficie de la membrana. Dado que el biotaponamiento de la membrana filtrante es un fenómeno inevitable en el tratamiento de agua, una de las prioridades actuales en la investigación de este campo es controlar ese taponamiento y desarrollar membranas con materiales anti-fouling. En ese sentido, el objetivo de este trabajo es entender el proceso de formación y sus propiedades, centrándose en la identificación y caracterización de la microbiota que forma la biopelícula taponante por medio de herramientas de biología molecular (PCR, TGGE) y microscopía electrónica, en las membranas de ultrafiltración (PVDF 100 KDa), acopladas a un reactor anaerobio (UASB de 0.87 m³) para el tratamiento de agua residual municipal.

Molecular characterisation of the fouling biofilm formed on anaerobic membrane bioreactors. Anaerobic membrane bioreactors (AMBR) have been recently applied for anaerobic wastewater treatment, mostly from industries. A current challenge for this technology is to enter into the rapidly increasing field of municipal wastewater reclamation. One of the research priorities is focused on fouling control and development of anti-fouling membranes. In order to advance on these research subjects, a thorough understanding of the fouling phenomena is required. The main object of this research is to understand the phenomena of biofouling in an anaerobic reactor (0.87m³) coupled to an ultrafiltration membrane (PVDF 100 KDa) arrangement, fed with municipal wastewater. Our research strategy is aimed to characterize the fouling layer and identify the main causes of its formation, identifying the microbiote by PCR-TGGE and SEM.

SII-4

Aislamiento y caracterización genotípica de endosimbiontes de *Cytisus triflorus*.

Chahboune, R. ¹, Barrijal, S.¹, y Bedmar, E.J.^{2*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Técnicas, Universidad Abdelmalek Essaadi, Tánger, Morocco, y ²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España.
*ejbedmar@eez.csic.es

La diversidad genética de 70 aislados obtenidos a partir de nódulos de las raíces de *Cytisus triflorus* crecidas en condiciones naturales en las regiones Awdal y Fifi del Rif marroquí se ha analizado mediante ensayos REP (Repetitive Extragenic Palindromic fingerprinting) y secuenciación del gen 16S rRNA. Los aislados se distribuyeron en 19 grupos, y el gen 16S rRNA de un aislado representante de cada grupo se secuenció casi en su totalidad. El análisis de las secuencias demostró que los aislados estaban relacionados con rizobios del género *Bradyrhizobium* de las α -Proteobacteria, excepto uno de ellos que se clasificó como perteneciente al género *Mesorhizobium*. La construcción de un árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA indicó que 2 aislados se agruparon con *B. japonicum* USDA6^T, que 7 de ellos lo hicieron con *B. betae* L7HG1^T, y que otros 6 formaron un cluster con *B. canariense* BC-C2. El resto de los aislados no se agrupó con ninguna especie tipo de *Bradyrhizobium*. La identidad de la secuencia de cada uno de los aislados con las de las especies de *Bradyrhizobium* depositadas en GenBank fueron inferiores al 99%, lo que sugiere que los aislados de *C. triflorus* pudieran pertenecer a especies no descritas hasta la fecha.

Phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating *Cytisus triflorus*. The genetic diversity of 70 endophytic bacterial strains isolated from root nodules of *Cytisus triflorus* grown in the Awdal and Fifi regions of the Moroccan Rif was analysed by Repetitive Extragenic Palindromic (REP) fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. The isolates were distributed into 19 REP groups, and a representative strain from each group was subjected to nearly complete 16S rRNA gene sequencing. Analysis of these sequences showed that the isolates were mainly related to species of the genera *Bradyrhizobium* from α -Proteobacteria. One isolate, however, was classified as *Mesorhizobium*. A 16S rRNA-based phylogenetic tree showed that 2 isolates clustered with *B. japonicum* USDA6^T, other 7 isolates grouped with *B. betae* L7HG1^T, and that other 6 isolates were close to *B. canariense* BC-C2. The remaining isolates did not cluster with any of the *Bradyrhizobium* type strains. For each isolate, the identity of its sequence compared with those of the *Bradyrhizobium* species in GenBank was lower than 99%, which suggests that isolates from *C. triflorus* could belong to hitherto undescribed bacterial species.

Agradecimientos: Este trabajo se ha subvencionado con fondos del Proyecto de Investigación CGL2006-06870/BOSS del Ministerio de Educación y Ciencia. También se agradece la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación BIO-275.

SII-5

El simbiosoma de altramuz desde la perspectiva de la evolución de los orgánulos celulares.

Coba de la Peña, T.¹, Fedorova, E.^{1,2}, Santamaría, R.¹, Lucas, M.M.¹, y Pueyo, J.J.^{1*}

¹Department of Plant Physiology and Ecology, Instituto de Recursos Naturales, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115-bis, E-28006 Madrid, Spain, ²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Botanicheskaya 35, Moscow, 127276, Russia. *pueyo@ccma.csic.es

Hace unos 1500 millones de años, ciertas bacterias endosimbióticas perdieron su capacidad de vivir fuera de la célula huésped y dieron lugar a las mitocondrias y los plastidios. Durante este proceso, la célula huésped se hizo igualmente dependiente de las funciones de estos orgánulos. Los rizobios endosimbióticos están lejos de ser orgánulos celulares, pero funcionan como tales respecto a la fijación de nitrógeno ya que desarrollan una dependencia metabólica mutua con la célula. En la mayoría de los nódulos, los rizobios infectan células postmitóticas, que pierden su capacidad de división. Sin embargo, en el nódulo de altramuz, las células infectadas por *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) mantienen su capacidad mitótica durante varios ciclos. La reorganización del citoesqueleto y el movimiento de los simbiosomas sugieren mecanismos de segregación semejantes a los descritos para otros orgánulos (Fedorova *et al.*, J. Exp. Bot. 58:2225-36, 2007). En este trabajo mostramos una perspectiva evolutiva de esta simbiosis en comparación con otros tipos de asociaciones endosimbióticas tanto en leguminosas como en otros organismos, así como un análisis comparativo de datos anatómicos, fisiológicos y genéticos que pueden permitir determinar el grado de adaptación y coevolución de la simbiosis. Los datos sugieren que el microsimbionte de altramuz podría ser considerado un eslabón en la evolución de los orgánulos celulares.

The lupin symbiosome from the perspective of cell organelle evolution. Some 1500 million years ago, certain endosymbiotic bacteria lost their ability to live outside cells and gave rise to mitochondria and plastids; in this process, the host cell became equally dependent on organelle functions. Endosymbiotic rhizobia are far from being organelles, but they act like plant cell organelles in terms of nitrogen fixation, as they develop a mutual metabolic dependence with the host legume. In most nodules, rhizobia infect postmitotic cells, which lose their ability to divide. Nevertheless, lupin nodule cells infected by *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) maintain their capacity to undergo mitosis during several cell cycles. Cytoskeleton dynamics and symbiosome movement suggest segregation mechanisms similar to those described for other organelles (Fedorova *et al.*, J. Exp. Bot. 58:2225-36, 2007). In this work we present an evolutionary view of this symbiosis in comparison with other endosymbiotic associations in legumes and in other organisms, as well as a comparative analysis of anatomical, physiological and genetic data, which may serve to determine the degree of adaptation and coevolution of symbiosis. Data suggest that the lupin microsymbiont may be considered as a link in cell organelle evolution.

SII-6

Diversidad bacteriana en la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*) en los bosques de Lomas de Atiquipa (Perú).

Cordero, I.^{1,2*}, Coba de la Peña, T.¹, Rincón, A.M.¹, Villegas, L.³, Ruiz-Diez, B.¹, Fajardo, S.¹, Morcillo, C.¹, Lucas, M.M.¹, Fernández-Pascual, M.¹, Manrique, E.¹, Jiménez, P.³, Balaguer, L.², y Pueyo, J.J.¹

¹Dpto. de Fisiología y Ecología Vegetal, Instituto de Recursos Naturales, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid, España, ²Dpto. de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, U. Complutense de Madrid, España, ³Dpto. de Ecología, Escuela Profesional y Académica de Biología, U. Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.

*cordero.ire@gmail.com

La tara, *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze, es la especie arbórea predominante en los bosques de Lomas de Atiquipa (Perú). Esta zona presenta un gran valor ecológico ya que se trata del mayor ecosistema con vegetación en el desierto de Atacama. El objeto de este trabajo es la caracterización de bacterias presentes en la rizosfera de tara que pueden ser empleadas como biofertilizantes o promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) para favorecer la restauración de este ecosistema. Aunque no se ha descrito que la tara, como leguminosa, sea capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno, es posible que su crecimiento resulte favorecido por la presencia de rizobios. Se aislaron rizobios a partir de los nódulos formados por leguminosas trampa cultivadas en suelos recogidos en Arequipa, Tacna, Ayacucho y Apurímac. Mediante secuenciación directa y filogenia del gen 16S rDNA, se identificaron rizobios muy próximos a las especies *Rhizobium etli*, *R. gallicum*, *Sinorhizobium* sp. y *S. fredii*. También se caracterizaron diversas bacterias en la rizosfera de tara, entre ellas algunas próximas *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. y *P. putida*. Las bacterias aisladas se ensayarán como inoculantes para estudiar su posible efecto estimulador del crecimiento de tara.

Bacterial diversity in the rhizosphere of tara (*Caesalpinia spinosa*) in the forests of Lomas de Atiquipa, Perú. Tara, *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze, is the predominant tree species in the forests of Lomas de Atiquipa, Peru. This area has high ecological value as it represents the largest ecosystem with vegetation in the Atacama Desert. The aim of this work was the characterization of bacteria from the rhizosphere of tara that could be applied as biofertilizers or plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to facilitate the restoration of this ecosystem. Tara is a legume, but it has not been described to form nitrogen-fixing nodules. However, the presence of rhizobia could possibly stimulate its growth. Rhizobia were isolated from nodules formed by trap legumes grown in soils collected in Arequipa, Tacna, Ayacucho and Apurímac. 16S rDNA gene sequencing and phylogeny was used to identify several rhizobia that were closely related to the species *Rhizobium etli*, *R. gallicum*, *Sinorhizobium* sp. and *S. fredii*. Different other bacteria were isolated from the rhizosphere of tara, some of which were found to be close to *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. and *P. putida*. Isolated bacteria will be tested as inoculants in order to study their possible growth promoting effect.

SII-7

Comparación de los sistemas de resistencia a As/Sb en especies de *Ensifer*.

Dary, M., Pajuelo, E., Gamane D., Lafuente, A., Rodríguez-Llorente, I.D., Doukkali, B., Palomares, A.J. ^(†), y Caviedes, M.A. *

(†) *In memoriam*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Profesor García González, 2, 41012-Sevilla. *caviedes@us.es

Se han aislado 27 *Rhizobium* de nódulos de plantas del género *Medicago* crecidas en suelos contaminados afectados por el vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar. Hemos analizado la resistencia a As de todas las cepas aisladas, encontrando que existe una gran variabilidad entre ellas, de modo que la CMI para arsenito puede variar desde 1 a 10 mM. Igualmente, se producen también diferencias en la resistencia a arseniato y antimonio, conferida por el mismo operón. El perfil de megaplásmidos indica una alta biodiversidad en suelos contaminados, siendo las cepas, además, simbióticamente efectivas. Se han utilizado criterios basados en los perfiles de megaplásmidos, la amplificación de genes *exo* y la secuenciación del ADN ribosómico 16S y de las regiones intergénicas ADN_r 16S – ADN_r 23S para establecer una diferencia entre las bacterias que presentan resistencia alta o intermedia (CMI para arsenito 3-10 mM) o baja (CMI 1-2 mM). Los resultados parecen indicar que las bacterias más resistentes pertenecen a la especie *Ensifer medicae*, mientras que las menos resistentes pertenecerían a la especie *E. meliloti*. Se ha detectado la presencia de operones de resistencia a As, de localización plasmídica, en ambas especies. Sin embargo, la organización génica es diferente. La existencia de una bomba de arsenito (*arsB*) en *S. medicae*, frente a un canal de tipo “aquagliceroporin” en *S. meliloti*, parece ser lo que determina una mayor resistencia en las cepas pertenecientes a la primera especie.

A comparison of the As/Sb resistance systems in *Ensifer* species. A collection of 27 *Rhizobium* strains have been isolated from nodules of *Medicago* plants grown on contaminated soils of the Aznalcóllar mine after the toxic spill. The resistance of all of them to arsenite has been analysed. A high variability has been found, with MICs for arsenite ranging from 1 to 10 mM. Differences were also found on the resistance to arsenate and antimony, conferred by the same operon. Megaplasms profiles indicate a great biodiversity on these contaminated soils, being furthermore the strains symbiotically effective. Data based on megaplasmid profiles, amplification of *exo* genes and sequencing of 16S rDNA as well as 16S rDNA-23S rDNA intergenic regions indicate species specific differences among the high and medium resistant strains (MIC for arsenite 3-10 mM) and those with low resistant (MIC 1-2 mM). Results suggest that high resistant strains may belong to the *Sinorhizobium medicae* species, while low resistant strains probably belong to *S. meliloti*. The presence of arsenic resistance operons, localized in megaplasms, has been shown in both types of strains. However, different gene organisation has been observed. The presence of an arsenite pump (*arsB*) in *S. medicae*, in the place of an aquaglyceroporin in *E. meliloti*, allows the first one to tolerate much higher arsenic concentrations.

SII-8

Aislamiento de rizobios que nodulan habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) en agrosistemas de montaña de la República Dominicana.

Díaz-Alcántara, C.¹, Mulas, D.², Velázquez, E.³, Casquero, P.², y González-Andrés, F.^{2*}

¹Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma Santo Domingo. República Dominicana. ²Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad de León. ³ Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca *fernando.gonzalez@unileon.es

El objetivo de este trabajo fue aislar bacterias simbiotes fijadoras de nitrógeno atmosférico a partir de nódulos de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.), en agrosistemas de montaña con agricultura de subsistencia, de la región centro-norte de la República Dominicana, para estudiar la biodiversidad de los mismos y evaluar su capacidad de nitro fijación con la finalidad de desarrollar biofertilizantes. Se obtuvieron 60 aislados de nódulos radiculares en un total de 14 suelos distribuidos de manera homogénea en 3 provincias: Elías Piña, San José de Ocoa y La Vega. La presencia de plantas noduladas fue próxima al 100% en todas las provincias salvo La Vega donde hubo algunas parcelas con incidencia de nodulación media o baja. Dieciocho de los 32 aislados que re infectaron las plantas inoculadas, mostraron una eficiencia significativa en la fijación de nitrógeno atmosférico y constituyen el grupo de cepas con los que se realizarán posteriores ensayos en microcosmos y campo para la elaboración del biofertilizante. Estos 32 aislados presentaron 15 perfiles diferentes de TP-RAPD, de los cuáles 5 estuvieron representados por dos o más cepas. En el futuro se procederá a la identificación taxonómica de un representante de cada perfil TP-RAPD, mediante la secuenciación de genes específicos.

Isolation of rhizobia nodulating "habichuela" (*Phaseolus vulgaris* L.) in mountainous agrsystems in Dominican Republic. The objective was to isolate "habichuela" (*Phaseolus vulgaris* L.) N₂ fixing simbiotes from mountainous subsistence agrosystems located in central-north Dominican Republic, in order to study the biodiversity and to appraise its N₂ fixing ability for the development of biofertilisers. Sixty isolates were extracted from radicular nodules from 14 soils distributed homogenously in three provinces: Elías Piña, San José de Ocoa and La Vega. The presence of nodulated plants was close to 100% except in La Vega province where some plots showed a medium or low incidence. Eighteen of the 32 isolates that re infected the plants inoculated, showed a significant rate of nitrogen fixation, and are the group of strains that will be studied in microcosm and in field experiments for the biofertiliser development. The 32 isolates showed 15 different TP-RAPD profiles, 5 of them being represented by 2 or more strains. In the future, the taxonomic identification of a representative of each TP-RAPD group will be carried out by specific genes sequentiation.

SII-9

Diversidad microbiana en suelos contaminados con metales pesados.

Doukkali, B.¹, Pérez-Paniagua F.¹, Dary, M.¹, El Aafi, N.², Brhada, F.², Filali-Maltouf, A.², Gamane D.¹, Caviedes, M.A.^{1*}, Palomares, A.J.^{1(†)}, y Pajuelo, E.¹

(†) *In memoriam*

¹Dpto. Microbiología y Parasitología, Fac. Farmacia, Univ. de Sevilla y ²LMBM, Univ. Mohamed V, Faculté des Sciences, Agdal, Rabat. Marruecos. *epajuelo@us.es

Se ha estudiado la diversidad microbiana en tres suelos de Andalucía y Marruecos contaminados por diferentes metales pesados y metaloides: a) suelo de la región minera de Middelt (Marruecos), contaminado principalmente por Zn y Pb, b) suelo de la zona minera de Riotinto, con altas concentraciones de Cu y Fe fundamentalmente, y c) suelo afectado por el vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar (Sevilla), con contaminación residual por As, Cd, Cu, Pb y Zn. Por una parte se ha constatado una correlación logarítmica inversa entre la densidad bacteriana y el índice de polución (PI). A pesar de los índices de polución, bastante elevados en algunas de las localizaciones, se ha encontrado una amplia biodiversidad en la población microbiana, puesta de manifiesto mediante perfiles plasmídicos o ADNr 16S-RFLP. Por otro lado, se ha estudiado la resistencia a As y metales pesados en las bacterias aisladas, encontrándose que en general la resistencia de las bacterias rizosféricas fue mayor que la de las bacterias de vida libre. Se han identificado las cepas que presentaban una mayor resistencia a metales mediante la secuenciación del ADNr 16S, observándose una diferencia entre los géneros de bacterias más resistentes en cada localización. Algunas de estas bacterias muestran un gran potencial en biorremediación de metales, en sistemas integrados planta-bacteria. Tal es el caso de varios *Rhizobium* simbióticamente efectivos y altamente resistentes a As. Además, es frecuente el caso en estos suelos contaminados, de leguminosas noduladas por diferentes géneros de α - y β -proteobacterias, como *Ochrobactrum sp.* y *Serratia proteamaculans*.

Bacterial diversity of heavy-metal contaminated soils. An analysis of bacterial diversity has been performed in three contaminated mine sites of Andalusia (Southern Spain) and Morocco: a) soils from Middelt region of Morocco, mainly polluted by Zn and Pb, b) soils at the Riotinto mine area, rich in Fe and Cu, and c) soils affected by the toxic spill occurred at the Aznalcóllar (Seville) mine, with residual contamination by As, Cd, Cu, Pb and Zn. Density of free bacteria in these soils showed an inverse logarithmic correlation vs. the pollution index. In spite of that, a high bacterial biodiversity (based on megaplasmid profile or 16S rDNA-RFLP) was found, even in soils with high pollution index. Furthermore, the resistance of these bacteria to As and heavy metals has been studied, being in general rhizosphere bacteria more resistant to heavy metals than free heterotrophic bacteria. The most resistant bacteria have been identified using commercial identification systems and 16S rDNA sequencing. We found differences in the most representative genera of bacteria in the different sites. Some of these bacteria show a potential in bioremediation of heavy metals in soils, in an integrated plant-bacteria bioremediation system. Among them, many *Rhizobium* were isolated, being some of them highly resistant to As and also symbiotically effective. More frequently, legumes appeared to be nodulated by different α - and β -proteobacteria, such as *Ochrobactrum sp.* and *Serratia proteamaculans*.

SII-10

Caracterização genotípica de estirpes de rizóbio isoladas de luzernas anuais por M13-PCR.

Dourado, A.C.¹, Alves, P.I.¹, Marques, J.F., Tenreiro, T.², Tenreiro², R., Barreto Crespo, M.T.¹, e Fareleira, P.^{3*}

¹IBET/ITQB, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal, ²ICAT, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, ³Laboratório de Microbiologia do Solo, L-INIA, INRB, Oeiras, Portugal. *paula.fareleira@gmail.com

A técnica de fingerprinting genómico por M13-PCR baseia-se na utilização de um *primer* específico para uma sequência particular do gene que codifica para a proteína *core* do bacteriófago M13 e que se verificou estar presente em repetições múltiplas e hipervariáveis nos genomas conhecidos. Neste estudo, o método foi aplicado pela primeira vez à avaliação da diversidade genotípica de isolados de nódulos radiculares de luzernas anuais, provenientes de diversas regiões do sul e centro de Portugal, com diferentes características geológicas, topológicas e climáticas. O DNA genómico de cada isolado foi amplificado por PCR usando o *primer* M13 e os perfis de fragmentos de DNA resultantes foram submetidos a análise aglomerativa usando o software Bionumerics. O agrupamento hierárquico dos padrões de M13-PCR mostrou diferenças significativas entre os isolados e permitiu o estabelecimento de vários grupos genotípicos, cada um incluindo isolados com diferentes origens geográficas e provenientes de diferentes tipos de solos. Foram seleccionados membros representativos de cada grupo para identificação por sequenciação do rDNA 16S, a fim de avaliar o significado taxonómico do agrupamento. A análise dos isolados por ERIC-PCR, usando os *primers* ERIC1R e ERIC2, resultou na associação em grupos diferentes, mostrando que os dois métodos possuem diferentes poderes discriminatórios; os resultados foram usados para uma análise combinada dos dados produzidos por ambos métodos.

M13-PCR fingerprinting of root-nodule isolates from annual medics. The M13-PCR genomic fingerprinting method is based on the use of a single primer, specific to the core sequence of phage M13 minisatellite DNA, to amplify hypervariable genomic DNA sequences, and so far has not been applied to the characterization of rhizobial populations. In this study, the method was used to evaluate the genotypic diversity of root-nodule isolates from annual medics, obtained from several locations in southern and central Portugal with different geological, topological and climatic conditions. The genomic DNA of each isolate was amplified by PCR using the primer M13, and the Bionumerics software was used to perform densitometric and band based analysis of the resulting patterns of DNA fragments. The hierarchical clustering of the M13-PCR profiles showed significant differences among the isolates and allowed the distinction of several major groups of genotypes, each one including isolates with distinct geographic origins and from different soil types. Representative members of each cluster were selected for identification by 16S rDNA sequencing, in order to evaluate if the clustering was taxonomically significant. Different grouping of the isolates was obtained by ERIC-PCR using primers ERIC1R and ERIC2; the results were used for a combined analysis of the typing data produced by the two methods.

Trabalho realizado no âmbito do Projecto POCTI/AGG/46371/2002, co-financiado pelo FEDER.

SII-11

Aplicación de la técnica DGGE en el estudio de la diversidad de *Frankia*.

Gallina, O.*, Valverde, A., González-Tirante, M., Santa Regina, I., e Igual, J.M.

*Departamento de Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroforestales y Ganaderos, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC, Salamanca, España. *onofrio.gallina@irnasa.csic.es*

Por su importancia para el hombre y por su amplia distribución en nuestro planeta, las simbiosis mutualistas fijadoras de N₂ más importantes son la establecida entre rizobios y leguminosas, y la simbiosis actinorrícica, que comprende a más de 200 especies de dicotiledóneas leñosas asociadas simbióticamente con el actinomiceto *Frankia*. La ubicuidad de *Frankia* es bien notable, encontrándose en latitudes inhóspitas y en suelos desprovistos de especies actinorrícicas, lo que indica una existencia como saprofita y buena competitividad frente a otros microorganismos edáficos. Se sabe de la alta diversidad de *Frankia*, pero los estudios sobre su biodiversidad encuentran la dificultad del difícil aislamiento y crecimiento *in vitro* de este actinomiceto. Por ello, las técnicas moleculares de alto poder resolutivo que, sin necesidad de aislamiento, permiten analizar la diversidad microbiana en muestras ambientales pueden ser extremadamente útiles en el caso de *Frankia*. El objetivo de este trabajo fue, por tanto, adaptar la técnica DGGE al estudio de la diversidad de este microsimbionte. El protocolo seguido comprende la amplificación, mediante PCR anidada, de un fragmento hipervariable del gen 16S rRNA con, en primer lugar, los cebadores específicos de *Frankia* FN1F y FN1R; y, posteriormente, con los cebadores FNF y GC-X5R, que permiten obtener fragmentos de 400 pb apropiados para su separación mediante DGGE. Esta metodología ha dado resultados satisfactorios con diversas muestras ambientales.

Application of the DGGE technique in the study of the diversity of *Frankia*.

Due to their great importance for humankind and worldwide distribution, the most important N₂-fixing mutualistic symbioses are that established between rhizobia and legumes and the actinorrhizal symbiosis, the later including more than 200 woody dicotyledonous plant species symbiotically associated with the actinomycete *Frankia*. The great ubiquity of *Frankia*, which is found in inhospitable latitudes and in soils devoid of actinorrhizal plants, indicates that it can live as a saprophyte and compete with soil microorganisms. It is known that *Frankia* has a great genetic diversity but studies on biodiversity face the difficult isolation and slow growth *in vitro* of this actinomycete. Therefore, molecular techniques with high resolution power that, without the need of isolation, allow analyzing the microbial diversity in environmental samples can be extremely useful in the case of *Frankia*. The aim of this work was, therefore, to adapt the DGGE technique to study the diversity of this microsymbiont. The methodology followed includes the amplification by nested PCR of a hypervariable fragment of the 16S rRNA gene with, first, the specific primers for *Frankia* FN1F and FN1R; and, later, with the primers FNF and GC-X5R, by which fragments of 400 bp appropriate for separation through DGGE are obtained. This methodology has been successful with different environmental samples.

SII-12

Evolución de la microbiota en suelos agrícolas con manejo diferenciado, ecológico y convencional, y anulación de la influencia del tipo de manejo por el efecto rizosférico.

García-Galavís, P.A., Grande, M.J.*, Santamaría, C., Herencia, J.F., Ruiz-Porras, J.C., Jiménez, J.A., y Daza, A.

IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil", Apto. Oficial 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

**antonio.daza@juntadeandalucia.es*

Se ha analizado la evolución de las poblaciones de bacterias y hongos viables del conjunto del suelo y las bacterias de la rizosfera y rizoplana de cinco patrones de frutales de hueso plantados en dos parcelas experimentales ubicadas en la finca experimental del IFAPA Centro Las Torres-Tomejil" en Sevilla (España) que están sometidas a un manejo agrícola diferenciado, ecológico y convencional. Las muestras de suelo se tomaron a dos profundidades diferentes (0-20 y 20-40 cm), durante tres años consecutivos, y con una periodicidad de 3-4 meses. La microbiota bacteriana presente en la rizosfera y la rizoplana se analizó al final del periodo vegetativo.

Las poblaciones de bacterias y hongos totales del suelo estuvieron claramente influenciadas por el tipo de manejo, presentando un valor significativamente mayor en el tratamiento ecológico. La evolución de ambas poblaciones durante el ensayo fue estacional a lo largo de cada año, en ambos manejos y a las dos profundidades.

Las poblaciones de bacterias asociadas a la raíz de cada patrón, tanto en rizosfera como en rizoplana, no mostraron diferencias significativas debidas al tipo de manejo, sugiriendo la existencia de un efecto rizosférico capaz de amortiguar las variaciones debidas al manejo que existen entre las fracciones no rizosféricas de ambos suelos.

Soil microbiota evolution in agronomical soils managed following the organic or conventional practices and annulment of the management influence by the "rhizosphere effect". We analyzed total cultivable fungi and bacteria in the bulk soil and also the rhizosphere and rhizoplane bacteria from five stone fruit rootstocks planted in two experimental plots located at the IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil" in Seville, Spain. One plot was managed following an organic and the other a conventional system. Samples were taken from two soil depths (0-20 and 20-40 cm), along three years and 3-4 times per year. Rhizosphere and rhizoplane bacteria from rootstocks were taken in autumn.

Total culturable bacteria and fungi were statistically higher in the organic treatment and data showed a climatic seasonal influence in both treatments and also at the two soil depths.

The soil management treatment had not effect on the rhizosphere and rhizoplane bacteria, suggesting the existence of a "rhizosphere effect" able to overrule the influence of soil management system observed in the bulk soil microbiota.

SII-13

Robinia pseudoacacia* y *Mesorhizobium*: tal para cual*Gómez-Silván, M.C.^{1*}, Callaway, R.², Rodelas, B.¹, González-López J.¹, y Bedmar, E.J.^{3*}**

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada; ²Plant Ecology Laboratory, The University of Montana, USA; ³Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. *cintagomez@ugr.es, ejbedmar@eez.csic.es

La diversidad genética de 77 aislados obtenidos a partir de los nódulos de las raíces de *Robinia pseudoacacia* cultivadas en suelos procedentes de diversas localizaciones en Europa y USA se ha analizado mediante ensayos REP (Repetitive Extragenic Palindromic fingerprinting) y secuenciación del gen 16S rRNA. Los aislados se distribuyeron en 25 grupos, y el gen 16S rRNA de un aislado representante de cada grupo se secuenció casi en su totalidad. El análisis de las secuencias demostró que los aislados estaban relacionados con rizobios de los géneros *Mesorhizobium* (68%) y *Bradyrhizobium* (32%) de las α -Proteobacteria. La construcción de un árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA indicó que los aislados mostraron diversos grados de homología con las secuencias correspondientes de *M. amorphae*, *M. ciceri*, *M. septentrionale*, *M. loti* y *M. huakuii*. Del resto de los aislados, uno se agrupó con *Bradyrhizobium japonicum* y el otro con *B. lupini*. La identidad de la secuencia de cada uno de los aislados con las de las especies tipo de *Mesorhizobium* y de *Bradyrhizobium* depositadas en GenBank fueron en muchos casos inferiores al 99%, lo que sugiere que los aislados de *Robinia pseudoacacia* pudieran pertenecer a especies no descritas hasta la fecha.

***Robinia pseudoacacia* and *Mesorhizobium*: they are two of a kind.** The genetic diversity of 77 endophytic bacterial strains isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia* grown in soils from different locations in Europe and USA was analysed by Repetitive Extragenic Palindromic (REP) fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. The isolates were distributed into 25 REP groups, and a representative strain from each group was subjected to nearly complete 16S rRNA gene sequencing. Analysis of these sequences showed that the isolates were mainly related to species of the genera *Mesorhizobium* (68%) and *Bradyrhizobium* (32%) from α -Proteobacteria. A 16S rRNA-based phylogenetic tree showed that isolates clustered with *M. amorphae*, *M. ciceri*, *M. septentrionale*, *M. loti* and *M. huakuii*. One of the remaining isolates grouped with *Bradyrhizobium japonicum*, and the other with *B. lupini*. For many of the isolates, the identity of its sequence compared with those of the *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* type species in the GenBank was lower than 99%, which suggests that isolates from *Robinia pseudoacacia* could belong to hitherto undescribed bacterial species.

Este trabajo se ha subvencionado con fondos del Proyecto de Investigación CGL2006-06870/BOSS del Ministerio de Educación y Ciencia. También se agradece la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación BIO-275.

SII-14

Análise filogenética dos genes simbióticos suporta a transferência lateral de genes no género *Mesorhizobium*.**Laranjo, M.^{1*}, Alexandre, A.¹, Rivas, R.², Velázquez, E.², Young, J.P.W.³, e Oliveira, S.¹**

¹ ICAM (Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas), Universidade de Évora, Portugal, ² Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Spain, ³ Department of Biology, University of York, UK. *mlaranjo@uevora.pt

O grão-de-bico tem sido considerado um hospedeiro restritivo à nodulação. No entanto, estudos recentes mostram que várias espécies de *Mesorhizobium* podem nodular grão-de-bico eficientemente (1,2). Com o objectivo de investigar as relações evolutivas entre estas diferentes espécies capazes de nodular o mesmo hospedeiro, analisámos 21 isolados Portugueses de rizóbio de grão-de-bico. Os genes simbióticos *nifH* e *nodC* foram sequenciados e usados para análise filogenética. A eficiência simbiótica foi determinada com o objectivo de avaliar a sua relação com os genes simbióticos. A comparação da filogenia baseada no 16S rDNA com as filogenias baseadas nos genes simbióticos sugere a transferência lateral de genes simbióticos entre diferentes espécies. O grão-de-bico é confirmado como um hospedeiro não promíscuo. Apesar de ser nodulado por muitas espécies de rizóbio diferentes, estas partilham os mesmos genes simbióticos, sugerindo que o grão-de-bico reconhece apenas alguns factores Nod. Estes resultados sugerem que a sequenciação dos genes *nifH* e *nodC* pode ser usada para a detecção rápida de mesorizóbios de grão-de-bico (3).

Phylogenetic analysis of symbiosis genes supports lateral gene transfer within the genus *Mesorhizobium*. Chickpea has been considered a restrictive host for nodulation by rhizobia. However, recent studies have reported that several *Mesorhizobium* species may effectively nodulate chickpea (1,2). With the purpose of investigating the evolutionary relationships between these different species with the ability of nodulating the same host, we analysed 21 Portuguese chickpea rhizobial isolates. Symbiosis genes *nifH* and *nodC* were sequenced and used for phylogenetic studies. Symbiotic effectiveness was determined to evaluate its relationship with symbiosis genes. The comparison of 16S rDNA-based phylogeny with the phylogenies based on symbiosis genes revealed evidence of lateral transfer of symbiosis genes across different species. Chickpea is confirmed as a non-promiscuous host. Although chickpea is nodulated by many different species, they share common symbiosis genes, suggesting recognition of only a few Nod factors by chickpea. Our results suggest that sequencing of *nifH* or *nodC* genes can be used for rapid detection of chickpea mesorhizobia (3).

1. Laranjo *et al.* (2004) FEMS Microbiol. Ecol. 48, 101-107;
2. Rivas *et al.* (2007) Lett. Appl. Microbiol. 44, 412-418;
3. Laranjo *et al.* (submetido).

Financiamento: projecto FCT POCTI/BME/44140/2002, co-financiado pela EU-FEDER; bolsas FCT a M.L. (SFRH/BD/6772/2001, SFRH/BPD/27008/2006) e A.A. (SFRH/BD/18162/2004).

SII-15

Aislamiento y caracterización de bacterias que nodulan especies del género *Lotus* procedentes de suelos salinos de la Sierra de Baza (Granada).

Lorite, M.J.* , Muñoz, S., Soto, M.J., Olivares, J., y Sanjuan, J.

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. *mjlorite@eez.csic.es*

Las leguminosas del género *Lotus* se han propuesto para su utilización en pastizales en suelos deprimidos, por su persistencia y producción en condiciones adversas (salinidad, sequía o metales pesados). El objetivo de este trabajo fue la identificación de bacterias tolerantes a salinidad capaces de establecer simbiosis efectivas con especies de *Lotus*. Se obtuvieron 178 aislados procedentes tanto de nódulos de plantas autóctonas de suelos salinos de la Sierra de Baza (Granada, España) como de nódulos obtenidos con plantas trampa de *L. corniculatus* y *L. tenuis* inoculadas con muestras de suelo de dicha zona. Los aislados se caracterizaron molecularmente mediante técnicas de REP-PCR, 16S rDNA RFLP, secuenciación del 16S rDNA y del gen *atpD*. Se han identificado al menos tres especies distintas: *Mesorhizobium chacoense*, *M. tianshanense* y *Mesorhizobium* sp. El estudio de la secuencia de los genes simbióticos *nifH* y *nodC* mostró que todos los aislados estudiados, a excepción de los no fijadores, presentaban altas identidades con los genes simbióticos de *M. loti*. Del total de los aislados estudiados, aproximadamente un 10% fueron muy tolerantes a sal y presentaron una buena eficiencia fijadora en simbiosis con *L. corniculatus*.

Isolation and characterization of *Lotus*-nodulating bacteria isolated from saline soil of Sierra de Baza (Granada). *Lotus* species are forage legumes with potential as pastures in low fertility and environmentally constrained (salinity, drought and heavy metals) soils due to their high persistence and yield under those conditions. The aim of this work was the identification and characterization of salt-tolerant bacteria able to establish efficient symbiosis with *Lotus* spp. A total of 178 isolates were obtained from field nodules of *Lotus* spp. growing in saline soils from Sierra de Baza (Granada, Spain) or from nodules from *Lotus corniculatus* and *L. glaber* as trap plants inoculated with soil samples. Molecular identification of the isolates was performed by REP-PCR, 16S rDNA RFLP and 16S rDNA and *atpD* sequence analysis, showing the presence of at least 3 different rhizobial species, *Mesorhizobium tianshanense*, *M. chacoense*, and *Mesorhizobium* sp. The *nifH* and *nodC* sequences of all isolates, except those with a Fix⁻ phenotype, showed highest similarity with the corresponding genes of the type rhizobial species *M. loti*. Approximately 10% of the isolates were highly salt-resistant and showed a good symbiotic performance with *L. corniculatus*.

SII-16

Fungos hipógeos associados a arbustos nas regiões interiores de Portugal.

Machado, H.^{1*}, Marques, J.², Gomes, C.³, e Ferreira, M.¹

¹INRB-Unidade de Investigação de Protecção de Plantas, Quinta do Marquês 2780-159 Oeiras, Portugal ²AMBI, Associação Micológica da Beira Interior, Castelo Branco

³Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo, Évora.

*helenamachado@efn.com.pt

Nas regiões interiores de Portugal a colheita de cogumelos hipógeos é uma actividade tradicional apesar do desconhecimento das espécies presentes e do seu papel na manutenção dos ecossistemas de regiões secas. Áreas com produção natural foram observadas de 2004 a 2007, durante a Primavera, de forma a identificar espécies que estabelecessem simbiose com arbustos da família *Cistaceae*. Os espécimes foram secos e conservados em herbário. Na região de Castelo Branco foram identificadas as espécies *Terfezia arenaria*, *Terfezia leptoderma*, *Tuber asa*, *Choiromyces gangliformis* e *Tuber oligospermum*. No Alentejo foram detectadas *Terfezia arenaria*, *Terfezia leptoderma*, *Tuber asa* e *Choiromyces gangliformis* enquanto que no Ribatejo apenas estava presente a espécie *Terfezia arenaria*.

A associação micorrízica de *T. arenaria* com a herbácea anual *Xolantha guttata* foi ainda estudada tendo sido observadas ectomicorrizas típicas e algumas ectomicorrizas sem manto. A fertilidade, o pH e o cálcio activo do solo em áreas com produção natural foram analisados com o objectivo de criar bases para o futuro estabelecimento de novas áreas produtivas.

Este trabalho foi financiado pelo programa AGRO 8.1, projecto 449 "Criação de áreas de trufas, terférias e cogumelos comestíveis nas regiões interiores do País".

Hypogeous fungi associated with shrubs in midland of Portugal. In midland of Portugal picking wild desert truffles during spring is a traditional activity for local people although it still prevail the unawareness of its role in ecosystem as a natural resource of dry areas. Natural productive areas were observed during 2004-2007 springtime for collection of hypogeous fungi suspected to establish symbiosis with shrubs from *Cistaceae*. Specimens were dried and conserved in herbarium. In Castelo Branco region species such *Terfezia arenaria*, *Terfezia leptoderma*, *Tuber asa*, *Choiromyces gangliformis* and *Tuber oligospermum* were identified. In Alentejo region *Terfezia arenaria*, *Terfezia leptoderma*, *Tuber asa* and *Choiromyces gangliformis* were detected and in Ribatejo region only *Terfezia arenaria* was present.

The mycorrhizal association of *T. arenaria* with the annual shrub *Xolantha guttata* was also studied with typical ectomycorrhiza and some ectomycorrhiza without sheath detected. Fertility, pH and active calcium from soil samples collected from natural productive areas were analysed aiming the creation of basis for further establishment of new productive areas.

This work was supported by programme AGRO 8.1, project 449 "Establishment of mushroom and toadstool new areas in midland of Portugal".

SII-17

Catálogo de bacterias PGPRs asociadas a plantas de arroz.

Megias, M.^{1*}, Del Castillo, I.¹, Ojeda, J.¹, Megías, E.¹, Manyani, H.¹, Montes, F.², Ollero, F.J.³, Cubo, M.T.³, Guasch, B.³, Espuny, M.R.³, Bellogín, R.³, Ramos, B.⁴, Lucas, J.A.⁴, y Gutierrez-Mañero, F.J.⁴

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España, ²Federación de Arroceros de Sevilla, España, ³Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España. ⁴Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, España.* megiasg@us.es

Las marismas del Guadalquivir son un lugar idóneo para el cultivo de arroz, dada las características edáficas y las condiciones de humedal que presentan, aunque tienen el inconveniente de la alta salinidad de las aguas del río por su cercanía al mar. Desde hace más de 60 años estas tierras están dedicadas al cultivo exclusivo de arroz y, en los últimos 10 años, se podría decir que ha sido una explotación en monocultivo de la variedad Puntal. Por este motivo es muy interesante realizar un estudio de la diversidad de microorganismos que están asociados a la rizosfera o filosfera de la planta de arroz. Se eligieron cuatro zonas peculiares por sus propiedades en la alta o baja incidencia de la enfermedad fúngica (piriculariosis) y al ser tierras sometidas a riegos con alta o baja concentración de sal en el agua. Los aislamientos se realizaron en medios de cultivo TSA. Se realizó la clasificación de los aislados en grupos parataxonómicos. El número de microorganismos aislados se determinó por diluciones seriadas y recuento en placas de medio TSA tras 24, 48 y 72 horas de incubación a 20 °C. A unos 700 aislados se le determinaron las características PGPRs de interés para los cultivos de arroz: producción de AIA, degradación de ACC, solubilización de fosfatos, producción de quitinasas y presencia de sideróforos. Los aislados fueron clasificados molecularmente por técnicas moleculares y, a los 30 aislados más interesantes, se les secuenció el gen correspondiente al ARN16S. Los resultados indican una distribución de los microorganismos con características PGPRs dirigidas a las zonas de cultivos con mayor estrés biótico y abiótico. AGL2006-13758-C05-01.

Catalog PGPRs bacteria associated with rice plants. Guadalquivir wetland is an ideal place for growing rice, for their special characteristics of soil and salinity of irrigation water for its proximity to the sea. For more than 60 years these lands are dedicated to cultivating rice only. In the last 10 years, it has grown mainly rice variety Puntal. The objective of this work is to study the diversity of microorganisms that are associated with the rhizosphere or phyllosphere of the rice plant. Four areas were chosen for the high or low incidence of fungal disease and the high or low concentration of salt in the irrigation water. The number of isolates was determined by serial dilutions and counting in medium TSA after incubation of 24, 48 and 72 h at 20 °C. A 700 isolates it studied the characteristics PGPRs of interest for crop rice: IAA production, ACC degradation, phosphate solubilization, chitinases production and presence of siderophores. The isolates were characterized by molecular techniques. For the 30 most significant isolates were isolated by PCR DNA 16S gene, and subsequently sequenced. The results indicate a distribution of microorganisms with features PGPRs directed to the areas of most crops biotic and abiotic stress.

SII-18

Estudo de bactérias diazotróficas num solo contaminado por arsénio.

Oliveira, A.*, Pampulha, M.E., Neto, M.M., e Almeida, A.C.

*Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, (UTLisbon), Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. *adnpoliveira@isa.utl.pt*

Elevadas concentrações de arsénio e metais pesados são muitas vezes encontrados nos solos de zonas industrializadas, o que constitui um sério risco ecológico. No presente estudo comparou-se a tolerância ao arsénio da população diazotrófica presente em amostras de solo obtidas numa zona industrializada com conhecidos problemas de poluição, nomeadamente por arsénio, com outras amostras obtidas de um solo vizinho não contaminado. Este grupo de bactérias do solo demonstrou ser muito sensível à contaminação por arsénio, verificando-se um decréscimo da ordem de 80% na população diazotrófica no solo contaminado. Contudo, estudos quantitativos da tolerância destas bactérias a concentrações crescentes de arsénio apontaram para um comportamento idêntico nos dois solos.

Foram obtidos 24 isolamentos de bactérias diazotróficas tolerantes a elevadas concentrações de arsénio, tendo-se procedido, posteriormente, à sua identificação por sequenciação do 16SrDNA.

Study of diazotrophic bacteria in an arsenic contaminated soil. In industrialized areas high concentrations of arsenic and heavy metals have been often found in soils, establishing a serious ecological risk. In this study we compared the arsenic tolerance of asymbiotic diazotrophic population in soil samples obtained from an industrialized area with known pollution problems, namely arsenic, *versus* a nearby non contaminated soil. This group of soil bacteria was very sensitive to arsenic contamination undergoing a decrease in population size of about 80% in the contaminated soil. However quantitative studies about diazotrophic bacterial tolerance to increased arsenic concentrations indicates an identical behaviour for both soils.

We also report the isolation of 24 strains of diazotrophic bacteria tolerant to high concentrations of arsenic; these bacteria were further characterized using 16SrDNA sequence analysis.

SII-19

Diversidad de hongos micorrícicos asociados a especies endémicas y/o amenazadas de Sierra Nevada.

Palenzuela, J.¹, Ruíz-Girela, M.², Barea, J.M.¹, y Azcón-Aguilar, C.^{1*}

¹*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España;* ²*Jardín Botánico Hoya de Pedraza, EGMASA-Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía, Granada, España.*
*conchi.azcon@eez.csic.es

Las micorrizas arbusculares (MA) han jugado un papel clave en la evolución de las plantas sobre la Tierra y en el desarrollo de la estructura y diversidad de los ecosistemas terrestres. La mayoría de las plantas dependen de las micorrizas para sobrevivir, particularmente en ambientes frágiles y sometidos a estreses, como los de Sierra Nevada. Sierra Nevada (SN) constituye un refugio excepcional para la flora y uno de los enclaves con mayores niveles de biodiversidad de Europa. Presenta 66 endemismos exclusivos, algunos de ellos en peligro de extinción. En el contexto de los programas de conservación de flora amenazada de SN se han iniciado estudios que tienen como objetivo (i) determinar el estado micorrícico de especies concretas, todas ellas amenazadas y/o endémicas de SN, (ii) analizar la diversidad de los hongos MA asociados y (iii) establecer un banco de germoplasma de hongos micorrícicos de SN. Los resultados obtenidos muestran que la mayoría (75 %) de las especies seleccionadas son micorrícicas. La densidad de esporas de hongos MA es relativamente baja, excepto en algunas especies. La diversidad de hongos es, en cambio, bastante elevada. Se han detectado unos 40 morfotipos distintos, pertenecientes a siete géneros. Mediante la utilización de criterios morfológicos y moleculares, algunos morfotipos se han caracterizado a nivel de especie. Algunos otros no corresponden a ninguna especie descrita hasta la fecha. Se discutirá el significado de las MA en estos ecosistemas.

Diversity of mycorrhizal fungi associated with endangered and/or endemic plants in Sierra Nevada. Arbuscular mycorrhizas (AM) have played a key role in plant evolution on Earth as well as on the development of the structure and diversity of terrestrial ecosystems. Most plants depend on mycorrhizas to thrive, particularly in fragile and stressed environments, as those in Sierra Nevada (Granada, Spain). Sierra Nevada (SN) constitutes an exceptional refuge for the flora and one of the enclaves with higher biodiversity levels of the European continent. It presents 66 exclusive endemisms, some of them in serious extinction danger. In the context of the research programmes aimed at the conservation of species from the threatened flora of SN, a research project was initiated aimed at (i) determining the mycorrhizal status of selected species, belonging all of them to the endangered and/or endemic flora of SN, (ii) analysing the diversity of the mycorrhizal fungi associated to the selected species and (iii) to establish a mycorrhizal fungi germplasm bank. The results obtained shows that most (75%) of the selected species are mycorrhizal. The AM spore density in the rhizosphere of the selected plants was relatively low, except in certain cases. However, the diversity of AM fungi was quite high. About 40 different morphotypes were detected, belonging to seven genera. By using morphological and molecular criteria some of these isolates have been identified at the species level. Some others do not correspond to any of the species described up to now. The role of AM in these ecosystems will be discussed.

SII-20

Tolerância à salinidade e eficiência de nodulação em *Rhizobium leguminosarum* isolado de solos Portugueses com diferentes condições ambientais.**Pereira, S.¹, Lima, A.¹, Corticeiro, S.¹, Castro, R.¹, e Figueira, E.^{1*}**¹*Centro de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro.*efigueira@ua.pt*

A salinidade constitui um factor de diminuição da produtividade agrícola, e com as previsões de alterações climáticas que estão a ser anunciadas para as próximas décadas, como o aquecimento global ou redução localizada da pluviosidade, a salinidade dos solos pode aumentar e os seus efeitos agravarem-se. O género *Rhizobium* tem grande interesse científico, económico e ecológico devido à capacidade de formar nódulos nas raízes de leguminosas com capacidade para fixar N₂. A salinidade afecta não só o rhizóbio em vida livre mas também diminui consideravelmente o processo de nodulação e a fixação simbiótica de N₂. A selecção de parceiros tolerantes, capazes de tolerar condições salinas, poderá ser de grande utilidade para melhorar a fixação de N₂ e a produtividade de solos afectados pela salinidade. Neste trabalho foi isolado *Rhizobium* de vários locais em Portugal com diferentes condições ambientais, determinada a tolerância salina dos isolados em YEM suplementado com diferentes concentrações de NaCl e avaliada a eficiência de fixação de N₂ dos diferentes isolados em simbiose com *Pisum sativum* sob condições controlo e de salinidade moderada (90 mM NaCl). Os resultados mostram que: a tolerância salina dos isolados reflecte as condições dos seus habitats; na ausência de NaCl a maioria das estirpes tolerantes foi capaz de estabelecer uma simbiose eficiente, mas mais importante algumas destas estirpes evidenciaram capacidade de fixar N₂ sob salinidade. Tendo presentes as alterações climáticas anunciadas, estes resultados poderão ser relevantes, num futuro próximo, como meio de manter as presentes áreas de cultivo de leguminosas sem recurso massivo a adubos azotados de origem química que causam efeitos ambientais graves.

Salt tolerance and nodulation efficiency of *Rhizobium leguminosarum* isolated from Portuguese soils with different environmental conditions. Salinity is a major environmental constraint of crop production, and with the climate changes that are being announced for the next decades, like global warming or local reduction of rainfall, this problem will be amplified, and salinity effects will aggravate. The genus *Rhizobium* is of considerable scientific, economical and ecological interest because of their ability to form nitrogen-fixing nodules on leguminous hosts. Salinity not only affects free-living rhizobia but also considerably restrains the nodulation process and the symbiotic nitrogen fixation. The selection of tolerant partners, which can withstand the negative impact of saline soils, can be of great use to improve nitrogen fixation and productivity in salt-affected soils. In this work *Rhizobium* was isolated from several locations in Portugal with different environmental conditions. *Rhizobium* isolates were screened for their tolerance to salinity as free-living organisms and for their efficiency to fix N₂ under control and salt conditions in symbiosis with a legume. Results show that salt tolerance was a reflex of the conditions experienced in their natural habitats. A few tolerant strains were able to efficiently nodulate *Pisum sativum* plants, in the absence of salt, and more importantly in the presence of moderate levels of sodium chloride (90 mM), which, due to the announced climate changes, could be important in a near future to maintain the present areas of legume cultivation.

SII-21

Estudio de biodiversidad microbiana en suelos de arrozal en las Marismas del Guadalquivir.

Romero-Cuadrado, L.^{1*}, Del Castillo, I.^{1,2}, Ojeda, J.¹, Megías, E.¹, Barcellos, F.³, García-Villaraco, A.⁴, Manyani, H.¹, y Megías, M.¹

*¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Sevilla, España, ² Centro "Las Torres-Tomejil" IFAPA, Sevilla, España, ³ Embrapa Soja, Laboratorio de Biotecnología dos Solos, Londrina, Brasil, ⁴ Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad CEU San Pablo, Madrid, España. *lauraromcua@yahoo.es*

La zona arrocera de las Marismas del Guadalquivir es la región en la que se cultiva arroz con mayores producciones a nivel mundial, alcanzándose las 11.000 Kg/Ha. Debido a su localización colindante con el Parque Nacional de Doñana, las prácticas agrícolas empleadas, tienden a ser cada vez más respetuosas con el medio ambiente, disminuyendo el uso de fertilizantes y pesticidas y desarrollando técnicas que permitan la conservación de los suelos. Es sabido que las comunidades microbiológicas del suelo participan en la movilización de nutrientes poniéndolos a disposición de las plantas. Por tanto, y englobado en un proyecto con empresas andaluzas para la optimización del uso de agroquímicos en esta región, nuestro grupo está realizando en paralelo análisis de comunidades y actividades microbianas relacionadas con el cultivo, tomando muestras obtenidas en distintos puntos de la marisma y pertenecientes a explotaciones agrarias con distintas condiciones ambientales y de fertilización. Para ello, hemos utilizado la técnica PCR-DGGE, que nos permite elaborar un perfil de la diversidad microbiana del suelo de los arrozales. AGL2006-13758-C05-01.

Study of Microbial Biodiversity in paddy soils in the Marshes of the Guadalquivir. The rice area of the Guadalquivir's marshes are region where rice is grown with higher production worldwide, reaching 11,000 kg / Ha. Due to its location adjacent to the Doñana National Park, agricultural practices employed, they tend to become more respectful with the environment, reducing the use of fertilizers and pesticides and developing techniques to the conservation of soils. The soil microbiological communities are involved in the mobilization of nutrients and made them available to plants. In this context, to optimize the use of agrochemicals in this region, we are studying the assimilation of nutrients by the plant. In addition, our group is analyzing microbial communities and activities related cultivation, taking samples collected at various points of the wetlands and farms belonging to different environmental conditions and fertilization. The PCR-DGGE technique has been used in this work, which allows us to develop a profile of the microbial diversity of soil in rice fields.

SII-22

Influencia de los sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS) sobre la biodiversidad microbiana de un suelo agrícola.

Sánchez-Peinado, M.M.¹, Martínez-Toledo, M.V.^{1,2}, González-López, J.^{1,2}, Pozo, C.^{1,2}, y Rodelas, B.^{1,2*}

¹Instituto del Agua, and ²Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España. mrodelas@ugr.es*

El LAS es el surfactante de mayor uso a escala mundial para la fabricación de detergentes y productos de limpieza domésticos, con un consumo estimado en España de 5 g por habitante al día. Su biodegradación es completa en condiciones aeróbicas, y las plantas de tratamiento de agua residual basadas en el sistema de fangos activos eliminan >99% del LAS disponible en el medio acuoso. Sin embargo, hasta un 25% del LAS queda inmovilizado en los lodos de depuradora por adsorción a la materia orgánica, y debido al empleo de estos lodos como fertilizantes agrícolas, una fracción importante de LAS alcanza el suelo. Los estudios de impacto ambiental establecen que el LAS no afecta significativamente a la mayoría de las funciones microbianas del suelo. Sin embargo, son escasos los trabajos específicamente dirigidos a determinar su influencia sobre la composición de las comunidades de bacterias. En este estudio, se emplean microcosmos edáficos, adicionados de dos concentraciones distintas de LAS, con el fin de evaluar su efecto sobre la composición de distintos grupos de bacterias del suelo, mediante técnicas independientes de cultivo (PCR-TGGE).

Influence of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on the microbial diversity of an agricultural soil. LAS is the most used anionic surfactant in household laundry and dishwashing detergents, as well as multipurpose cleaning products. The average consume of LAS per individual in Spain is estimated 5 grams/day. LAS is readily biodegradable under aerobic conditions, and wastewater treatment plants based in the conventional activated sludge technology remove over 99% of LAS from aqueous media. However, an important fraction of LAS (up to 25%) is retained in sewage sludge, due to its sorption to organic matter. The common practice of applying sewage sludge as fertilizers is the main way by which LAS reaches agricultural soil. Environmental risk assesment studies conclude that LAS does not significantly affect most of the microbial functions in soil. Nevertheless, studies specifically aimed to evaluate its influence on the composition of the bacterial communities are scarce. In this study, soil microcosmos were set up and amended with LAS at two different concentrations, and the effect of the surfactant on the composition of relevant bacterial groups in soil was monitored by a cultivation-independent approach (PCR-TGGE).

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia, mediante el Programa Ramón y Cajal (Belén Rodelas) y el Proyecto PPQ2003-07978-C02-02.

SESSÃO III / SESIÓN III

Interacções plantas-microrganismos

Interacciones plantas-microorganismos

CTIII-1

Identificación de factores implicados en la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas*.

Martín, M.*, y Rivilla, R.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

**m.martin@uam.es*

La utilización de diversas técnicas tales como mutagénesis dirigida o al azar, análisis de expresión génica, transcriptómica y técnicas de microscopía para visualizar la rizosfera; ha permitido poder analizar algunos de los mecanismos importantes en una colonización eficaz de la rizosfera por parte de las *Pseudomonas*.

Así, se ha demostrado que los factores implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos, en el mantenimiento de la integridad de la membrana, en la respuesta de adaptación a estrés, en el movimiento y quimiotaxis y la reorganización del genoma son necesarios para el mantenimiento de una colonización competitiva.

El análisis en profundidad de cada uno de estos mecanismos y la colonización permitirá una mejora en las aplicaciones biotecnológicas de las rizobacterias en sistemas integrados planta-microorganismos.

Identification of genes and traits relevant for rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. The use of various techniques such as site-directed or random mutagenesis, gene expression analysis, transcriptomic and microscopy techniques to visualize the rhizosphere; has allowed to discover some important mechanisms implicated in an efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas*.

Thus, it has been shown that the factors involved in the metabolism of aromatic compounds, in maintaining the integrity of the membrane, in the adaptive response to stress, in motility and quimiotaxis and reorganization of the genome are required for the maintenance of competitive rhizosphere colonization.

The in-depth analysis of each of these mechanisms and colonization will improve the biotechnological applications of plant associated rhizobacteria.

CTIII-2

Papel simbiótico de los polisacáridos superficiales rizobianos.

Vinardell, J.M.^{1*}, Hidalgo, A.¹, Margaret, I.¹, Crespo, J.C.¹, Buendía, A.¹, Rodríguez-Navarro, D.N.², Rodríguez, M.A.³, Ollero, F.J.¹, y Ruiz-Sainz, J.E.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España. ²IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Junta de Andalucía, Sevilla, España.

³Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España. *jvinar@us.es

Además de los factores de nodulación y de las proteínas Nops, diversos polisacáridos superficiales rizobianos (**PSR**) participan en la interacción simbiótica que los rizobios establecen con las leguminosas: los glucanos cíclicos (**GC**, localizados principalmente en el espacio periplásmico), los lipopolisacáridos (**LPS**, constituyentes de la hemimembrana externa de la membrana externa), los polisacáridos capsulares tipo antígeno K (**KPS**, anclados en la membrana externa) y los exopolisacáridos (**EPS**, son los PSR más externos y presentan una unión débil o inexistente con la bacteria). El papel exacto de los PSR en el proceso de nodulación aún no ha sido claramente dilucidado. Los mutantes rizobianos afectados en la producción de algún PSR suelen ser capaces de inducir las respuestas tempranas en la planta, incluyendo el inicio de la organogénesis nodular, lo que indica que los polisacáridos superficiales bacterianos desempeñan su papel en etapas más avanzadas del proceso de nodulación tales como la infección o la invasión de las células vegetales del nódulo. La información existente apunta a dos funciones principales de los PSR en la simbiosis: proteger a la bacteria de las respuestas defensivas de la planta y/o actuar como señales durante el proceso de nodulación. En esta comunicación se detallará el conocimiento actual acerca del papel simbiótico de los PSR de *Sinorhizobium fredii*.

Symbiotic role of rhizobial surface polysaccharides. In rhizobia, in addition to Nod factors and Nops proteins, diverse rhizobial surface polysaccharides (**RSP**) participate in the symbiotic interaction of these bacteria with legumes: cyclic glucans (**CG**, mainly located in the periplasmic space), lipopolysaccharides (**LPS**, constituting the outer leaflet of the outer membrane), K-antigen capsular polysaccharides (**KPS**, anchored to the outer membrane), and exopolysaccharides (**EPS**, external polysaccharides with little or no association to the cell). The exact role of bacterial RSP in the nodulation process remains to be well understood. Generally, rhizobial mutants affected in the production of a particular RSP are able to elicit the early responses of the host plant such as root hair curling and nodule organogenesis initiation. Because of this, RSP are thought to be involved in later steps of the nodulation process, such as root infection or invasion of the host plant cells. The existing data point out two main roles for RSP in the nodulation process: they could protect the bacteria against the host defence responses and/or might act as signal molecules necessary to carry out the infection and invasion of host tissues. The current knowledge about the symbiotic role of *Sinorhizobium fredii* RSP will be presented.

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-02)

SIII-1

¿Es necesaria la capacidad de formar *biofilms* para la colonización de la rizosfera?

Barahona, E.*, Navazo, A., Martínez-Granero, F., Martín, M., y Rivilla, R.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.*emma.barahona@uam.es

La movilidad es uno de los caracteres más importantes para la colonización de la rizosfera por *P. fluorescens*, siendo los mutantes con movilidad restringida muy malos competidores. Además la rizosfera selecciona variantes fenotípicos hipermóviles más competitivos que la estirpe original.

Muchos autores definen a la ocupación por parte de las bacterias del rizoplaneo como un *biofilm*, definido como agrupación de bacterias altamente estructurada y sostenida por una matriz producida por la propia bacteria. ¿Son *biofilms* en sentido estricto las agrupaciones de bacterias en la rizosfera? Trabajos recientes contraponen un estilo de vida planctónico caracterizado por la movilidad con un estilo de vida sésil en forma de *biofilm*, estando regulada la transición entre ambos estados por los niveles de diGMP cíclico, a su vez controlados por las actividades diguanilato ciclasa (proteínas con dominios GGDEF) y fosfodiesterasa (proteínas con dominios EAL). Mutantes incapaces de formar *biofilms*, presentan niveles bajos de diGMPc y mayor movilidad que la estirpe silvestre. Hemos observado que tanto mutantes hipermóviles como variantes de fase hipermóviles de *P. fluorescens* F113 tienen muy reducida su capacidad formadora de biopelículas. Sin embargo, desplazan a la estirpe silvestre en análisis de competitividad. Por tanto, pensamos que la colonización competitiva de la rizosfera no depende de la capacidad formadora de *biofilms*.

Is biofilm formation a requirement for rhizosphere colonization? Motility is one of the most important traits for rhizosphere colonization by *P. fluorescens*, being mutants with reduced motility very poor competitors. Furthermore, rhizosphere selects hypermotile phenotypic variants which displace the wt strain in competitive analysis.

On the other hand, the aggregation of bacteria on the root surface is usually termed biofilm. A biofilm is defined as an aggregation of bacteria highly organized that is supported by a matrix produced by the bacteria. Are biofilm *sensu stricto* the aggregations of bacteria on the rhizosphere during colonization? Recent reports oppose a planktonic lifestyle characterized by motility to a sessile lifestyle in the form of biofilm. The transition between both lifestyles is regulated by the levels of cyclic di-guanilate (di-GMPc), and these levels are controlled by diguanilate cyclases (proteins with a GGDEF domain) and phosphodiesterases (proteins with EAL domain). In this sense, mutants unable to form biofilms show reduced levels of diGMPc and increased motility. To test the hypothesis of biofilm formation being necessary for rhizosphere colonization, we have used the hypermotile mutants and hypermotile variants and they were severely impaired in biofilm formation, however they displace the wt strain in competitive analysis. Therefore, biofilm formation is not necessary for rhizosphere colonization.

SIII-2

Caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizosfera de *Lotus tenuis*.

Castagno, L.N.¹, Estrella, M.J.¹, Grassano, A.², y Ruiz, O.A.^{1*}

¹IIB-INTECH (CONICET-UNSAM). Chascomús, Bs. As., Argentina, ²UNLaPampa, Argentina.
*ruiz@intech.gov.ar

En el presente trabajo se realizaron aislamientos de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de muestras de suelo de la rizosfera de *Lotus tenuis* (Latitud 35° 30' S. Longitud 58° 30' O). Para la selección se utilizó el medio de crecimiento NBRIP (Nautiyal C. S.; 1999).

Se utilizó la técnica BOX-PCR para identificar los aislamientos y seleccionar los no redundantes. La capacidad de los mismos de liberar fosfato se evaluó a través de su cinética de solubilización y se determinó la evolución del pH del medio con el objeto de establecer una correlación entre estos dos parámetros. Posteriormente se seleccionaron dos aislamientos que mostraron una mayor actividad y se realizaron ensayos de inoculación *in vitro* de *L. tenuis* en medio Evans semisólido (Evans C.G.T.; 1970). Para simular las condiciones de estrés de los suelos se reemplazó la fuente de fosfato por $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y se varió la relación P/N, así como el pH del medio.

Las variables analizadas en los ensayos *in vitro* permitieron observar diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de *L. tenuis* inoculado con bacterias solubilizadoras con respecto a plantas no inoculadas. Esto permitió inferir que las bacterias estudiadas podrían contribuir a mejorar el desarrollo de *L. tenuis* en suelos con déficits de fósforo, particularmente en etapas críticas como la implantación.

Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from rizosphere of *Lotus tenuis*. In this study, phosphate solubilizing bacteria were isolated from soil samples of the rizosphere of *Lotus tenuis* (Latitude 35° 30' S. Longitude 58° 30' W). NBRIP culture medium was used for the selection (Nautiyal C. S.; 1999).

The molecular identification of the isolates was performed by the BOX-PCR technique. In order to characterize them and establish a correlation between parameters, kinetic of phosphate solubilization and pH evolution were evaluated.

Two isolates that showed the highest phosphate solubilization activity were selected and inoculated onto *L. tenuis* plants *in vitro* in semisolid Evans medium (Evans C.G.T.; 1970). Soil stress conditions were simulated replacing phosphate source with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and varying P/N rate, as well as pH.

Inoculation with phosphate solubilizing bacteria significantly enhanced growth of *L. tenuis* plants, as compared with non-inoculated controls. This suggests that these bacteria would improve *L. tenuis* development in critical stages like implantation.

SIII-3

Identificación de metabolitos exudados por raíces de plantas mediante GC-MS y HPLC-MS/MS.

Contreras Sánchez-Matamoros, R.^{1*}, Rodríguez Carvajal, M.A.¹, Manyani H.², Megías, M.², y Gil Serrano, A.M.¹

¹*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla..*

²*Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. *rociocsm@gmail.com*

La rizodeposición de las plantas es la principal fuente de carbono y energía en la rizosfera y es responsable del rápido movimiento, alta diversidad y abundancia de microorganismos en la rizosfera. La rizodeposición se compone de exudados solubles en agua (p.ej. azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos), secreciones (polisacáridos, proteínas), mucílagos (compuestos orgánicos más complejos originados en las células de las raíces o procedentes de la degradación bacteriana), mucigel (capa gelatinosa compuesta por una mezcla de mucílagos y partículas del suelo) y lisatos (p. ej. restos de paredes celulares).

En este trabajo se propone un método para la determinación cualitativa de las rizodeposiciones procedentes de los exudados de raíces de plantas (judía y arroz). En dicho análisis se determina la composición de ácidos orgánicos, aminoácidos, monosacáridos, flavonoides y terpenos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

Identification of metabolites in plant root exudates by GC-MS and HPLC-MS/MS. Rhizodeposition of plants is the main carbon and energy source in the rhizosphere and is responsible for fast turnover, high diversity, and abundance of microorganisms in the rhizosphere. Rhizodeposition is classified into water-soluble exudates (e.g. sugars, amino acids, organic acids), secretions (polymeric carbohydrates, proteins), plant mucilages (more complex organic compounds originated in root cells or from bacterial degradation), mucigel (a gelatinous layer composed of mucilages and soil particles intermixed), and lysates (e.g. remains of cell walls).

In this work we describe a method for the qualitative determination of rhizodeposition arising from roots exudates of plants. In this analysis, the composition of organic acids, amino acids, monosaccharides, flavonoids and terpenes is determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS).

SIII-4

Papel simbiótico de los glucanos cíclicos de *Sinorhizobium fredii* HH103.

Crespo-Rivas, J.C.^{1*}, Hidalgo, A.¹, Margaret, I.¹, Buendía-Clavería, A.¹, Ollero, F.J.¹, Gil-Serrano, A. M.², Ruiz-Sainz, J.E.¹, Lloret, J.³, y Vinardell, J.M.¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla. ²Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, Sevilla. ³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. *juacreriv@alum.us.es

Los glucanos cíclicos (GC) son uno de los principales componentes de la superficie rizobiana. En *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, su biosíntesis depende de NdvB, proteína que interviene en los procesos de iniciación, elongación y cierre de estas moléculas cíclicas. En este trabajo se ha aislado el gen *ndvB* de *Sinorhizobium fredii* HH103, cuya mutación produce la ausencia de GC en esta estirpe. Los resultados obtenidos indican que los GC de esta bacteria son esenciales en sus interacciones con leguminosas tanto formadoras de nódulos determinados (soja y *Vigna unguiculata*) como formadoras de nódulos indeterminados (*Glycyrrhiza uralensis*). En todos los casos los mutantes sólo indujeron la formación de pseudonódulos, con excepción de *Vigna* donde no se observó ninguna respuesta macroscópica a la inoculación. Esta ausencia de respuestas tempranas sugería que los mutantes *ndvB* podrían estar afectados en los primeros pasos del diálogo molecular con esta leguminosa. Sin embargo, los experimentos realizados muestran que los mutantes *ndvB* de HH103 son capaces de inducir sus genes de nodulación en respuesta a flavonoides y que producen y secretan factores de nodulación. Por otro lado, los mutantes *ndvB* muestran una mayor producción de exopolisacárido (EPS) que la estirpe silvestre, que se correlaciona con una mayor expresión del gen *exoA*. Este resultado sugiere una interconexión entre las vías de síntesis del EPS y de los GC.

Symbiotic role of *Sinorhizobium fredii* HH103 cyclic glucans. Cyclic glucans (CG) are main components of the rhizobial surface. In *Sinorhizobium* and *Rhizobium*, the different steps of CG biosynthesis (initiation, elongation and cyclation) rely on the activity of NdvB. In this work we present the characterisation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *ndvB* gene, whose inactivation leads to the lack of CG. Symbiotic studies showed that HH103 CG are absolutely required for nodulation on the different host plants tested (including determinate-, such as soybean and *Vigna unguiculata*, and indeterminate nodule forming, such as *Glycyrrhiza uralensis*, legumes). Following inoculation with the *ndvB* mutants, soybean and *G. uralensis* plants formed ineffective pseudonodules, whereas *Vigna unguiculata* (cowpea) roots did not develop macroscopic nodule (or pseudonodule) structures. The absence of visible root outgrowths in cowpea plants inoculated with the *ndvB* mutants prompted us to investigate whether they were affected in the initial signal interchange with the host plant. Our results show that the *nod* genes of *ndvB* mutants are induced by flavonoids or cowpea root exudates and that these mutants produce and secrete Nod factors. In addition, the HH103 *ndvB* mutants produced more exopolysaccharide (EPS) than the parental strain (which is in agreement with its higher expression of the *exoA* gene) suggesting that the EPS and CG biosynthetical pathways are somehow interconnected.

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-02)

SIII-5

Estudio de la aplicación de consorcios bacterianos para el control de estrés salino en plantas de arroz.

Del Castillo, I.^{1,2*}, Ojeda, J.², Ollero, J.³, Aguilar, M.¹, y Megías, M.²

¹Centro "Las Torres-Tomejil" IFAPA, Sevilla, España, ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España, ³Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España.

Las altas concentraciones de sal en los suelos conllevan grandes reducciones de la producción en una amplia variedad de cultivos en todo el mundo. Existen más de 770.000 km² a nivel mundial de tierras afectadas por la salinización, siendo el 20% zonas de cultivo de regadío. El arroz es uno de los cereales primarios para la alimentación de gran parte de la población global y, debido a los lugares donde habitualmente se localizan los campos para su cultivo (marismas y deltas de ríos), se encuentran en muchos casos altamente perjudicados por la alta salinidad del agua de riego y de los suelos. El estrés salino afecta a diversos aspectos del metabolismo de las plantas y, como resultado, reduce su crecimiento y producción.

Algunos microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPRs) facilitan el desarrollo de las plantas por medio de múltiples mecanismos; una de estas acciones es la protección de los organismos vegetales frente a las consecuencias perjudiciales de algunos estreses ambientales como la sequía, la salinidad y los fitopatógenos. En este estudio ensayamos sobre plantas de arroz sometidas a estrés salino el efecto osmoprotector de un solo microorganismo (*Chryseobacterium balustinum*, Aur9) cuya capacidad de protección para las plantas en condiciones salinas ha sido demostrada en otros cultivos, frente a la utilización de una asociación de microorganismos tolerantes a altas concentraciones salinas y con capacidades PGPR (Consortio de la Sal) partiendo de la premisa, ya demostrada por otros autores, de que la acción conjunta de varias bacterias puede tener efectos sinérgicos que promuevan de forma más eficiente el crecimiento vegetal. AGL2006-13758-C05-01.

Study of application of bacterial consortia for salt stress control in rice. High salinity in soils involves large reductions in the production of a wide variety of cultures around the world. There are more than 770,000 km² global land affected by salinity, with 20% irrigated cultivation areas. The salt stress affects various aspects of the metabolism of plants, reducing their growth and yield. Rice is one of the primary grains to feed much of the global population, and because of the places where paddy are usually localized, they are in many cases highly damaged by high salinity of irrigation water and soil.

Some plant growth promoter rhizobacteria (PGPRs) facilitate the development of the plants through multiple mechanisms; one of these actions is to protect plants against the harmful consequences of some environmental stresses such as drought, salinity and phytopathogens. In this study we test the effect of a single osmoprotector microorganism (*Chryseobacterium balustinum*, Aur9) in rice plants treated with salt stress. We also compare the effect of an association of tolerant microorganisms at high salt concentrations and capabilities PGPR (Salt Consortium) on the premise, as demonstrated by other authors, that joint action of several bacteria may have synergistic effects that promote a more efficient plant growth.

SIII-6

Plasticidad fenotípica en la respuesta a estrés salino por parte de *Lotus glaber* Mill.: el papel de sus simbiontes micorrízico-arbusculares y rizobianos.

Echeverría, L.¹, Scambato, A.², Sannazzaro A.¹, Maiale, S.¹, Ruiz, O.¹, y Menéndez, A.^{1,2*}

¹Unidad de Biotecnología 3, IIB-IIINTECH/UNSAM-CONICET, ²Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.* anamenendez@intech.gov.ar

Nuestra hipótesis es que las raíces de *Lotus glaber* (una especie glicofita, altamente tolerante a suelos salinos-alcálinos) presentan un fenotipo que responde plásticamente a la salinidad del suelo, la cual puede estar influenciada por micorrizas arbusculares y rizobacterias. Se trataron plantas no inoculadas y las plantas colonizadas por *Glomus intraradices* o *Mesorhizobium loti* con solución nutritiva que contenía ya sea 150 o 0 mM de NaCl. Al finalizar el tratamiento salino, se midieron parámetros relacionados con el crecimiento general de la planta y con la arquitectura de sus raíces (morfología y topología). La morfología de las raíces en las plantas sensibles resultó más afectada por el tratamiento salino, mientras que la presencia del hongo revirtió el efecto de la sal. La topología de la raíz en cambio, no sufrió modificaciones debidas a la salinidad o a la interacción con el hongo micorrízico, en tanto *M. loti* incrementó el índice topológico. No obstante la ausencia de resultados que vinculen los índices de topología (TTs) observados con las variaciones en el crecimiento de la planta, es posible predecir variaciones en la adaptación entre plantas con diferentes TTs.

Phenotypic plasticity with respect to salt stress response by *Lotus glaber* Mill.: the role of its AM-fungal and rhizobial symbionts. Our hypothesis is that *Lotus glaber* (a glycophytic species, highly tolerant to saline-alkaline soils) displays a plastic root phenotypic response to soil salinity that may be influenced by mycorrhizal and rhizobial microorganisms. Uninoculated plants and plants colonized by *Glomus intraradices* or *Mesorhizobium loti* were exposed to either 150 or 0 mM NaCl. General plant growth and root architectural parameters (morphology and topology) were measured and phenotypic plasticity determined at the end of the salt treatment period. Root morphology of sensitive plants was greatly affected by salinity, whereas the fungus counteracted salinity effects. Root topology was not affected by salinity or by the interaction with AM fungus and it was increased by *M. loti*. Notwithstanding the absence of results linking observed topological indexes (TTs) and variations in plant growth, it is possible to predict a dissimilar adaptation of plants with different TTs.

SIII-7

Mecanismos implicados en el transporte de nitrógeno en micorrizas arbusculares.

Ferrol, N.*, Pérez-Tienda, J., y Azcón-Aguilar, C.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. *nuria.ferrol@eez.csic.es

El principal beneficio que la formación de micorrizas arbusculares (MA) proporciona a la planta es una mejora de la nutrición fosforada; sin embargo, en determinadas condiciones también contribuyen a la nutrición nitrogenada. Estudios de marcaje isotópico han puesto de manifiesto la capacidad de los hongos formadores de MA (hongos MA) de absorber y transferir a la planta tanto nitrógeno inorgánico (NO_3^- y NH_4^+) como orgánico (aminoácidos), y que la forma molecular en la que el nitrógeno es transferido desde el hongo a la planta hospedadora es el NH_4^+ . El objetivo del presente trabajo consistió en analizar los mecanismos implicados en la absorción y transferencia de nitrógeno en MA mediante el estudio de transportadores de NH_4^+ de la planta y del hongo. Como modelo experimental se utilizó la simbiosis establecida entre plantas de arroz y el hongo MA *Glomus intraradices*. En *G. intraradices* hemos identificado y caracterizado dos genes, *GintAMT1* y *GintAMT2*, que codifican transportadores de NH_4^+ pertenecientes a la familia de transportadores AMT/MEP. El análisis de la expresión génica de los miembros de la familia AMT/MEP de arroz mostró que el desarrollo de la simbiosis incrementaba la expresión de los transportadores de NH_4^+ *AMT1;3* y *AMT2;2* e inducía la expresión *de novo* del transportador *AMT2;3*. En esta presentación se discutirá la posible implicación en la nutrición nitrogenada de la planta de los transportadores del hongo y de planta estudiados.

Mechanisms of nitrogen transport in arbuscular mycorrhiza. The main benefit of the arbuscular mycorrhizal (AM) association is an improved phosphorus nutrition of the mycorrhizal plant, but there is increasing evidence that AM fungi also contribute to the N-budget of the plant. Isotope labelling experiments have shown that AM fungi directly take up both inorganic (NO_3^- and NH_4^+) and organic (amino acids) nitrogen from the soil solution, and that this nitrogen is transferred to the host plant as NH_4^+ . The aim of this work was to analyze the mechanisms of nitrogen uptake and transfer in the AM symbiosis by studying plant and fungal NH_4^+ transporters. As experimental model we used the symbiosis established between rice plants and the AM fungus *Glomus intraradices*. We have identified and characterized two *G. intraradices* genes, *GintAMT1* and *GintAMT2*, encoding two NH_4^+ transporters of the MEP/AMT protein family. Gene expression studies of the rice AMT/MEP members revealed that development of the symbiosis induced up-regulation of the NH_4^+ transporters *AMT1;3* and *AMT2;2* and the *de novo* expression of *AMT2;3*. The implication of the studied plant and fungal transporters in the nitrogen nutrition of the host plant will be discussed.

SIII-8

Proteccion frente a estrés salino por un consorcio bacteriano en plantas de arroz.

García Cristóbal, J., Lucas García, J.A., Ramos, B., Barriuso, J., y Gutiérrez Mañero, F.J.*

*Departamento de CC. Ambientales y RR. Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU. 28668 Boadilla del Monte. Madrid. *jgutierrez.fcex@ceu.es*

El cultivo de arroz tiene una gran importancia mundial; sólo en España la producción en 2007 alcanzó las 692.820 TM. El ataque de fitopatógenos y la salinización de los ecosistemas en los que se desarrollan estas plantas son los dos problemas principales a los que se enfrenta este cultivo. La elicitación del sistema defensivo de la planta mediante la utilización de bacterias no patógenas denominadas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), puede ser una estrategia biotecnológica encaminada a solucionar o minimizar estos problemas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de un consorcio formado por 5 PGPR, para estimular el crecimiento e inducir el metabolismo secundario de plantas de arroz, evaluando fotosíntesis, protección frente a estrés salino y su actividad peroxidasa, por su relación con el estrés.

Se transplantaron semillas de arroz (var Puntal) pre-germinadas a cultivo hidropónico (Hoagland No.2, 50%). A los 7 días se inocularon con el consorcio bacteriano (10^8 ufc/mL de cada cepa). A los 4 días, se aplicó el estrés salino (NaCl 60mM). Se midió la actividad peroxidasa dos días después de la inoculación y dos días después del estrés salino.

Los resultados obtenidos, tanto de actividad enzimática como medidas biométricas y fisiológicas indican una inducción del metabolismo secundario relacionado con un efecto protector contra el estrés salino por parte del consorcio.

Protection against salt stress in rice plants by a bacterial consortium. Rice growth is relevant worldwide reaching 692.820 TM in 2007 only in Spain. Pathogen attack and salinization of rice ecosystems are the main problems of this crop. Triggering plant defences using non-pathogenic bacteria such as PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) appears as a challenging biotechnological tool to solve the problems of this crop.

The aim of this study was to evaluate the effect of a bacterial consortium consisting on 5 PGPR on growth and secondary metabolism of rice, evaluating photosynthetic rates, protection against salt stress and peroxidase activity, given its relation with stress situations.

Pre-germinated rice seeds were grown in hydroponic culture with Hoagland solution (No2, 50 %). Seven days after, a group of plants were inoculated with the consortium (10^8 cfu/mL each strain). Two days after, plants were challenged with saline stress (NaCl 60mM). Peroxidase activity was measured two days after inoculation and 2 days after stress challenge.

Peroxidase activity and biometric and physiological results obtained shown that consortium is able to induce the secondary metabolism related with protection effect against salt stress.

SIII-9

Análisis de moléculas implicadas en la percepción de quorum.

González Barroso, S.^{1*}, Guasch Vidal, B.², Pérez-Montaña, F.², Bellogín Izquierdo, R.A.², Rodríguez-Carvajal M.A.¹, Gil Serrano, A.M.¹, y Espuny Gómez, M.R.²

¹Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla.

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

*sergonzbar@hotmail.com

Numerosas especies de bacterias Gram negativas producen lactonas de homoserina N-aciladas (AHL) que controlan funciones de comportamiento o funciones fisiológicas muy diversas, entre las que se encuentran la bioluminiscencia, transferencia de plásmidos por conjugación, producción de antibióticos y bacteriocinas, expresión de factores de virulencia, formación de biofilms, motilidad, producción de polisacáridos, participación en la fijación biológica de nitrógeno, etc (González y Marketon, 2003).

En este trabajo se expone el método usado en el análisis de las AHL aisladas de diferentes estirpes bacterianas fijadoras de nitrógeno de la familia *Rhizobiaceae*, basado en la cromatografía líquida de alta resolución y la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) (Gould y col., 2006), y paralelamente, mediante diferentes ensayos biológicos: detección de AHL como autoinductores, detección en placas de microtítulo (previo fraccionamiento de las muestras por HPLC) y detección en cromatografía de capa fina. Se han utilizado dos estirpes bacterianas como indicadores para la presencia de AHL: *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (Piper y col., 1993) y *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan y col., 1997).

Se ha aplicado al estudio de las estructuras de las AHL producidas por las bacterias *Rhizobium tropici* CIAT899, *Rhizobium etli* ISP42 y *Sinorhizobium fredii* SMH12.

Analysis of molecules involved in quorum sensing. Many species of Gram-negative bacteria produce N-acylated homoserine lactones (AHL) that control very diverse behavior or physiological functions, such as bioluminescence, transfer of plasmids by conjugation, antibiotics and bacteriocins production, virulence factors expression, formation of biofilms, motility, production of polysaccharides, participation in the nitrogen biological fixation, etc. (González y Marketon, 2003).

In this work, the exposed method is used in the analysis of isolated AHL of different nitrogen fixing bacteria of the family *Rhizobiaceae*, based on high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) (Gould y col., 2006), and parallelly, by means of different biological essays: AHL's detection as autoinducers, detection in plates of microtiter (previous fraction of the samples for HPLC) and detection in thin layer chromatography. Two bacteria have been used as indicators for AHL's presence: *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (Piper y col., 1993) y *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan y col., 1997).

The method is applied to the study of the structures of the AHL produced by the bacteria *Rhizobium tropici* CIAT899, *Rhizobium etli* ISP42 y *Sinorhizobium fredii* SMH12.

SIII-10

Nodulación de *Lotus* por cepas de *Sinorhizobium meliloti* que portan un nuevo grupo de genes simbióticos.

León-Barrios, M.^{1*}, Lorite, M.J.², Donate-Correa, J.¹, y Sanjuán, J.²

¹Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna.

²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. *mileonba@ull.es

Entre los rizobios que nodulan algunas especies de *Lotus* endémicos se Canarias, se encontró que un grupo de diez aislados pertenecían al género *Sinorhizobium*, de acuerdo a sus secuencias 16S rDNA y *aptD*. Ocho de estos aislados fueron clasificados en la especie *S. meliloti*, una especie no relacionada con *Lotus* hasta ahora. El análisis de las secuencias de los genes simbióticos *nodC* y *nifH* mostró que estas cepas de *S. meliloti* portan un nuevo grupo de genes simbióticos. Así, el análisis filogenético basado en las secuencias de estos genes simbióticos mostró que son claramente divergentes de los que conforman el biovar *loti* portados por las cepas de *Mesorhizobium loti*, el simbionte habitual de *Lotus*. Estos genes también divergieron de aquellos que conforman los tres biovars (bv. *meliloti*, bv. *medicaginis*, y bv. *mediterraneanse*) descritos en la actualidad dentro de la especie *S. meliloti*. Estos aislados parecen tener un rango estrecho de hospedador. Nódulos fijadores se obtuvieron sólo en plantas de *L. corniculatus* y *L. japonicus*. Sólo ocasionalmente aparecieron algunos nódulos no fijadores en *L. glaber* y *L. uliginosus*, y no se obtuvieron nódulos en *Medicago sativa*, *Glycine max* ni *Glycine soya*.

Nodulation of *Lotus* by *Sinorhizobium meliloti* strains harbouring a new group of symbiotic genes. Among the rhizobial strains that nodulate on some species of *Lotus* endemic to the Canary Islands a small group of ten isolates were classified within the *Sinorhizobium* genus, according to their 16S rDNA and *atpD* sequences. Eight of them belonged to *S. meliloti*, a rhizobia never related to *Lotus* previously. The *nodC* and *nifH* genes harboured by all these *Lotus*-*S. meliloti* isolates indicate that they represent a new group of rhizobial symbiotic genes. Thus, in the phylogeny based on the symbiotic genes they were clearly divergent from those of the biovar *loti* harboured for the strains of *Mesorhizobium loti*, which are the common symbionts of *Lotus*. They also diverged from all of the three biovars (bv. *meliloti*, bv. *medicaginis*, and bv. *mediterraneanse*) previously described for *S. meliloti*. The *Lotus* isolates appear to have a narrow legume host-range. Nodules were obtained on *Lotus corniculatus* and *L. japonicus*. Only occasionally few plants of *Lotus glaber* and *L. uliginosus* only formed non-fixing nodules. The *Lotus*-*S. meliloti* strains do not nodulate *Medicago sativa*, *Glycine max* or *Glycine soya*.

SIII-11

La proteína NopJ de *Rhizobium* sp. NGR234 mejora la capacidad simbiótica de *Sinorhizobium fredii* HH103 para nodular soja.**López-Baena, F.J.¹, Pérez-Montaña, F.¹, Guasch-Vidal, B.¹, Vinardell, J.M.¹, Cubo, M.T.¹, Bellogín, R.A.¹, Espuny, M.R.¹, y Ollero, F.J. ^{1*}**¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

* fjom@us.es

El análisis de la secuencia del plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234 sugiere que las proteínas que codifican los genes *nopT* y *nopJ* podrían ser secretadas a través del sistema de secreción de tipo III, ya que ambos genes están precedidos por una caja *tts*. No obstante, estas proteínas, como otras proteínas Nop (Nodulation Outer Proteins), aún no se han detectado en el sobrenadante inducido con flavonoides de NGR234. La proteína Las proteínas NopT y NopJ son homólogas a YopT y YopJ de *Yersinia pestis*, que tienen actividad cisteína proteasa.

Se he comprobado que *Sinorhizobium fredii* HH103 porta una copia truncada del gen *nopT* y carece del gen *nopJ*. El gen *nopJ* de *Rhizobium* sp. NGR234 se amplificó por PCR, se clonó en un vector de amplio rango de hospedador y se transfirió a la estirpe HH103. Los transconjugantes obtenidos indujeron un número significativamente mayor de nódulos en soja Williams que la estirpe parental. Estos resultados sugieren que NopJ es un efector capaz de ser secretado por el sistema de secreción de tipo III y que su presencia mejora la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 con la soja.

The *Rhizobium* sp. NGR234 NopJ protein improves symbiotic capacity of *Sinorhizobium fredii* HH103 to nodulate soybean. Sequence analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234 suggests that the *nopT* and *nopJ* genes could encode proteins that are secreted through the type III secretion system, as both genes are preceded by a *tts* box. However, these proteins, like other Nodulation Outer Proteins (Nop), have not been detected yet in the supernatant of NGR234 cultures induced with flavonoids. NopT and NopJ are homologous to YopT and YopJ, of *Yersinia pestis*, respectively. These proteins posses cysteine protease activity.

It has been demonstrated that *Sinorhizobium fredii* HH103 carries a truncated copy of the *nopT* gene and lacks the *nopJ* gene. The *nopJ* gene of *Rhizobium* sp. NGR234 was amplified by PCR, subcloned in a wide host-range vector and transferred to the strain HH103. Transconjugants obtained induced a significant higher number of nodules on Williams soybean when compared to the parental strain. These results suggest that NopJ is an effector that could be secreted by the type III secretion system and that its presence improves the symbiotic ability of *S. fredii* HH103 with soybean.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos CICYT AGL2005-07923-C05-03 y AGL2006-13758-C05-03.

SIII-12

Caracterización de cepas de *Sinorhizobium meliloti* competitivas para la colonización y nodulación de alfalfa en condiciones salinas.

López-Contreras, J. A.*, Toro, N., y Fernández-López, M.

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, calle Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, España.
joseantonio.lopez@eez.csic.es

La salinización de los suelos agrícolas es una de las mayores limitaciones del rendimiento de cosecha de los cultivos mediterráneos. El uso de bacterias beneficiosas asociadas a raíz, es una de las posibilidades para aumentar el rendimiento de cosecha. Así, hemos estudiado una colección de cepas de *S. meliloti* aisladas en la región del Mar de Aral, que pudieran incrementar el rendimiento de cultivo de alfalfa.

Estas cepas se caracterizaron por perfiles de huella genética utilizando la secuencia de inserción *ISRm2011-2* y el intrón de grupo II, *Rmlnt1*. Posteriormente se inoculó una mezcla de 40 cepas en plantas de alfalfa crecidas a 0, 25, 50 y 100mM de NaCl y se aislaron los primeros nódulos, identificando las bacterias parentales mediante "fingerprint". Se seleccionaron las cepas AK17, AK21, AK27, y AK100. Con ellas, se realizaron ensayos de adsorción (5 h) y colonización (20 h) sobre raíces de alfalfa, en solución nutritiva con 0, 50 y 100 mM de NaCl. La cinética de nodulación, en solución nutritiva de plantas de 0 y 50 mM de NaCl, se prolongó 35 días tras la inoculación. Se determinó el peso fresco de tallos y raíces. Todos los inóculos bacterianos fueron crecidos en medio TY sin y con 50mM de NaCl. Estos resultados nos permitieron seleccionar la cepa más competitiva en adsorción, colonización y nodulación de raíces de alfalfa, que al mismo tiempo produjo un mayor rendimiento de cosecha.

Characterization of competitive *Sinorhizobium meliloti* strains for colonization and nodulation of alfalfa in saline conditions. Salinization of agricultural soils is a major factor limiting the yield of Mediterranean crops. The use of beneficial root-associated bacteria is a possibility to improve crops yield. Thus we have studied a *S. meliloti* strain collection, isolated in the Aral Sea region, which could increase the yield of alfalfa crops.

These strains were characterized by fingerprint profile using *ISRm2011-2* insertion sequence and the group II intron *Rmlnt1*. After a mixed inoculation of 40 bacterial strains on alfalfa plants growing at 0, 25, 50 y 100mM NaCl, the first appearing nodules at each salt concentration were isolated. The parental bacteria were identified according to the fingerprint profile, and strains AK17, AK21, AK27 and AK100 were selected. These strains were used in adsorption (5 hours) and colonization (20 hours) tests on alfalfa rootlets with 0, 50 and 100 mM NaCl nutrient plant solution. Nodulation kinetics were analysed for 35 days after inoculation in assays carried out with 0 and 50mM NaCl plant nutrient solution. Shoot and root fresh weight was also determined. All bacterial inocula were grown in TY medium with or without 50mM NaCl supplement. These results allowed us to select the most competitive strain in adsorption, colonization and nodulation on alfalfa roots, producing an increased yield.

SIII-13

Un polisacárido de superficie inducible por alta osmolaridad o por simbiosis con *Medicago sativa* en *Sinorhizobium meliloti* es constitutivo en *Sinorhizobium fredii* HH103.**Margaret, I.¹, Reguera, M.², Buendía-Clavería, A.¹, Lloret, J.², Vinardell, J.M.¹, Bolaños, L.^{2*}, Ruiz-Sainz, J.E.¹, y Bonilla, I.²**¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla,²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

*luis.bolarios@uam.es

Investigando mecanismos de adaptación de rizobios a estreses osmóticos describimos que varias cepas de *Sinorhizobium (Enfiser) meliloti* cambian su perfil de polisacáridos superficiales en respuesta a condiciones hiperosmóticas. El anticuerpo JIM40 reconoce un polisacárido inducido en cepas crecidas en alta osmolaridad, así como en bacteroides de nódulos de *Medicago sativa*, sugiriendo que durante el desarrollo de los nódulos, existirían condiciones suficientes de presión osmótica como para inducir este cambio en la superficie de la bacteria. Con el fin de conocer si estas respuestas están ampliamente distribuidas entre las rizobiáceas, hemos realizado ensayos con *Sinorhizobium (Enfiser) fredii* HH103 y varios mutantes en polisacáridos superficiales derivados de esta cepa. En todas ellas, la reacción con JIM40 fue constitutiva, y, además de en las condiciones descritas para *S. meliloti*, fueron reconocidas por el anticuerpo aún en medios no hiperosmóticos. La obtención de mutantes incapaces de inducir el polisacárido reconocido por JIM40 nos ayudará conocer la importancia del mismo durante la adaptación a ambientes hiperosmóticos y/o durante el desarrollo de la simbiosis.

A cell surface polysaccharide induced by high osmolarity or symbiosis in *Sinorhizobium meliloti* is constitutively expressed in *Sinorhizobium fredii* HH103. Investigating the responses of rhizobia to osmotic stress, we describe that *Sinorhizobium (Enfiser) meliloti* strains change their surface polysaccharides profile in response to hyperosmotic conditions. The antibody JIM40 recognizes a polysaccharide induced by high osmolarity in free-living cells and also in bacteroids from nodules of *Medicago sativa*, suggesting that conditions of osmotic pressure during the differentiation of bacteroids are sufficient to induce this change in the bacterial surface. In order to know whether these responses are widely distributed among rhizobia, we have probed JIM40 in *Sinorhizobium (Enfiser) fredii* HH103 and several surface polysaccharides derivative mutants. In all these strains, the positive reaction with JIM40 was constitutive and they were recognized by the antibody in any of the tested conditions, including growth in non-hyperosmotic media. Obtaining mutants unable to induce polysaccharide recognized by JIM40 will help understand its importance during adaptation to hyperosmotic environments and/or for symbiosis development.

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-01)

SIII-14

A influência de exposições prolongadas a metais pesados na tolerância e na simbiose entre *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* e o seu hospedeiro.

Pereira, S.^{1*}, Castro, I.², e Figueira, E.³

¹Centro for Cell Biology, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal ²Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Oeiras, Portugal.

* siapereira@portugalmail.com

As actividades industriais e mineiras tem resultado na contaminação de muitos ambientes terrestres com compostos potencialmente tóxicos, como é o caso dos metais pesados. Os efeitos adversos que os metais pesados impõem no crescimento das plantas, sobrevivência do rizóbio, nodulação e fixação de azoto têm-se tornado cada vez mais evidentes. O presente trabalho tem como objectivo avaliar o impacto de metais pesados em populações de *Rhizobium* isoladas de uma mina de chumbo, cuja actividade cessou há 50 anos atrás. Para atingir este objectivo, foram colhidas amostras de solo e determinaram-se as respectivas concentrações de metais pesados. Trinta e oito isolados de *Rhizobium* foram avaliados na sua eficiência de fixação de N₂ através do método de redução do acetileno (ARA), utilizando *Trifolium repens* como planta hospedeira, bem como através do peso seco das plantas. A tolerância a metais dos isolados de *Rhizobium* foi determinada em meio artificial suplementado com diferentes metais (Pb, As e Cd). Os resultados demonstraram o impacto significativo que a poluição por metais exerce em populações de *Rhizobium*, tanto na eficiência simbiótica como na tolerância a diferentes metais pesados, evidenciando a importância deste tipo de estudos para a gestão e sustentabilidade de práticas agrícolas em solos contaminados.

The influenced of long-term metal exposures in tolerance and in symbiotic effectiveness of host-*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Industrial and mining activities have resulted in the contamination of many terrestrial environments with potentially toxic compounds, such as heavy metals. There is increasing evidence of the adverse effects that heavy metals exert on plant growth, rhizobial survival, nodulation and nitrogen fixation. The present work aimed to evaluate the impact of heavy metals on *Rhizobium* populations isolated from a lead mine, which activity ceased 50 years ago. In order to reach this goal, soil samples were collected and heavy metal concentrations determined. Thirty-eight *Rhizobium* isolates from polluted soils were evaluated for effectiveness by the acetylene reduction assay (ARA) determination using *Trifolium repens* as the host plant and by plant dry weigh. Metal tolerance of *Rhizobium* isolates was screened in artificial media supplemented with different metals (Pb, As and Cd). Results show the significant impact that metal pollution exerts on *Rhizobium* populations, both in symbiotic effectiveness and in tolerance to different heavy metals, highlighting the importance of this type of studies for crop management and sustainability of agricultural practices in contaminated soils.

SIII-15

Efecto de la rizodeposición de plantas de arroz y judía sobre bacterias biosensoras de la percepción de quórum.

Pérez-Montaña, F.^{1*}, Guasch-Vidal, B.¹, González-Barroso, S.², Cubo, M.T.¹, López-Baena, F.J.¹, Ollero, F.J.¹, Megías, M.³, Megías, E.³, Bellogín, R.A.¹, y Espuny, M.R.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química y ³Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. *fcopermon@alum.us.es

Muchas bacterias Gram negativas pueden regular la expresión de genes en función de su densidad celular; mecanismo que se denomina percepción de quórum (PQ). Uno de los procesos controlados mediante PQ es la activación de genes bacterianos necesarios para la interacción del microorganismo con la planta, tanto en patógenos como en simbioses. Las plantas, a su vez, producen moléculas capaces de interferir en la PQ bacteriana.

Utilizando las especies biosensoras de PQ, *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pZLR4) y *Chromobacterium violaceum* CV026, se ha observado que los exudados de semilla y raíz de arroz y judía contienen moléculas que interfieren tanto en la PQ como en el crecimiento de la bacteria biosensora. Nuestro interés se centra en conocer la naturaleza de estas moléculas y su influencia sobre bacterias que establecen interacciones beneficiosas con esas plantas.

Effect of rice and bean rhizodeposition on quorum sensing biosensor bacteria. Many Gram negative bacteria can modulate their gene expression in a cell density-dependent manner. This mechanism is termed quorum sensing (QS). One of the processes controlled by QS is the activation of the expression of genes necessary for pathogenic or symbiotic interactions between microorganisms and plants. In addition, plants produce molecules able to interfere with bacterial QS.

Using the biosensor strains of QS, *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pZLR4) and *Chromobacterium violaceum* CV026, we have observed the presence, in rice and bean root and seed exudates, of molecules able to interfere with bacterial QS and inhibit bacterial growth. We are currently focusing our efforts on the determination of the chemical structure of these molecules and their influence on bacteria that establish beneficial interactions with these plants.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos CICYT AGL2005-07923-C05-03 y AGL2006-13758-C05-03.

SIII-16

Moléculas implicadas en la percepción de quórum en tres estirpes de rizobios.

Pérez-Montaño, F.¹, Guasch-Vidal, B.¹, González-Barroso, S.², Cubo, M.T.¹, López-Baena, F.J.¹, Ollero, F.J.¹, Bellogín, R.A.¹, y Espuny, M.R.^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología y ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química. Universidad de Sevilla. * espuny@us.es

Algunas bacterias son capaces de llevar a cabo cambios en la expresión de ciertos genes a elevadas densidades celulares, fenómeno que se denomina Percepción de Quórum (PQ). La PQ está presente en muchas bacterias Gram negativas, entre ellas algunas de la familia *Rhizobiaceae*, donde controla la expresión de ciertos genes relacionados con la simbiosis con la leguminosa.

Se ha estudiado la PQ en tres rizobios: *Rhizobium etli* ISP42, *Rhizobium hedysari* IS123 y *Sinorhizobium fredii* SMH12. Utilizando las estirpes biosensoras de PQ, *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4) y *Chromobacterium violaceum* CV026, se ha estudiado la producción de moléculas autoinductoras (AIs). Se ha observado que existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre las moléculas AIs producidas por estas estirpes rizobianas, siendo la mayor productora *S. fredii* SMH12. Además, mediante cromatografía en capa fina, se ha observado que las tres estirpes producen al menos dos moléculas distintas.

Por otro lado, se han diseñado cebadores, a partir de secuencias de ADN de bacterias relacionadas filogenéticamente, para amplificar y clonar genes de estas estirpes de rizobios implicados en la síntesis de AIs.

Molecules involved in quorum sensing in three rhizobial strains. Some bacteria are able to induce changes in gene expression according to the local density of their population. This mechanism is called Quorum Sensing (QS). QS is present in many Gram negative bacteria, including some members of the family *Rhizobiaceae*. In these bacteria, QS controls the expression of genes involved in their symbiotic interaction with legumes.

We have studied QS in three rhizobial species: *Rhizobium etli* ISP42, *Rhizobium hedysari* IS123 and *Sinorhizobium fredii* SMH12. Using the biosensor strains of QS, *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4) and *Chromobacterium violaceum* CV026, we have studied the production of autoinducers (AIs) and have detected qualitative and quantitative differences between these strains. In these studies we have observed that *S. fredii* SMH12 produces the highest concentrations of AIs. Furthermore, we observed by Thin Layer Chromatography that all these strains produce at least two different molecules.

We have also designed primers, using the DNA sequence of phylogenetically related bacterial species, in order to amplify and clone rhizobial genes involved in the synthesis of AIs.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos CICYT AGL2005-07923-C05-03 y AGL2006-13758-C05-03.

SIII-17

Efecto de la inoculación de arroz con bacterias PGPRs aisladas de la Marisma del Guadalquivir.

Pérez-Montaña, F.¹, López-Baena, F.J.¹, Guasch-Vidal, B.¹, Cubo, M.T.^{1*}, Bellogín, R.A.¹, Del Castillo, I.², Megías, M.², Espuny, M.R.¹, y Ollero, F.J.¹

¹*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología y* ²*Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla*

*cubo@us.es

De 626 bacterias endofíticas, epifíticas y rizosféricas de arroz aisladas en los arrozales de la Marisma del Guadalquivir, se seleccionaron 28 que tienen potenciales propiedades PGPR, como son la solubilización de fosfato, actividad quitinolítica, la producción de AIA o de sideróforos. Todas estas bacterias se caracterizaron mediante la secuenciación del ADN que codifica ARNr 16S. Por otra parte, a algunas de estas bacterias se les ha estudiado su capacidad para resistir la presencia de fungicidas y herbicidas usados habitualmente en el cultivo de arroz.

Se han realizado ensayos en condiciones controladas con plantas de arroz usando algunas de estas bacterias en inoculaciones individuales y en consorcios con otras bacterias. Estos ensayos han puesto de manifiesto que la presencia de alguna de estas bacterias incrementan significativamente el peso seco de la raíz y de la parte aérea de la planta, por lo que podrían utilizarse como inoculantes para incrementar la producción de los arrozales.

Effect of rice inoculation with PGPR bacteria isolated from the Marismas del Guadalquivir. 626 endophytic, epiphytic and rhizospheric bacteria from rice paddies of the Marismas del Guadalquivir were isolated. 28 of these isolates that present potential PGPR properties such as phosphate solubilization, chitinase activity, production of IAA or siderophores were selected. All these bacteria were characterized by sequencing of the DNA that encodes ARNr 16S. Moreover, the capacity of some of these bacteria to grow in the presence of herbicides and fungicides commonly used in the cultivation of rice was assayed.

Rice plants were individually and in consortia inoculated with some of these bacteria and grown under controlled conditions. The results obtained showed that the presence of these bacteria increases significantly both the dry weight of the root and the aerial parts of the plant. Therefore it would be possible to use these bacteria as inoculants to increase the production of rice paddies.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos CICYT AGL2005-07923-C05-03 y AGL2006-13758-C05-03.

SIII-18

Deficiencia de Boro en la interacción rizobio-leguminosa: ¿simbiosis o patogénesis?

Reguera, M.*, Bolaños, L., y Bonilla, I.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

**maria.reguera@uam.es*

La relación simbiótica rizobio-leguminosa viene determinada por interacciones mediadas por componentes moleculares de la planta y la bacteria. Modificaciones en algunos de ellos determinan la inducción de mecanismos de defensa en la planta y la transformación de la relación en patogénica. El boro (B), micronutriente esencial de plantas, actúa como modulador de señales durante el proceso. Así, la deficiencia de B altera procesos como la infección e invasión, así como la organogénesis y maduración del nódulo. Además, en ausencia de este micronutriente, la planta dispara algunos mecanismos de defensa contra la infección del rizobio, como la secreción de glicoproteínas para atrapar a la bacteria en el lumen del canal de infección. El rizobio parece evadirse induciendo la polimerización de dichas glicoproteínas, y evitando su adhesión a la superficie bacteriana. Esto no ocurre en deficiencia de B, de forma que la bacteria quedaría atrapada. Además, de estas barreras físicas de defensa, que probablemente dependan de un efecto del B en la estructura de estas glicoproteínas, el análisis bidimensional de proteínas de nódulos deficientes en B, indica una inducción a nivel molecular de una respuesta frente al ataque de patógenos a leguminosas. Así, en deficiencia de B, se inducen al menos dos proteínas relacionadas con la patogénesis, PR10 y PR17, que son inhibidas por los rizobios en relaciones simbióticas funcionales.

Boron deficiency in the legume-rhizobia interaction: ¿symbiosis or pathogenesis? Rhizobia-legume symbioses result of plant-bacteria cell surface interactions mediated by molecular components of both partners. Modifications in some of them determine the induction of plant defence responses which determine a pathogenic rather than symbiotic interaction. Boron (B), an essential micronutrient plant, modulates plant-bacteria signalling during nodule development. Under B deficiency, processes such as infection and invasion or nodule organogenesis and maturation fail. Moreover, in the absence of this micronutrient, the plant triggers some defence mechanisms to avoid rhizobial infection, like the secretion of glycoproteins that can trap bacteria into the lumen of infection threads. Rhizobia seem to escape following polymerization of these glycoproteins and avoiding its attachment to the bacterial surface. This does not happen under B deficiency, and bacterial progress is arrested. Besides these physical barriers, which probably depend on the effect of B on the structure of these glycoproteins, two-dimensional analysis of proteins from B-deficient nodules shows an induction of a pathogenesis related plant response at the molecular level. At least two proteins associated with pathogenesis, PR10 and PR17, which are inhibited by rhizobia in functional symbiotic relationships, are induced under B deficiency.

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-01)

SIII-19

Relación del cluster 3 del plásmido pSymb de *Sinorhizobium meliloti* 1021 con mecanismos de osmoadaptación y modificaciones de los polisacáridos superficiales en respuesta a hiperosmolaridad.

Reguera, M.¹, Buendía-Clavería, A.², Martín, M.¹, Rivilla, R.¹, Bolaños, L.¹, Vinardell, J.M.², Bonilla, I.¹, Ruiz-Sainz, J.E.², y Lloret, J.^{1*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid,

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

*javier.lloret@uam.es

El megaplásmido pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 es esencial para la viabilidad de esta bacteria y está relacionado con la adaptación a estrés hiperosmótico. Hasta 9 clusters de genes de pSymB aparentemente codifican polisacáridos de superficie de función aún desconocida. El análisis *in silico* de uno de ellos, el cluster 3 mostró que supuestamente codifica para la síntesis y el transporte de un polisacárido altamente metilado, que podría corresponder a un antígeno O. Mutantes en esta región están afectados en el crecimiento en condiciones hipersalinas, y fueron incapaces de crecer en presencia de polietilenglicol (PEG) 150 mM, un osmolito no iónico. La expresión del gen SMb21071 (putativa glicosil-transferasa inicial) es inducida por condiciones hiperosmóticas. El perfil electroforético de polisacáridos superficiales indica que la cepa silvestre 1021 induce al menos una nueva banda, posiblemente de antígeno O, cuando crece en condiciones hiperosmóticas no iónicas, que no muestran los mutantes en el cluster 3, sugiriendo que esta región es importante para mecanismos de osmoadaptación que implican cambios en la superficie celular.

Cluster 3 of plasmid pSymb is required for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti* 1021 and is implicated in modifications of cell surface polysaccharides structure in response to hyperosmotic stress. Megaplasmid pSymB of *Sinorhizobium meliloti* is essential for viability and is implicated in adaptation to hyperosmotic stress. The pSymB plasmid contains 9 gene clusters that apparently encode surface polysaccharides of unknown function. *In silico* analysis of pSymB cluster 3 showed that it putatively encodes for the synthesis and transport of a methylated surface polysaccharide that could correspond to an O-antigen. Mutants affected in this cluster showed defects in growth under saline and non-saline osmotic stress, being unable to grow at 150 mM polyethylenglycol (PEG). One of the genes in this cluster, SMb21071 (putative initiating glycosyl-transferase) is upregulated by hyperosmotic conditions. Electrophoretic silver-stained polysaccharide profiles showed that the mutants did not present a band induced by non-saline hyperosmolarity in the wild-type strain. Overall results suggest that cluster 3 is important for osmoadaptation mechanisms involving changes in cell surface polysaccharides.

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-01)

SIII-20

Implicación de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en la infección secundaria de *Trifolium repens*.

Robledo, M.^{1*}, Jiménez-Zurdo, J.I.², Velázquez, E.¹, Dazzo, F.³, Martínez, E.¹, y Mateos, P.F.¹

¹Departamento de Microbiología y Genética, U. de Salamanca, España, ²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España ³Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, USA. *martarg@usal.es

La celulasa CelC2 producida por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 es una β -1,4 endoglucanasa que presenta una alta especificidad de sustrato por celulosa no cristalina. Esta especificidad restringe significativamente su capacidad erosiva a aquellas zonas localizadas donde la pared celular vegetal carezca de estructura cristalina. Utilizando microscopía de luz polarizada observamos que en *Trifolium repens* la pared celular de los pelos radicales se compone de celulosa cristalina excepto en el ápice, por donde penetra la bacteria en la planta, y que los canales de infección también presentan esta estructura isotrópica excepto en su extremo terminal, donde las bacterias son liberadas en las células del nódulo. Por tanto, la celulasa CelC2 puede participar en estas dos etapas claves que tienen lugar durante el establecimiento de una simbiosis fijadora de Nitrógeno. Recientemente, mediante la purificación del enzima y la obtención de mutantes knock-out hemos demostrado su implicación en la infección primaria. En este trabajo estudiamos su implicación en el proceso de infección secundaria mediante la obtención de mutantes que sobreexpresan el enzima. Una vez en el interior del nódulo, estos mutantes degradan masivamente la pared celular del canal de infección en su extremo terminal lo que origina la liberación de las bacterias sin rodearse de la membrana citoplasmática vegetal, la desorganización de la célula vegetal y la ausencia de simbiosomas fijadores de Nitrógeno. Estos resultados refuerzan el papel crucial de este enzima en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y sugieren que la regulación de su expresión es clave en el establecimiento de una relación efectiva entre ambos.

Role of CelC2 cellulase of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* on secondary infection of *Trifolium repens*. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 produces an β -1,4 endoglucanase (CelC2) with high substrate specificity for noncrystalline cellulose. This specificity significantly restricts its *in vivo* site of wall-penetrating erosive action to the highly localized root hair infection sites lacking crystalline wall architecture. Using Microscopy with polarized light with *Trifolium repens*, we have shown that the cell wall along the shaft of root hairs is crystalline except at the root hair tip, where bacteria penetrate into the host, and that the cell wall of infection threads is also crystalline except at the site where bacteria are released into the nodule cells. These two key processes in nitrogen fixation symbiosis establishment can involve cellulase CelC2 degradation. Recently, by enzyme purification and analysis of *celC2* knock-out mutant phenotypes we have demonstrated that this enzyme is involved in primary infection. In this work, we study its involvement in secondary infection using a recombinant strain that overproduces CelC2. Once in the invasion zone within the nodule, this mutant highly hydrolyzed the infection thread cell wall at its end, leading to bacteria release without plant cytoplasmic membrane, disorganization of nodule plant cells and absence of nitrogen-fixing symbiosomes. These results further support the crucial role of this enzyme in *Rhizobium*-legume symbiosis and suggest that *celC2* gene expression regulation is important in the establishment of an effective relationship between both symbiotic partners.

SIII-21

Celulasas y Celulosa de *Rhizobium*.**Robledo, M.¹, Rivera, L.¹, Jiménez-Zurdo, J.I.², Rivas, R.¹, Velázquez, E.¹, Dazzo, F.³, Martínez-Molina, E.¹, y Mateos, P.F.^{1*}**

¹Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, España, ²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. ³Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, USA. *pfmg@usal.es

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado que *Rhizobium* produce una celulasa (CelC2) que es esencial en el proceso de infección en la simbiosis Fijadora de Nitrógeno con trébol. CelC2 es una β -1,4 endoglucanasa perteneciente a la familia 8 de las glicosilhidrolasas que presenta una alta especificidad de sustrato por celulosa no cristalina. Ortólogos del gen (*celC*) que codifica para esta endoglucanasa se encuentran en diversas eubacterias que sintetizan celulosa (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Gluconoacetobacter*, *E. coli*, *Salmonella*...). En todas estas eubacterias que producen celulosa, este gen (*celC*) se localiza en una región del cromosoma (*celABC* o *bcsABZ*) que interviene en la biosíntesis de celulosa bacteriana. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa bacteriana mediante la utilización de las cepas salvaje ANU843 y E11 y diferentes construcciones (mutantes knockout y superproductores de CelC2) y de diversas técnicas microscópicas: luz visible, luz polarizada, fluorescencia, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

***Rhizobium* Cellulases and Cellulose.** *Rhizobium* Cellulase CelC2 Is Essential for Primary Symbiotic Infection of Legume Host Roots. CelC2 cellulase is a 1,4- β -D-endoglucanase belonging to the glycosyl hydrolase family 8 with high substrate specificity for non-crystalline cellulose. Orthologs to the *celC* endoglucanase-coding gene are found in a diversity of eubacteria that make cellulose (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Gluconoacetobacter*, *E. coli*, *Salmonella* and others). In all these cellulose-producing eubacteria the *celC* genes are located near putative cellulose synthase genes localized in a region of the chromosome (*celABC* or *bcsABZ*) involved in bacterial cellulose biosynthesis. Microscopy analysis of the symbiotic phenotypes of the ANU843 and E11 wild-type parent and derivative strains (CelC2 knockout mutant, and another recombinant that overproduces CelC2) indicated that this enzyme fulfils a very significant role in bacterial cellulose biosynthesis.

SIII-22

Actividad de bacterias aisladas de la micosfera de ejemplares de *Amanita caesarea* sobre el crecimiento micelial de *A. caesarea*.

Santamaría, C.^{1*}, Camacho, M.¹, Grande M.J.¹, Romero de la Osa, L.², y Daza, A.¹

¹IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil", CICE, Alcalá del Río (Sevilla), España. ²Oficina Comarcal Agraria de Aracena, Delegación Provincial de Agricultura, Aracena (Huelva), España. *mariac.santamaria@juntadeandalucia.es

Se han aislado bacterias de la micosfera de ejemplares de *Amanita caesarea* recolectados en tres castaños (Castanea sativa) de la Sierra de Aracena (Huelva). Se estimaron las poblaciones bacterianas cultivables, se aislaron las bacterias más abundantes y se analizaron algunas de sus características funcionales potencialmente implicadas en el desarrollo de *C. sativa*. Se seleccionaron 40 aislamientos bacterianos que mostraron simultáneamente la capacidad de solubilizar fosfato y producir sideróforos. En cultivos duales bacteria/hongo se estudió el efecto de estos aislamientos sobre el crecimiento micelial in vitro de *A. caesarea*. La mayor parte de ellos o bien no afectan o incluso inhiben el desarrollo del micelio, pero algunos de estos aislamientos bacterianos parecen estimularlo cuando se compara con el crecimiento micelial de los controles no inoculados.

Activity of bacterial isolates obtained from mycosphere soils of *Amanita caesarea* on *A. caesarea* mycelial growth. The isolation of bacterial strains was carried out on mycosphere soils of *Amanita caesarea* specimens from three different chestnut orchards in the Sierra de Aracena (Huelva). Bacterial density in mycosphere soil samples was estimated and the most abundant strains were isolated. Some functional bacterial traits potentially involved in *C. sativa* development were analyzed. Forty of these isolates were selected by its ability to simultaneously solubilize phosphate and produce siderophores. In dual cultures the activity of these isolates showed variations in growth rates of *A. caesarea* mycelium. Most of them showed no effect or antifungal activity, and few isolates were able to increase mycelial growth when compared to uninoculated mycelial growth.

SIII-23

Estimulação da nodulação utilizando metabolitos secundários da planta.

Simões, F.^{1,2*}, Possante, M.¹, Mendonça, D.^{1,2}, Sá- Pereira, P.^{1,2}, e Matos, J.^{1,2}

¹Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia e Inovação, Grupo de Biologia Molecular, Lumiar, Portugal. ²L-INIA, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Oeiras, Portugal.* fernandasimoes@ineti.pt

As flavonas são co-pigmentos importantes encontrados nas flores de muitas plantas superiores e desempenham vários papéis na adaptação das plantas ao stresse. Nas espécies *Medicago*, as flavonas actuam também como moléculas sinal durante a interacção simbiótica com a bactéria *Sinorhizobium meliloti* e estão entre os indutores mais potentes dos genes *nod* encontrados em exsudados de raízes. Sabe-se que a interacção simbiótica entre *Rhizobium meliloti* e alfalfa resulta na formação na raiz de nódulos fixadores de azoto. Verificou-se que a molécula indutora para a expressão de *nodABC* era 3',4',5,7-tetra-hydroxiflavona (luteolina). A luteolina é assim um metabolito secundário normal encontrado nas plantas que pode servir para controlar a expressão dos genes *nodABC* durante o desenvolvimento do nódulo.

O presente trabalho refere-se à pesquisa e identificação de genes relacionados com a biossíntese de luteolina a partir de flores de *Reseda luteolaa*. Foram produzidos TDFs a partir de uma abordagem de cDNA-AFLP que se pensa poderá levar à identificação de factores de transcrição importantes para os componentes das vias de sínteses de flavona, nomeadamente as da síntese de luteolina. Os novos genes identificados poderão ter utilidade para compreender as relações simbióticas e para o desenvolvimento de sistemas de nodulação melhorados. Esta hipótese será testada em trabalho futuro.

Nodulation Enhancing Using Plant Secondary Metabolites. Flavones are important copigments found in the flowers of many higher plants and play a variety of roles in plant adaptation to stress. In *Medicago* species, flavones also act as signal molecules during symbiotic interaction with the bacterium *Sinorhizobium meliloti* and are within the most potent *nod* gene inducers found in root exudates. It is known that the symbiotic interaction between *Rhizobium meliloti* and alfalfa results in the formation of nitrogen-fixing root nodules. The inducer molecule for *nodABC* expression was determined to be 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone (luteolin). Luteolin is a normal secondary plant metabolite found throughout the plant kingdom that may serve to control *nodABC* expression during nodule development.

Our present work deals with the identification of genes related with luteolin biosynthesis from *Reseda lutea* flowers. We have produced TDFs from a cDNA-AFLP approach which we believe can bring new insights on identifying important transcription factors to flavone synthases pathways, namely, luteolin biosynthesis. New identified genes might be helpful for understanding symbiotic relations and for the development of improved nodulation systems. This hypothesis will be further tested in future work.

SIII-24

Formación de biofilms en *Azospirillum brasilense*.**Valverde, A.^{1*}, Lerner, A.², Igual, J.M.¹, Burdman, S.², y Okon, Y.²**

¹Departamento de Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroforestales y Ganaderos, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Salamanca, España, Department of Plant Pathology and Microbiology, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.
 *angel.valverde@irnasa.csic.es

Los biofilms pueden ser definidos como poblaciones en las cuales las células individuales se hallan adheridas unas a otras y/o a superficies o interfases. Se piensa que la mayoría de las bacterias, en lugar de presentarse en vida libre, viven principalmente formando biofilms. Algunas bacterias del suelo colonizan el ambiente relativamente rico en nutrientes que rodea el sistema radicular de las plantas (rizosfera) donde, a su vez, tienen que competir con otras muchas para poder permanecer en este nicho. Este comportamiento trae como resultado un consorcio complejo de bacterias que compiten e interactúan entre sí y que probablemente forman biofilms.

A. brasilense está considerada una rizobacteria modelo en el estudio de la promoción del crecimiento vegetal que ha sido empleada con éxito como inoculante para mejorar la eficiencia de diversos cultivos bajo diferentes condiciones y climas. En *Azospirillum*, los polisacáridos asociados a la superficie y las glicoproteínas, incluidas las fimbrias, juegan un papel muy importante tanto en la colonización de la rizosfera como en la adhesión a superficies presentes en el suelo. Sin embargo, la formación de biofilms en ambas situaciones está muy poco estudiada. En este trabajo se investiga la formación de biofilms en el genotipo silvestre de *A. brasilense* y en mutantes afectados en la producción de polisacárido. Entender el proceso que conduce a la formación de biofilms es de vital importancia para llevar a cabo una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Formation of biofilms by *Azospirillum brasilense*. Biofilms are bacterial populations in which individual cells adhere to each other and/or to surfaces or interfaces. It is widely accepted that most bacteria live principally in biofilms rather than in a planktonic life style in both natural and artificial environments. Soil born bacteria colonize the relatively nutrient-rich environment around plant roots and have to compete with many other bacteria in order to remain in this niche. This behavior results in a complex consortium of interacting and competing bacteria probably living in a biofilm community.

A. brasilense is considered a model plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) that has been applied successfully as inoculant to improve the efficiency of crop cultivation of a wide variety of crops in various growth conditions and climates. In *azospirilla*, surface-associated polysaccharides and glycoproteins, fibrils among them, play an important role in both rhizosphere colonization and attachment to surfaces in the bulk soil. However, biofilms formation under either condition is scarcely characterized. In this work we are investigating biofilms formation in *A. brasilense* wild type and in mutants impaired in polysaccharide production. Understanding the biofilm formation process is of great importance for an environmentally friendly and sustainable agriculture.

SIII-25

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y biofumigación empleados como métodos agroambientales en el control de *Rhizoctonia solani*.

Sacristán Pérez-Minayo, G.¹, Reguera Useros, J.I.¹, Probanza Lobo, A.^{2*}, García Cristóbal, J.², y López Robles, D.J.³

¹Área de Microbiología, ³Área de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Burgos, España, ²Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Madrid, España. *gsacristan@ubu.es

Tanto las denominadas PGPR (bacterias promotoras del crecimiento vegetal) como la biofumigación se han empleado como técnicas agrícolas en el control del "damping off" causado por el hongo edáfico *Rhizoctonia solani*.

Para evaluar estos dos métodos se sembraron semillas de remolacha azucarera en suelos infectados con *R. solani*, excepto en el ensayo control positivo (sin patógeno). Los tratamientos fueron los siguientes: biofumigación con diferentes dosis de biofumigante (10, 20 y 40 g/Kg de suelo agrícola), inoculación de dichas semillas con nuestra PGPR (*Burkholderia gladioli*) y los correspondientes ensayos control.

En el ensayo de biofumigación con una dosis de 40 g/Kg de suelo agrícola se obtuvo el mayor número de nascencias de plántulas de remolacha azucarera. Cuando *B. gladioli* fue inoculada se obtuvieron resultados similares a los del ensayo de biofumigación con una dosis de 10 g/Kg de suelo agrícola.

La biofumigación y el empleo de la mencionada PGPR aplicadas al control del "damping off" causado por *R. solani* pueden ser viables y compatibles con el desarrollo de una agricultura ecológica sin perjuicio del medio ambiente.

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and biofumigation process used as agro-environmental methods for control of *Rhizoctonia solani*. Both PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) and biofumigation process have been used as agricultural techniques for damping off control caused by the edaphic fungus *Rhizoctonia solani*.

To evaluate these methods sugar beet seeds were sowed in infected by *R. solani* soils, except for the positive control assay (without pathogen). The treatments were: biofumigation with different doses of biofumigant (10, 20 and 40 g/Kg agricultural soil), inoculation of these seeds with our PGPR (*Burkholderia gladioli*) and the corresponding control assays.

In the biofumigation assays which used 40 g of waste per Kg of agricultural soil were found the largest number of preemerged sugar beet seeds. When *B. gladioli* were inoculated, a similar growth rate to the biofumigation experiment with 10 g of waste per Kg of agricultural soil was observed.

Biofumigation and the use of the mentioned PGPR applied for damping off control caused by *R. solani* could be possible and compatible with the ecological agriculture development without harm for the environment.

SESSÃO IV / SESIÓN IV
Fisiologia e metabolismo
Fisiología y metabolismo

CTIV-1

Resposta ao deficit hídrico em *Medicago truncatula* cv. Jemalong, uma leguminosa modelo.**Nunes, C.^{1,2}, Araújo, S.², Marques da Silva, J.^{1,2}, Fevereiro, M.P.^{1,3}, e Bernardes da Silva, A.^{1,2*}**

¹Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal, ²Centro de Engenharia Biológica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal, ³Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Laboratório de Tecnologia de Células Vegetais, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
*arsilva@fc.ul.pt

Medicago truncatula, uma espécie de leguminosa tolerante à seca de origem Mediterrânea, é considerada uma planta modelo das leguminosas. Como tal, *M. truncatula* tem sido uma das espécies em foco no estudo da resposta a stresses bióticos e abióticos, quer a nível fisiológico e bioquímico, quer a nível molecular, e tem sido, também, objecto de várias transformações genéticas. A cultivar de origem Australiana Jemalong A17, a mais usada em agricultura e pastagens, foi escolhida para a sequenciação do genoma (<http://www.medicago.org>).

Resultados obtidos em plantas de *M. truncatula* cv Jemalong sujeitas a deficit hídrico, serão apresentados. Ao nível da folha observam-se mecanismos tendentes a evitar a desidratação, como o decréscimo da condutância estomática, e mecanismos de resistência que envolvem ajuste osmótico. Ao nível das raízes são visíveis as alterações resultantes da desidratação, sendo o número de nódulos muito reduzido nas plantas sujeitas a stress hídrico severo. No entanto, três dias após re-hidratação do solo já surgem nódulos de pequenas dimensões. Serão discutidos, em linhas gerais, possíveis vias de ajustes do balanço carbono/azoto em *M. truncatula*.

Alguns mutantes de *M. truncatula*, envolvendo genes ligados ao metabolismo do azoto e com fenótipos característicos, serão referidos numa perspectiva de poderem vir a permitir uma melhor compreensão dos mecanismos de fixação de azoto em plantas leguminosas.

Water deficit response in *Medicago truncatula* cv Jemalong, a model legume.

Medicago truncatula, a drought-tolerant legume species from Mediterranean origin, is considered a legume model. The cultivar Jemalong A17, from Australian origin, is the most used in pastures and agricultural practices and was chosen for genome sequencing (<http://www.medicago.org>).

Results obtained in *M. truncatula* cv Jemalong plant under water deficit conditions will be presented. At leaf level exist mechanisms of drought avoidance, through a decrease in stomatal conductance, and drought resistance, involving osmotic adjustment. At the root level, water deficit affect the root development and reduce the number of nodules. However, three day after rehydration nodules with small dimension is visible. Possible carbon/nitrogen adjustment will be discussed

Some *M. truncatula* mutants concerning genes involved in nitrogen fixation and with characteristic phenotype will be referred in order to allow a better understanding of the mechanisms involved in nitrogen fixation in legumes.

CTIV-2

Potencial de la inducción del metabolismo secundario como herramienta biotecnológica para la producción de bioactivos y mejora de los mecanismos de defensa en plantas.

Ramos, B.*, y Gutiérrez Mañero, F.J.

*Departamento de CC. Ambientales y RR. Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU. 28668 Boadilla del Monte. Madrid. *bramsol@ceu.es*

Los metabolitos secundarios de las plantas son una herramienta fundamental para su propia supervivencia. Su característica fundamental es su gran variabilidad molecular, resultado de la enorme variedad de situaciones ambientales a las que se tiene que enfrentar, el fin último es defender a la planta frente a estreses bióticos (herbívoros, plagas, hongos, bacterias) o abióticos (sequía, estrés osmótico, temperatura, irradiación...). El conocimiento de los metabolitos secundarios así como de las rutas biosintéticas y los factores capaces de inducir su síntesis permiten su manipulación biotecnológica, lo que constituye una herramienta fundamental para potenciar sus niveles en plantas. La potenciación del metabolismo secundario tiene aplicaciones desde varios puntos de vista. Por una parte, en agricultura, donde podremos conseguir plantas que mejoren su productividad en situaciones adversas, y además, no requieran un consumo alto de fertilizantes químicos y pesticidas, contribuyendo así al desarrollo sostenible. Por otra parte, los alimentos de origen vegetal que forman parte de la dieta con un mayor nivel de ciertos metabolitos secundarios suponen ciertas ventajas para la salud; en este caso, los metabolitos secundarios pasan a desempeñar un importante papel en la salud humana y se denominan bioactivos. Por último, los metabolitos secundarios son de gran valor para la industria farmacéutica puesto que actualmente el 80% de los medicamentos que hay en el mercado son de origen vegetal.

Elicitation of secondary metabolism as a biotechnological tool to boost bioactives and defensive metabolism in plants. Secondary metabolism (SM) is key for plant survival. Its main feature is the enormous molecular variability due to the different situations plants face along their life, providing defense against biotic (herbivores, microorganisms...) and abiotic stresses (osmotic stress, drought, temperature...). Knowledge of these SM as well as their biosynthetic pathways, and those factors able to elicit them will allow further biotechnological manipulation; hence this knowledge is key to boost levels of SM in plants.

Among the many relevant applications of this secondary metabolism are agriculture, nutraceuticals and pharmaceutical industry. In agriculture, crop productivity may be increased under adverse conditions with low chemical inputs, leading hence to sustainable development. In the other hand, foods from plant origin containing high levels of SM are relevant for health; in these cases, SM are termed bioactives. Finally, 80% of the currently marketed medicines are from plants. In view of this figure, it is beyond any doubt the relevance of SM for the pharmaceutical industry.

SIV-1

Alteraciones en la producción de bioactivos en *Glycine max* provocados por PGPRs.**Algar, E., Ramos, B.*, Lucas, J.A., García-Villaraco, A., y Gutiérrez Mañero, F.J.***Departamento de CC. Ambientales y RR. Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU. 28668 Boadilla del Monte. Madrid. *bramsol@ceu.es*

La soja es fuente esencial de proteínas y excelentes principios activos, entre ellos las isoflavonas, que ejercen diversos efectos beneficiosos sobre la salud humana. La aplicación de agentes inductores, como las PGPRs, puede resultar en la mejora de la calidad nutricional de la planta, debido al aumento de principios bioactivos (Kloepper *et al.*, 1989. Trends Biotechnol. 7:39-43). Estas bacterias son capaces de estimular el metabolismo defensivo de las plantas confiriendo una ventaja adaptativa a la misma frente a situaciones de estrés, como cuando ésta se enfrenta a un patógeno (van Loon *et al.*, 1998. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-83). Por otra parte, las isoflavonas son fundamentales en el establecimiento de simbiosis entre la planta y rizobios, y, además poseen funciones relacionadas con la defensa en la planta frente a diversos factores, tanto bióticos como abióticos (Yu *et al.*, 2005. Adv. Agron. 86:147-190).

En este trabajo se realizaron 2 experimentos, para evaluar la capacidad de la cepa PGPR *Pseudomonas fluorescens* N21.4 para promover el crecimiento, evaluando los niveles de isoflavonas y la protección frente a la enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycine* en plantas de soja. Los resultados mostraron una mejora en la defensa de la planta frente al patógeno en aquellas plantas tratadas con la PGPR, lo cual se correlacionó con los perfiles de isoflavonas de las plantas. Esto corrobora la hipótesis del papel de las isoflavonas en la defensa de las plantas y la inducción sistémica provocada por agentes no patógenos.

Changes in bioactive profiles of *Glycine max* induced by PGPRs. Soybean is one of the best sources of plant protein and bioactives, among which, isoflavones are outstanding for their great incidence in human health. Elicitation of plants with some agents such as PGPRs, may result in an improved quality raw material due to the increase in bioactives (Kloepper *et al.*, 1989. Trends Biotechnol. 7:39-43). Some PGPRs are able to trigger plants secondary metabolism, involved in defence to pathogen attack (van Loon *et al.*, 1998. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-83). This secondary metabolism is also relevant to plant-bacterial communication, therefore, alteration may affect the nodulation process, and these same metabolites play a role on plant's defense against biotic or abiotic factors (Yu *et al.*, 2005. Adv. Agron. 86:147-190).

In view of the above, the aim of this study was to evaluate the ability of *Pseudomonas fluorescens* N21.4 to improve soybean seedling growth, evaluating isoflavone levels and increased defensive potential against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycine*

Our results show that N21.4 is able to improve defense against the leaf pathogen and that this effect is coupled to alterations in the isoflavone profiles reinforcing the hypothesis of the role of isoflavones on plant defense.

SIV-2

A relação entre o conteúdo em glutathione e a distribuição de cádmio nas células de *Rhizobium leguminosarum*.

Corticeiro, S.*, e Figueira, E.

Centro de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro.

**sofiacorticeiro@ua.pt*

A elevada utilização de metais pesados em processos agrícolas e industriais é um dos problemas ambientais mais graves na poluição dos solos. O cádmio (Cd), em particular, constitui uma das maiores preocupações devido à sua elevada mobilidade e biodisponibilidade nos solos. Em trabalhos anteriores identificamos um mecanismo importante de tolerância ao Cd em células de *Rhizobium leguminosarum* que envolve a formação de complexos GSH-Cd. Os nossos resultados indicaram que a formação de complexos GSH-Cd é um mecanismo induzido em *R. leguminosarum*, existente tanto no isolado sensível como no tolerante. No entanto, este mecanismo apresentou uma maior eficiência no isolado tolerante comparativamente ao sensível. De modo a compreender melhor este mecanismo, foi monitorizada a distribuição de Cd e de GSH, durante o crescimento de *Rhizobium*. Assim, as células foram crescidas na presença de 1 mM Cd (isolado tolerante) e de 0.25 mM Cd (isolado sensível), colhidas a 0h, 0.25h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 48h e 72h, e o seu conteúdo em Cd e GSH foi determinado. A quantificação de GSH foi realizada por RP-HPLC, com derivatização pré-coluna. Foram extraídas diferentes fracções sub-celulares de Cd (Cd fracamente ligado, Cd intracelular e Cd ligado à parede) e quantificadas por ICP-AES. Os nossos resultados permitiram elucidar parte dos mecanismos intracelulares inerentes à tolerância ao Cd em *Rhizobium*, o que pode ser determinante no aumento da sua capacidade para tolerar elevadas concentrações de metais pesados nos solos.

The relationship between glutathione content and cadmium distribution in *Rhizobium leguminosarum* cells. Heavy metal pollution is one of the current most troublesome environmental problems due to the widespread use of metals for industrial and agricultural purposes. Among the non-essential metals, cadmium (Cd) poses a most concerning threat due to its higher mobility and bioavailability. In a previous report, we demonstrated the existence of an important intracellular Cd detoxification mechanism, involving glutathione (GSH), in *Rhizobium leguminosarum* cells, the formation of GSH-Cd complexes. Our results indicated that GSH-Cd chelation was an induced mechanism of Cd detoxification in *R. leguminosarum*, present in both sensitive and tolerant strains. Nevertheless, this mechanism seems to be particularly efficient to the tolerant strain, when compared to the sensitive one. In order to better understand this mechanism, the Cd and GSH distribution were monitored during the 72h corresponding to *Rhizobium* cells growth. Cells were grown in the presence of 1 mM Cd (tolerant strain) and 0.25 mM Cd (sensitive strain), and harvested at 0h, 0.25h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 48h and 72h, and its Cd and GSH content was determined. GSH quantification was performed by RP-HPLC analysis with pre-column derivatisation. Different sub-cellular Cd fractions were extracted (loosely bound Cd, intracellular Cd and wall-bound Cd) and were quantified by ICP-AES. Our results can highlight the intracellular mechanisms underlying Cd detoxification in soil bacteria which is extremely important for enhancing their ability to tolerate high metal concentrations in the soils.

SIV-3

Un nuevo receptor kinasa de tipo LRR regula la respuesta de las raíces de *Medicago truncatula* en condiciones de estrés salino.**De Lorenzo, L.^{1,2*}, Merchan, F.^{1,2}, Thompson, R.³, Clarke, J.⁴, Crespi, M.², y Sousa, C.¹**

¹Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. ²Institut des Sciences du Végétal, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette Cedex, France. ³INRA, Grain Legumes Research Unit (UMR LEG), Dijon, France. ⁴John Innes Centre, Norwich, U. K.

En plantas, los receptores quinasas presentan un papel crucial en la percepción de las señales externas. La raíz de las plantas explora el suelo para optimizar su crecimiento, vía una cascada de señalización compleja, principalmente analizada en *Arabidopsis*. Las raíces de las plantas leguminosas presentan características diferenciales a éstas, concretamente en su capacidad para establecer una relación simbiótica con los rizobios del suelo. Estos cultivos, de gran importancia en la agricultura, están afectados por diversos estreses ambientales, tales como la salinidad. En este trabajo, hemos identificado un gen que codifica para un LRR-RLK, *MtSrlk*, de la leguminosa modelo *Medicago truncatula*, el cual se induce por estrés salino en raíces de esta planta. Ensayos de ARN de interferencia sobre este gen producen raíces transgénicas menos afectadas por las condiciones estresantes provocadas por la salinidad. Ensayos histoquímicos han indicado que este gen está expresado en la epidermis de los tejidos radicales. El estudio de dos mutantes TILLING sobre *MtSrlk*, han mostrado un fenotipo similar a éste encontrado con ARNi en el crecimiento radical de *M. truncatula* bajo condiciones de estrés salino. Asimismo, diferentes genes reguladores inducidos por salinidad, se encuentran regulados positivamente por *MtSrlk* en raíces ARNi y mutantes TILLING de *MtSrlk*. En base a estos resultados, proponemos un papel para *MtSrlk* en la percepción del estrés ambiental en raíces de *M. truncatula*.

A novel plant LRR receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. In plants, a diverse group of cell-surface receptor-like protein kinase (RLKs), play a fundamental role in sensing external signals to regulate gene expression. Roots explore the soil environment to optimise their growth via complex signalling cascades, mainly analysed in *Arabidopsis*. However, legume roots have significant physiological differences, notably their capacity to establish symbiotic interactions. These major agricultural crops are affected by environmental stresses such as salinity. We report the identification of an LRR-RLK gene, *MtSrlk*, from the legume model *Medicago truncatula* that is rapidly induced by salt stress in roots. RNA interference assays specifically targeting this gene yielded transgenic roots whose growth was unaffected by the presence of salt in the medium. Promoter-*GUS* fusions indicate that this gene is expressed in epidermal root tissues. Two *MtSrlk*-TILLING mutants were identified that showed a similar root phenotype in response to salt stress. Furthermore, early salt-regulated genes are down-regulated in *MtSrlk*-RNAi roots and in those of the two TILLING lines when submitted to salt stress. We propose a role for *MtSrlk* in perception of soil environmental stresses by *M. truncatula* roots.

SIV-4

Respuesta de la simbiosis *Mesorhizobium ciceri*-garbanzo a la sequía.

Fatnassi, N.^{1,2}, Chedly, A.², Bedmar, E.J.¹, y Delgado, M.J.^{1*}

¹Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Profesor Albareda, 1. 18008-Granada, España.

²Laboratoire d'Adaptation des Plantes aux Stress Abiotiques, Centre de Biotechnologie Technopole de Borj Cédria, BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia.*mdelgado@eez.csic.es

En este trabajo, se han estudiado los posibles mecanismos implicados en la respuesta de cuatro variedades de garbanzo a la sequía. Concretamente, se han utilizado dos variedades de Túnez (Beja y Amdoun) denominadas "Kabuli", y dos de la India (ICC4958 y ICC6098) denominadas "Desi". Tras inocular las plantas con *Mesorhizobium ciceri* UPMCa7, estas crecieron en una mezcla de arena/vermiculita, y a las cuatro semanas se dejaron de regar durante 7 y 14 días. Tras 7 días de déficit hídrico, se observó una mayor disminución en el potencial hídrico, actividad fotosintética y biomasa nodular de las variedades "Kabuli" en comparación con las variedades "Desi", siendo Amdoun la más sensible. Tras 14 días de déficit hídrico, además de la nodulación, el peso seco de las plantas disminuyó considerablemente en las cuatro variedades, siendo de nuevo Amdoun la más sensible. Sin embargo, los nódulos de Amdoun mostraron mayor actividad nitrogenasa y contenido en leghemoglobina en respuesta a la sequía en comparación con el efecto observado en otras líneas como es el caso de Beja o ICC6098. Igualmente, los bacteroides aislados de Amdoun mostraron una inducción en la expresión de la oxidasa *cbb₃* tras 7 días de sequía, inducción que no se observó en los bacteroides aislados de las otras tres variedades. Estos resultados sugieren que la sensibilidad de Amdoun a la sequía podría estar asociada con un incremento en la expresión de la oxidasa terminal de los bacteroides y consecuentemente de la capacidad de fijar nitrógeno por los mismos con el objeto de compensar la disminución en biomasa nodular provocada por la sequía.

Response of the *Mesorhizobium ciceri*-chickpea symbiosis to water deficit. In this work, we have tried to identify some physiological and biochemical parameters involved in the variability of four varieties of chickpea (Amdoun, Beja, ICC4958 and ICC6098) response to water deficit. Beja and Amdoun are local lines from Tunisia also named "Kabuli lines", and ICC4958 and ICC6098 from India are also named "Desi lines". Plants were inoculated with *Mesorhizobium ciceri* UPMCa7 and after four weeks growth in sand/vermiculite they were subjected to water deficit for 7 and 14 days. 7 days water deficit produced a significant decrease in plant water potential, photosynthetic activity, and nodule biomass of the "Kabuli" type chickpea lines compared with the decrease observed in the "Desi" type lines, being Amdoun the most sensitive line. Nodulation, and plant dry weight were severely affected in all lines after 14 days water deficit, being Amdoun the most sensitive line. However, nodules from Amdoun showed higher nitrogenase activity and leghemoglobin content in response to drought compared with the effect observed in other lines such as Beja or ICC6098. Expression of the *cbb₃* terminal oxidase was induced after 7 days water deficit in bacteroids of the sensitive line Amdoun, but no induction was observed in bacteroids isolated from the other lines. These results suggest that plant sensitivity to drought may be compensated by an induction of the terminal oxidase of the bacteroids.

Este trabajo se ha subvencionado con los Proyectos AGL2006-13848-CO2-02/AGR concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia, 107PICO312 del Programa CYTED, el proyecto de colaboración con Túnez, A/9780/07 de AEI, y la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación CVI-275.

SIV-5

Fijación de nitrógeno y metabolismo del amonio en plantas de *Medicago sativa*: estrés salino versus estrés hídrico.**Gozálvez, M.*, Lluch, C., y Ocaña, A.***Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Granada, España.
monicagozalvez@ugr.es

El efecto de la salinidad se puede analizar mediante dos componentes: uno osmótico debido a la disminución del potencial hídrico del suelo, y otro iónico por la excesiva concentración de iones que provocan una menor absorción de nutrientes esenciales. Los mecanismos bioquímicos implicados en las respuestas metabólicas de la planta frente al estrés, son objeto de frecuentes controversias, consecuencia de la dificultad de separar los efectos osmóticos de los iónicos específicos. Para conocer la implicación de ambas componentes sobre la actividad nitrogenasa y el metabolismo del amonio nodular se cultivaron plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *S. meliloti* GR4 en ambiente controlado en vermiculita: arena con solución libre de nitrógeno. A los 42, 49, 53 días de edad comenzaron los tratamientos de salinidad y sequía con la adición de NaCl a la solución de riego y la suspensión del riego diario respectivamente. Las plantas se cosecharon a los 63 días. La actividad nitrogenasa fue inhibida en ambos tratamientos. Esta disminución fue acompañada por un incremento en la actividad glutamina sintetasa y glutamato sintasa en plantas con sal, mientras que en las expuestas a estrés hídrico experimentan poca variación en estos parámetros. Se evidencia una respuesta diferenciada del metabolismo del amonio nodular a ambos tipos de estrés, que se acentúa con el tiempo de tratamiento.

Nitrogen fixation and ammonium metabolism in nodules of *M. sativa*: saline stress vs water stress. The salinity effects can be analyzed by two components: the osmotic component due to the decrease of the water potential in the soil solution, and the ionic component provoked by the toxicity of the excessive ion absorption that disrupt the assimilation of other essential nutrients. The biochemical mechanisms implicated in plants metabolic responses against salinity stress are controversial. This is due to the difficulty to separate osmotic and ionic effects. In order to know the implication of both components on the nitrogenase activity and on the nodular ammonium metabolism, plants of *Medicago sativa* var, Aragon, inoculated with *S. meliloti* GR4 were cultivated in a controlled environment, using a mixture of vermiculite/sand as substrate, and daily watered with a nitrogen free mineral solution. Salinity and drought treatments started 42, 49 and 53 days after sowing by adding NaCl to the nutrient solution and the suspension of the daily irrigation, respectively. Plants were harvested 63 days after sowing. Nitrogenase activity was significantly inhibited by both treatments. This decline was accompanied by consistent increases of GOGAT and GS activities in plants under salinity, meanwhile in plants under drought stress both activities did not show significant changes. The results show a different response of ammonium metabolism to both types of stress, and the difference increases with time.

Este trabajo ha sido financiado con cargo al proyecto BOS2002-04182-C02-02 y el PAI de la Junta de Andalucía (AGR-139)

SIV-6

Implicación de la trehalosa y trehalasa en la adaptación al estrés salino en nódulos de leguminosas.

López, M.*, Iribarne, C., Palma, F., Herrera-Cervera, J.A., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España. *mlgomez@ugr.es

La trehalosa es un disacárido que se ha detectado en una amplia variedad de organismos desempeñando un papel como protector frente a estreses abióticos. En plantas superiores, la trehalosa está presente en bajas concentraciones, aunque la actividad trehalasa, responsable del catabolismo de la trehalosa, se encuentra presente en la mayoría de ellas. Las plantas pueden entrar en contacto con la trehalosa a través de fuentes exógenas, como en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde el rhizobio tiene la capacidad para producir este disacárido.

La expresión del gen de la trehalasa en plantas de *M. truncatula* (*MTTRE1*) está inducida en nódulos en comparación con hojas y raíces, lo que indica una regulación transcripcional de esta enzima en presencia del microsimbionte. En condiciones de estrés salino, la actividad trehalasa se inhibe a nivel transcripcional, reduciéndose los niveles de transcritos de *MTTRE1* y permitiendo la acumulación de trehalosa, lo que apoya el posible papel de este disacárido como osmoprotector frente al estrés salino. Sin embargo, la concentración de trehalosa detectada en nódulos de *M. truncatula* fue demasiado baja como para contribuir eficientemente a la osmorregulación. La presencia de trehalasa en plantas de *Phaseolus vulgaris* en diferentes órganos y etapas de desarrollo, está en consonancia con el patrón de expresión de esta enzima obtenido en *M. truncatula*, lo que indica que la expresión de la trehalasa se encuentra inducida en nódulos de ambas especies por el microsimbionte.

Trehalose and trehalase implication in the adaptation to salinity in nodules of legumes. Trehalose disaccharide has been found in a wide variety of organisms playing an important role as an abiotic stress protectant. In higher vascular plants, trehalose is found in very low amounts although trehalase activity, involved in trehalose catabolism, is present in most of them. Plants may come into contact with trehalose from exogenous sources, such as in *Rhizobium*-legume symbiosis in which the rhizobia have the capacity to produce trehalose.

Trehalase gene expression (*MTTRE1*) is induced in nodules as compared with leaves and roots in *M. truncatula* plants, indicating a transcriptional regulation of trehalase in the presence of the microsymbiont. Under salt stress conditions, trehalase activity is down-regulated at transcriptional level, reducing the *MTTRE1* transcripts and allowing trehalose accumulation, which supports the possible role of this disaccharide as an osmoprotectant against salinity stress. However, the trehalose concentration detected in nodules of *M. truncatula* was too low to contribute efficiently to osmorregulation. Trehalase protein occurrence in different organs and at different developmental stages of *Phaseolus vulgaris* plants is in accordance with trehalase gene expression pattern obtained in *M. truncatula*, which indicate trehalase induction in nodules by the microsymbiont in both species.

Este trabajo ha sido realizado con financiación del proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología ref. BOS2002-04182-C02-02 y por el PAI de la Junta de Andalucía (Grupo AGR-139).

SIV-7

Efecto del estrés abiótico y del envejecimiento sobre el metabolismo de ascorbato y tioles en nódulos de judía.

Loscos, J.*, Matamoros, M.A., y Becana, M.

Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo. 202, 50080 Zaragoza. *jorgeloscos@eead.csic.es

El ascorbato y el glutatión son importantes antioxidantes y tampones redox celulares en plantas, pero también desempeñan funciones relacionadas con el crecimiento, desarrollo y respuesta a estreses. En este trabajo se estudió el efecto del estrés abiótico y del envejecimiento en el metabolismo de ascorbato y tioles en nódulos de judía (*Phaseolus vulgaris*). Se analizó la expresión de cinco genes de la ruta principal de biosíntesis de ascorbato en nódulos sometidos a estrés y se encontraron evidencias de que la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa está regulada postranscripcionalmente. Además, la enzima γ -glutamylcisteína sintetasa se encuentra regulada de forma traduccional. En nódulos tratados con ácido jasmónico, la actividad deshidroascorbato reductasa fue inhibida postraduccionalmente, la ascorbato oxidasa se activó transcripcionalmente y el contenido de deshidroascorbato aumentó moderadamente. También se determinaron los contenidos de ascorbato y homoglutatión y la actividad del ciclo ascorbato-glutatión en dos tipos de nódulos con distinto grado de senescencia y de estrés oxidativo. En el primero de ellos, el contenido de ascorbato disminuyó, pero el homoglutatión y las actividades antioxidantes permanecieron constantes, mientras que en el segundo los contenidos de ascorbato y homoglutatión, sus estados de oxidación y las actividades enzimáticas disminuyeron significativamente. La coexistencia en la misma planta de nódulos con diferentes grados de senescencia indica que ésta se controla, al menos en parte, por factores endógenos, siendo el ascorbato uno de los más importantes.

Effect of abiotic stress and aging on ascorbate and thiol metabolism in common bean nodules. Ascorbate and glutathione are major antioxidants and redox buffers in plant cells but also play key functions in growth, development, and stress responses. We have studied the effect of abiotic stress and natural senescence on ascorbate and thiols metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules. The expression of five genes of the major ascorbate biosynthetic pathway was analyzed and evidence was found that the enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is post-transcriptionally regulated. Also, in nodules under stress conditions, γ -glutamylcysteine synthetase was translationally regulated. In nodules exposed to jasmonic acid, dehydroascorbate reductase activity was post-translationally suppressed, ascorbate oxidase showed transcriptional upregulation, and dehydroascorbate content increased moderately. Additionally, we determined ascorbate, homogluthathione, and ascorbate-gluthathione pathway enzyme activities in two senescing stages of nodules undergoing oxidative stress. We found that in the first stage ascorbate decreased and homogluthathione and antioxidant activities remained fairly constant, whereas in the second stage ascorbate and homogluthathione, their redox states, and their associated enzyme activities significantly decreased. The coexistence in the same plants of nodules with different senescence stages indicates that the life span of nodules is in part controlled by endogenous factors, and points to ascorbate as one of the key players.

SIV-8

A assinatura isotópica do azoto nas bactérias diazotróficas de vida livre.

Machado, Z.¹, Cruz, C.^{2*}, e Martins-Loução, M.A.²

¹Universidade De São Paulo, Instituto De Ciências Biomédicas II, Laboratório De Fisiologia De Microorganismos, Cep 05508-900, São Paulo SP Brasil. ²Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Centro de Ecologia e Biologia Vegetal (CEBV), Campo Grande, Bloco C4, Piso 1, 1749-016 Lisboa, Portugal. *ccruz@fc.ul.pt

Tem sido amplamente divulgado que os organismos diazotróficos não discriminam os isótopos de azoto, uma noção que atribui características peculiares à nitrogenase. Esta ideia foi construída com base nos estudos sobre as simbioses entre plantas e *Rhizobium* ou *Frankia*. No entanto os poucos dados disponíveis sobre o assunto indicam que este resultado poderá não ser válido para as bactérias diazotróficas de vida livre.

Este trabalho tem como objectivo estudar a discriminação isotópica do azoto em cinco géneros de bactérias diazotróficas de vida livre (*Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*) e a relação com os respectivos co-factores operacionais (Fe, Mb, Va). Os resultados serão interpretados por forma a averiguar e quantificar a importância destas bactérias na mobilização de azoto pelas plantas a elas associadas (cana de açúcar).

¹⁵N signature of free-living diazotrophic bacteria. It has been widely published that diazotrophy does not discriminate between N isotopes, a notion that attributes peculiar isotopic behaviour to nitrogenase. This idea has its basis on work done on rhizobial and *Frankia* symbiosis with vascular plants.

However the few data available on the subject indicate that the free-living diazotrophic bacteria do not fit the picture of zero discrimination derived from the literature on vascular-plant symbiosis.

In this work five free-living diazotrophic bacterial genera isolated from the sugar-cane rhizosphere were analysed: *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Klebsiella* and *Enterobacter*. The relation of the ¹⁵N discrimination at the nitrogenase fixation step with the type of operational nitrogenase and its metal co-factor (molybdenum, vanadate and iron) was investigated. Results will be interpreted in order to assess the importance of the contribution of free-living diazotrophic bacteria to plant nitrogen content.

SIV-9

Efecto del ácido salicílico exógeno en los sistemas antioxidantes de *Medicago sativa* en condiciones de estrés salino.**Moreno Linares, E.J., Palma, F., Barranco, J.R., Iribarne, C., y Lluch, C.****Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Granada, España.
clluch@ugr.es

La alfalfa (*Medicago sativa*) es un cultivo forrajero altamente resistente a sequía y frío y moderadamente tolerante a salinidad. Un efecto secundario de la deshidratación y del estrés salino es el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los mecanismos de detoxificación de radicales libres así como los cambios inducidos por la acumulación de ERO en respuesta al estrés salino se han estudiado con anterioridad. Se conoce la implicación del ácido salicílico (AS) como molécula-señal en la inducción de mecanismos de defensa en plantas. Estudios previos mostraron al AS como un componente esencial en la resistencia de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos. En este trabajo se comprueba el efecto del ácido salicílico exógeno (0.1 y 0.5 mM AS) en plantas de alfalfa en condiciones de estrés salino (100 y 200 mM NaCl).

Los resultados obtenidos indican un aumento de las actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) y guaiacol peroxidasa (GPX) en las plantas crecidas en estrés salino. El pretratamiento con AS favoreció el descenso en estas actividades enzimáticas. Además también provocó la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se puede asumir que a concentraciones bajas (0.1-0.5 mM AS), el AS participaría como un moderador del estrés, presentando un efecto en el estatus oxidativo de la planta similar al de procesos de aclimatación al estrés.

Effect of exogenous salicylic acid on antioxidant mechanisms of *Medicago sativa* in saline stress conditions. Alfalfa (*Medicago sativa*) forage yield is highly resistant to drought and frost and moderately tolerant to salinity. A secondary effect of dehydration and salt stress is the increase of reactive oxygen species (ROS). Free-radical detoxification mechanisms and changes induced by the accumulation of ROS in response to the NaCl stress were studied. Salicylic acid (SA) has long been known as a signal molecule in the induction of defense mechanisms in plants. Previous studies have shown that salicylic acid (SA) is an essential component of the plant resistance to biotic and abiotic stress. The objective of this study was to investigate the effects of SA concentration (0.1 mM and 0.5 mM SA) in Alfalfa (*Medicago sativa*) under salt stress (100 mM and 200 mM NaCl).

An increase in ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR) and guaiacol peroxidase (GPX) activity is observed under salt stress. The pre-treatment with SA caused decrease in these enzyme activities. The treatment with SA also caused the accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2). It can be assumed that low concentrations (0.1–0.5 mM SA) acts as a stress alleviator, having an effect on the oxidative status of the plant similar to that of stress acclimating processes.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyecto AGL2006-01279/AGR y al PAI de la Junta de Andalucía Grupo AGR-139.

SIV-10

Mejora de la respuesta a salinidad en la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* por la aplicación exógena de ABA.

Palma, F.*, Tejera, N.A., Iribarne, C., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Granada, España.
*fpalma@ugr.es

La fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas es un proceso sensible a diferentes factores ambientales como sequía y salinidad, en consecuencia se afecta negativamente el crecimiento, metabolismo nodular y rendimiento del cultivo. El nivel endógeno de la hormona ácido abscísico (ABA) incrementa en tejidos vegetales como resultado del estrés osmótico, teniendo esta molécula un papel central en la respuesta frente a sequía, salinidad y frío. Se ha propuesto que la aplicación exógena de ABA provoca un incremento significativo en las actividades enzimáticas antioxidantes.

En este estudio, se investiga el efecto de los tratamientos de ABA (1, 10 μ M) y cloruro sódico (200 mM) en el crecimiento vegetal, parámetros de fijación de nitrógeno, sistemas de defensa antioxidante y peroxidación de lípidos en nódulos de *M. sativa*. Los tratamientos de NaCl y ABA disminuyeron el peso seco de planta y la actividad nitrogenasa respecto a plantas control. El contenido de malonaldehído en nódulos incrementó con la salinidad, en cambio disminuyó con el tratamiento de ABA. La aplicación exógena de ABA aumentó las actividades enzimáticas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, lipoxigenasa y las del ciclo ascorbato-glutation. Estos datos indican que el tratamiento hormonal induce los mecanismos de defensa antioxidante, lo que mejora la respuesta a la salinidad de *M. sativa*.

Improvement of the response to salinity in the *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis by exogenous application of ABA. The symbiotic nitrogen fixation in legume nodules has shown to high sensitive by different environmental factors such as drought and salinity, which adversely affect growth, metabolism and yields. The level of the plant hormone abscisic acid (ABA) increase as a result of osmotic stress, playing a central role in the plant response to drought, salinity and cold stresses. Exogenous application of ABA has been reported to significantly increase in the activities of enzymatic antioxidants.

In the present study, is investigated the effects of ABA treatment (1, 10 μ M) and sodium chloride (200 mM) on plant growth, nitrogen fixation parameters, antioxidant defense systems and lipid peroxidation in nodule of *M. sativa*. NaCl and ABA treatments decreased plant dry weight and nitrogenase activity as compared with control plants. Salinity increased the malondialdehyde content in nodules whereas it decreased with the ABA treatment. Exogenous application of ABA caused significant increase enzyme activities superoxide dismutase, catalase, peroxidase, lipoxigenase and those of the ascorbate-glutathione cycle. These results indicate that the hormonal treatment induce antioxidant defense mechanisms, which improve the response of *M. sativa* to salinity.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyecto AGL2006-01279/AGR y al PAI de la Junta de Andalucía, grupo AGR-139.

SIV-11

Glicoproteínas dependientes de boro en el desarrollo de simbiosomas y organogénesis de nódulos. Un modelo para un papel común del boro en el desarrollo vegetal y animal.**Reguera, M., Redondo-Nieto, M., Bolaños, L., y Bonilla, I.****Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España. *ildefonso.bonilla@uam.es*

En la simbiosis rizobio-leguminosa, la deficiencia de B altera procesos como la infección e invasión de células y nódulos, así como el desarrollo de simbiosomas, todos ellos relacionados con funciones de las membranas celulares (tráfico de vesículas, secreción, o interacciones entre superficies celulares). El uso de anti-rhamnogalacturonano II (anti-RGII) y técnicas inmunológicas, nos ha permitido describir glicoproteínas de membrana (RGII-glicoproteínas) reguladas durante el desarrollo de nódulos de *Pisum sativum*, que no son detectadas por este anticuerpo en nódulos deficientes de B. Las RGII-glicoproteínas aparecen relacionadas con procesos de desarrollo que implican una profusa síntesis de membrana, como maduración de simbiosomas o crecimiento de las células, ambos afectados negativamente por la deficiencia de B. Sugerimos que el B está estabilizando componentes de la membrana glicocálix y promoviendo la interacción entre glucoconjugados que son importantes durante el establecimiento de la simbiosis y durante el desarrollo de nódulos. Además, postulamos que, en general, el B está desempeñando un papel similar durante la embriogénesis vegetal o animal y el desarrollo.

Boron dependent membrane glycoproteins in symbiosome development and nodule organogenesis. A model for a common role of boron in plant and animal development. Several symbiotic events including rhizobial infection, nodule cell invasion and symbiosome development that involve membrane related functions (i.e. vesicle targeting, secretion, or cell surface interactions) are affected by boron (B) deficiency. Using anti-rhamnogalacturonan II (anti-RGII) antiserum and immunological techniques, we have described membrane glycoproteins (RGII-glycoproteins) developmentally regulated in *Pisum sativum* nodules, which are not detected by the antibody in B-deficient nodules. RGII-glycoproteins appeared related with development processes involving extensive membrane synthesis, like symbiosome maturation or cell growth, both of them negatively affected by B deficiency. We suggest that B is both stabilizing components of the membrane glycocalyx and promoting interactions between cell surfaces glycoconjugates that are important during the establishment of the symbiosis and during nodule development. Moreover, we hypothesize that B is playing a similar role during plant or animal embryogenesis and development.

Financiado por Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-01)

SIV-12

Respuestas antioxidantes inducidas por ácido salicílico y NaCl en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.

Tejera, N.A.*, Palma, F., López, M., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Granada, España.

*natejera@ugr.es

La salinidad es un factor limitante de la producción agrícola y en esas condiciones las plantas se enfrentan al estrés osmótico provocado por el bajo potencial osmótico del suelo y a la toxicidad iónica debida a la acumulación de iones en el interior de los tejidos vegetales, incluso se acelera la senescencia y por ello el aumento de especies reactivas de oxígeno. Se ha sugerido que el ácido salicílico (AS) actúa como molécula señal endógena responsable de la inducción de tolerancia a estrés abiótico en plantas, ya que los pre-tratamientos con AS pueden favorecer la activación de respuestas antioxidantes en plantas. Un modo de acción del AS parece ser a través de la inhibición de las actividades catalasa y ascorbato peroxidasa, así como la generación de H_2O_2 que formaría parte de la cascada de señales que conducen a la protección frente al estrés abiótico.

En este trabajo se evalúa el efecto del AS (0.1, 0.5 mM) y NaCl (100, 150 mM) en crecimiento, fijación de nitrógeno, acumulación de metabolitos y sistemas enzimáticos antioxidantes en judía (*P. vulgaris*, cv. F-15). Los resultados muestran una reducción en los parámetros de crecimiento y fijación de nitrógeno con los tratamientos de AS y NaCl por separado. En condiciones de estrés salino el pre-tratamiento con AS incrementó el crecimiento de las plantas, pero no la actividad nitrogenasa. La aplicación de AS disminuyó la mayoría de las actividades antioxidantes ensayadas, excepto GR y DHAR, lo cual no se reflejó en el contenido de H_2O_2 en nódulos.

Antioxidant responses induced by salicylic acid and NaCl in the *P. vulgaris*-*R. tropici* symbiosis. Salinity is one the main environmental factors limiting crop production. Under salt stress, plants have to cope with water stress imposed by the low external water potential, and with ion toxicity, due to its accumulation inside the plant. In last few years, several researchers have suggested that salicylic acid (SA) acts as an endogenous signal molecule responsible for inducing abiotic stress tolerance in plants. It has been suggested that SA pre-treatments induce a faster and/or greater activation of defense responses in plants, enhancing the reactive oxygen species (ROS) production. One mode of SA action appears to be the catalase and ascorbate peroxidase inhibition. Besides the ROS generation (H_2O_2), has also been reported as part of a signals cascade leading to protection from the abiotic stresses.

The effect of salicylic acid (0.1, 0.5 mM) and NaCl (100, 150 mM) on common bean (*P. vulgaris*, cv. F-15) growth, nitrogen fixation, metabolites accumulation and enzymatic antioxidant defenses was studied. In general, results revealed that both SA and NaCl separately decrease plant growth and nitrogen fixation parameters. The SA pre-treatment before NaCl stress increased plant growth, but not the nitrogenase activity. In common bean the SA application decreased most of antioxidant activities assayed, except GS and DHAR, which was not showed in H_2O_2 content in nodules.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyecto AGL2006-01279/AGR y al PAI de la Junta de Andalucía, grupo AGR-139.

SESSÃO V / SESIÓN V

Genética e genómica

Genética y genómica

CTV-1

RNAs no codificantes en los endosimbiontes diazotróficos: identificación y caracterización funcional.

Jiménez-Zurdo J.I.^{1*}, Torres-Quesada, O.¹, Del Val, C.², Rivas, E.³, Oruezabal, R.⁴, Rivilla, R.⁴, y Toro, N.¹

¹Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España, ²Department of Computer Science and Artificial Intelligence, ETS Ingenieros Informáticos, Granada, España, ³Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm Research Campus, Ashburn, Virginia, USA, ⁴Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. *jjz@eez.csic.es

La investigación post-genómica ha revelado una imprevista abundancia y diversidad de transcritos que no se traducen a proteína pero que sin embargo tienen importantes funciones reguladoras tanto en organismos procariotas como eucariotas. En bacterias se trata mayoritariamente de moléculas de pequeño tamaño (50-400 nt, sRNAs) implicadas en la regulación génica post-transcripcional (riboregulación) a través de la interacción con determinadas proteínas (ej. reguladores transcripcionales o traduccionales) o, más comúnmente, de apareamientos con secuencias complementarias localizadas en regiones 5'-UTR de mRNAs codificados en *trans*. La riboregulación subyace a procesos celulares tan diversos como la adaptación a estreses abióticos, el quórum sensing o la virulencia.

Recientemente nosotros abordamos la identificación de sRNAs en el genoma del endosimbionte diazotrófico *Sinorhizobium meliloti* mediante una estrategia de genómica comparada *in silico* unida a la verificación de las predicciones bioinformáticas mediante experimentos de Northern y mapeo de los extremos 3' y 5' de los transcritos detectados. Esta aproximación resultó en la identificación de ocho sRNAs, siete de los cuales presentan expresión diferencial en vida libre y endosimbiosis.

En la conferencia se hará un repaso de nuestros conocimientos actuales sobre la biología de los sRNAs bacterianos y se presentarán los progresos más recientes en la caracterización funcional de los sRNAs identificados en *S. meliloti*.

Non-coding RNAs in nitrogen-fixing endosymbiotic bacteria: identification and functional characterization. Post-genomic research has revealed an unsuspected abundance and diversity of novel small-untranslated RNA molecules with key regulatory roles in both prokaryotic and eukaryotic organisms. In bacteria most of these molecules are small transcripts (50-400 nt, sRNAs) involved in post-transcriptional regulation of gene expression (riboregulation) through the interaction with specific proteins or, most often, through basepairing with complementary sequence stretches, located in 5'-UTR regions of *trans*-encoded target mRNAs. Riboregulation underlies the control of a variety of cellular processes, such adaptation to abiotic stresses, quorum sensing or virulence.

We have recently conducted a genome-wide computational analysis of the nitrogen-fixing endosymbiotic bacteria *S. meliloti* for the prediction of sRNA genes. This strategy coupled to Northern experiments and mapping of the detected transcripts resulted in the identification of eight sRNAs, seven of which are differentially expressed in free living and symbiotic conditions.

The conference will be an overview of our current knowledge on the biology of bacterial sRNAs. Recent progress on the functional characterization of the *S. meliloti* sRNAs will be also presented.

CTV-2

Influencia del estrés abiótico en la interacción entre las plantas y los microorganismos beneficiosos.

Manyani, H.*

Universidad San Pablo CEU. 28668 Boadilla del Monte. Madrid. hamidmn@us.es*

La rizosfera alberga una gran y diversa comunidad de microorganismos procariotas y eucariotas que interaccionan y compiten entre sí y con la raíz de la planta. De esta forma, la actividad de un determinado miembro de la comunidad afectará al crecimiento y la fisiología de los otros, y como consecuencia, a las propiedades físicas y químicas del suelo (Rainey, 1999). Sin embargo, los factores abióticos (salinidad y acidez del suelo) pueden alterar diversos parámetros críticos tanto de las plantas como de los microorganismos. Estos cambios pueden comprometer la eficacia del diálogo molecular entre ambos, alterándose consecuentemente el desarrollo de la interacción planta bacteria. Por esta razón, constituiría una gran ventaja el hecho de poder seleccionar y utilizar bacterias tolerantes a condiciones abióticas extremas como inoculantes comerciales, cuyos parámetros claves en el proceso de interacción con su hospedador no se viesen fuertemente afectados por este estrés abiótico. De esta forma, se podrían optimizar, en la medida de lo posible, aquellas interacciones planta-microorganismo influidas negativamente por el entorno salino o ácido en el que se desarrollan, llegando incluso a anular los efectos negativos inducidos por el estrés abiótico.

Effects of abiotic stress on beneficial plant-microbe interactions. The rhizosphere harbours a large and diverse community of prokaryotic and eukaryotic microorganisms that interact and compete with each other and with the plant root. Activity of any member of this community affects the growth and the physiology of the others, and also affects the physical and chemical properties of the soil (Rainey 1999). However, abiotic factors (salinity and acidity of soils) can modify critical parameters of plants and microorganisms. These changes may lead to marked differences in the molecular dialogue between symbionts, causing enhancement or reduction of plant-microbe interaction effectiveness. Therefore, optimal performance of microorganisms could be achieved upon preselection of both symbiotic partners adapted to the target environment. The use of inoculants well adapted to abiotic stress will allow either reduction or neutralization of negative effects caused by abiotic stress on plant-microbe interactions.

SV-1

Homeostasis de níquel en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791.**Brito, B.¹, Prieto, R.I.¹, Cabrera, E.¹, Hidalgo, A.¹, Imperial, J.^{1,2}, Palacios, J.M.¹, y Ruiz-Argüeso, T.^{1*}**

¹Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biotecnología, ETS Ingenieros Agrónomos, ²Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (C.B.G.P.), Universidad Politécnica de Madrid (U.P.M.), Spain. *ruizargueso@upm.es

En procariotas, el níquel es un metal de transición esencial que participa en la estructura de enzimas implicadas en procesos biológicos como la hidrólisis de urea, la oxidación o evolución de hidrógeno, o la detoxificación de radicales superóxido. El transporte de este metal constituye un reto en procariotas, ya que a pesar de su importancia, un incremento excesivo de la concentración de níquel en el interior celular puede ser tóxico. Existen dos tipos de sistemas de transporte de alta afinidad: los sistemas de transporte de tipo ABC (ATP-binding cassette) y las permeasas de la familia de transportadores níquel/cobalto (NiCoTs), cuyos representantes más estudiados son los sistemas Nik de *Escherichia coli* y HoxN de *Ralstonia eutropha* (recientemente *Cupriavidus necator*). Además, existen sistemas de detoxificación de níquel como el sistema RcnRA de *E. coli*, hasta la fecha el mejor caracterizado. En este trabajo se presentan evidencias de la caracterización de las proteínas HupE y HupE2 como una nueva clase de transportadores NiCoTs en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 implicados en la oxidación de hidrógeno en condiciones simbióticas, así como la identificación de dos dominios ricos en histidinas esenciales para su función. Además se ha identificado un sistema *rcnRA* en esta bacteria y se discutirá su relación con los transportadores HupE y el sistema de oxidación de hidrógeno en condiciones de vida libre y simbiosis.

Nickel homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. In prokaryotes, nickel is an essential element participating in the structure of enzymes involved in cellular processes like hydrolysis of urea, oxidation of molecular hydrogen or detoxification of superoxide anion radicals. Nickel transport is a challenge for microorganisms since, although essential, high levels of this metal inside the cell are toxic. For this reason, bacteria have developed high affinity nickel transporters as well as nickel-specific detoxification systems. Two types of nickel transporters have been identified: ABC-type transport systems (ATP-binding cassette) and nickel/cobalt transporters (NiCoTs), whose best studied members are the Nik system of *E. coli* and the HoxN permease of *R. eutropha*, respectively. Among detoxification systems, the RcnRA system from *E. coli* is the best known. In this work we report the characterization of HupE and HupE2 as a new class of nickel transporters in *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 involved in hydrogen oxidation in symbiosis, and the identification of two histidine-rich domains essential for HupE functionality. In addition, we identified an RcnRA system in this bacterium and we provide evidence about its relation with HupE transporters and hydrogen oxidation in symbiosis.

SV-2

Descripción de una línea mutagenizada de garbanzos (*Cicer arietinum*) caracterizada fenotípicamente como bajo-nodulante.

Chamber Perez, M.A.* , Aguado Puig, A., Daza Ortega, A., y Pajuelo, E.

CIFA "Las Torres", Dpt.Agricultura Ecológica, IFAPA, Consejería de Innovación, Ciencias y Empresas. Alcala del Rio, 41200, Sevilla, España.

*mangel.chamber@juntadeandalucia.es

Mediante mutagénesis con EMS se obtuvo una isolínea de garbanzos de la variedad F83-46C alteradas en sus caracteres simbióticos. Fenotípicamente, esta línea demostró poseer una capacidad de nodular y producir materia seca significativamente inferior al del parental. Cruzamientos entre ambos demostraron que el carácter no-nodulante era dominante en la F1, y en la F2 segregaban de acuerdo con un patrón 3:1 (mutante: parental). Estudios microscópicos de las primeras etapas del desarrollo nodular, utilizando una raza de *M. ciceri* portador del gen *lacZ*, mostraron un elevado número de abortos en el progreso del hilo de infección, si bien los nódulos eran normales. La influencia de ciertas hormonas y productos que afectan a la nodulación, tales como auxinas e inhibidores del transporte de éstas, no mejoraron la nodulación, salvo la plata y el ACC, sugiriendo una posible relación con la síntesis del etileno. Otras características como la germinación del polen, demostraron hallarse también afectadas. Actualmente, se estudia la endomicorrización espontánea en campo, y se buscan SNP entre diversos genes (NIN, Enod 8, Enod 2 Enod 40, MTN-6, SYMRK-2, NORK, Calmodulinas, etc)

A new low-nodulating isoline mutant of chickpeas (*Cicer arietinum*): Genetic characterization of its progeny and detection of SNP's in several genes related to this mutation. An EMS mutagenesis program has been developed on chickpea to isolate symbiotic mutants. A non-nodulating mutant of chickpea has been analysed at the phenotypical and microscopical levels. The mutant plants showed few nodules when inoculated with several *Mesorhizobium ciceri* strains. All F1 plants from crosses of the mutant plant with the parental showed a dominant mutation. F2 progeny of these crosses segregated 3:1 (mutant: wild type plants). Using a *M. strain* carrying a *lacZ* reporter gene showed some rhizobial infections in the mutant plant (about one tenth compared to wild type), they do not form infection threads inside the root hair. The nodule structure is apparently normal, pink and functional. Addition of several phytohormones (auxins, auxin transport inhibitors, cytokinins, ethylene precursors and inhibitors, etc.) failed in restoring the mutant phenotype. However, a significant improvement in nodulation and shoots dry weight can be observed in the presence of Ag⁺ ions and ACC, suggesting a possible role of ethylene in the mutation. Pollen germination has been affected in the mutant, but endomycorrhizal infections were similar to the parent plant.. Works are underway to detect SNP's by DGGE in nodulation genes (*Nin*, *Enod2*, *Enod 8*, *Enod40*, MTN6, SYMRK, Ca spiking, NORK, etc.), among those already described in the two model legumes.

SV-3

Estudio de los genes *nod* de *Ensifer fredii* HH103 implicados en la secreción de los factores de nodulación.

García Trigueros, C.^{1*}, Dardanelli, M.S.², Manyani, H.¹, y Megías, M.¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia; ² Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. *triguero@us.es

La nodulación eficaz de las leguminosas por los rizobios es el resultado de una serie de complejas interacciones planta-microorganismo. La planta secreta a la rizosfera numerosos compuestos entre los que se encuentran los flavonoides, los cuales actúan como inductores de la expresión de los genes de nodulación (genes *nod*) en rizobios compatibles. La expresión de los genes *nod* determina la síntesis y secreción de moléculas lipoquitooligosacarídicas, denominadas factores Nod, que constituyen la señal bacteriana en el proceso simbiótico. Los factores Nod son secretados al medio extracelular mediante el sistema de secreción formado por las proteínas NodIJ. En este estudio, examinamos la producción y secreción de dichos factores Nod en mutantes no polares en los genes *nodIJ* de *Ensifer fredii* HH103. Así mismo se ha determinado la implicación simbiótica de la ausencia de dichos genes. Los resultados obtenidos muestran que ambos genes *nodI* y *nodJ* juegan un importante papel en la eficacia de la secreción de los factores Nod y en el establecimiento de la simbiosis entre *E. fredii* HH103 *Glycine max*.

Genetic and symbiotic analysis of *Ensifer fredii* HH103 *nod* genes involved in Nod factor secretion. Successful legume nodulation by rhizobia results from a series of complex plant-microbe interactions. Plant flavonoid compounds exuded from roots can induce the expression of nodulation (*nod*) genes in compatible rhizobia. *nod* gene expression lead to the synthesis and secretion of lipochitooligosaccharide molecules, called Nod factors. These molecules are secreted to the extracellular medium through a type I secretion system consisting of NodIJ proteins. In this study, we have examined Nod factors production and secretion in non polar *nodI* and *nodJ* mutants of *Ensifer fredii* HH103. We have also determined the effect of *nodI* and *nodJ* absence on nodulation. The results obtained in this work show that *nodI* and *nodJ* play an important role in the efficiency of Nod factor secretion and the establishment of effective symbiosis between *E. fredii* HH103 and *G. max*.

SV-4

Estudio del papel del gen *nodD1* de *Rhizobium tropici* CIAT899 en el establecimiento de la simbiosis.

González-Luque, J.M.^{1*}, Espuny, M.R.², Guasch-Vidal, B.², Camacho, M.³, Albareda, M.³, Rodríguez-Navarro, D.N.³, Estevez, J.¹, Sousa, C.¹, Megías, M.¹, y Manyani, H.¹

¹Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia ²Dpto. de Microbiología, Facultad de Biología; Universidad de Sevilla. ³CIFA Las Torres y Tomejil, Alcalá del Río.* hamidmn@us.es

Las leguminosas se caracterizan por su capacidad para establecer simbiosis con bacterias conocidas genéricamente como rizobios. El establecimiento de dicha relación simbiótica es un proceso complejo que requiere la expresión coordinada tanto de los genes de la planta como de la bacteria. Como respuesta a compuestos excretados por la planta, se induce en la bacteria la síntesis y transporte de los factores Nod. La presencia de dichas moléculas desencadena una serie de cambios en las raíces de la planta, imprescindibles para que el proceso simbiótico se desarrolle con éxito. *R. tropici* CIAT899 dispone de al menos de 4 copias del gen regulador *nodD*. En este trabajo se hemos estudiado el papel del gen *nodD1* en la síntesis de los factores *nod* y en el establecimiento de la simbiosis. Los resultados obtenidos demostraron que la mutación del gen *nodD1* produce la pérdida de la capacidad de síntesis de los LCO. Sin embargo, este mutante fue capaz de nodular, aunque sea de una forma menos eficaz, tanto plantas de *Phaseolus vulgaris* como plantas de *Leucaena leucocephala*. Proyecto Excelencia. Junta de Andalucía.

Role of *nodD1* gene of *Rhizobium tropici* CIAT899 in symbiosis establishment.

Grain legumes plants are able to establish symbiotic relationships with a group of soil microorganisms called collectively rhizobia. Rhizobia-legume symbiotic interaction is a complex process that requires a sequence of highly regulated events involving the coordinated expression of both plant and bacterial genes. Nod factors are produced and secreted by rhizobia in response to plant exudates. Nod factors perception by the plant induce several morphological and physiological changes in the roots, which are essential for successful nodulation. *R. tropici* CIAT899 is a bean symbiont with at least four copies of *nodD* regulatory gene. In this work we have performed *nodD1* gene mutagenesis to determine its role on Nod factor production and symbiosis establishment. *nodD1* mutation totally abolished Nod factors production. However, *nodD1* mutant was able to nodulate *Phaseolus vulgaris* and *Leucaena leucocephala* plants, though less efficiently than parental strain.

SV-5

Estudio comparativo de mutantes de *Rhizobium tropici* CIAT899 afectados en la síntesis de los factores de nodulación en condiciones de estrés salino.

Guasch-Vidal, B.¹, Rodríguez-Rosado, A.I., Pérez-Montaña, F.¹, Cubo, M.T.¹, Camacho, M.⁴, Albareda, M.⁴, López-Baena, F.J.¹, Manyani, H.², Ollero, F.J.¹, van Brussel, A.A.N.³, Megías, M.², Bellogín, R.A.^{1*}, y Espuny, M.R.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología y ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ³Universidad de Leiden, The Netherlands. ⁴I.F.A.P.A. Centro "Las Torres-Tomejil", Alcalá del Río, Sevilla. *bellogin@us.es

Los rizobios responden a los flavonoides exudados por las raíces de las leguminosas secretando factores Nod (LCOs) que inician la simbiosis con la planta. El establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno efectiva se ve afectado por condiciones ambientales adversas como la salinidad o acidez del suelo. Estudios previos han demostrado que cuando *Rhizobium tropici* CIAT899 es cultivada bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5) o salino (NaCl 300 mM) se detectan cambios cualitativos y cuantitativos en la biosíntesis y secreción de sus LCOs y que, además, esta secreción se hace independiente del flavonoide apigenina. Para encontrar genes implicados en la regulación de la síntesis de los LCOs inducida por estrés salino, se mutagenizó al azar la estirpe CIAT899 (pMP240) empleando el transposón Tn5-Mob. Se han seleccionado cuatro clones que presentan, bajo estrés salino y ausencia de apigenina, una disminución de actividad β -galactosidasa frente a la estirpe silvestre. En este trabajo se analizan sus perfiles de LCOs en condiciones de estrés salino y ácido. Se analiza la inserción del transposón en los mutantes mediante hibridación con una sonda de Tn5 y, mediante ensayos de nodulación en plantas de judía, las repercusiones de la mutación en el comportamiento simbiótico de los mutantes.

Comparative study of *Rhizobium tropici* CIAT899 mutant strains affected in Nod factor synthesis under salt stress conditions. Rhizobia respond to flavonoids exuded by legume plant roots secreting Nod factors (LCOs) that initiate the symbiosis with the host plant. An effective nitrogen fixing symbiosis is affected by abiotic stresses such as soil salinity or acidity. Previous studies have shown that when *Rhizobium tropici* CIAT899 is cultured under acidic (pH 4,5) or saline (300mM NaCl) stress conditions, qualitative and quantitative changes in the synthesis and secretion of its LCOs were detected and, in addition, this secretion is independent of the flavonoid apigenin. Random mutagenesis on CIAT899 (pMP240) was carried out using the Tn5-Mob transposon in order to find genes involved in the regulation of the biosynthesis of LCOs under salt stress conditions. Thus, four clones showed a decreased β -galactosidase activity when grown under salt stress conditions without apigenin when compared with the wild-type strain. In this work we analyse their LCO profiles in acid and saline conditions. The transposon insertions were analysed by hybridisation with a Tn5 probe, and the symbiotic behaviour of the mutant strains was assayed by nodulation tests in bean plants.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía. Incentivos a Proyectos de Investigación de Excelencia en Equipos de Investigación. Proyecto CVI301.

SV-6

Caracterización del mutante Cp9 de *Rhizobium tropici* CIAT899 incapaz de sintetizar factores de nodulación en condiciones de estrés salino y ausencia de apigenina.

Guasch-Vidal, B.^{1*}, Rodríguez-Rosado, A.I., Pérez-Montaña, F.¹, Cubo, M.T.¹, Camacho, M.³, Albareda, M.³, López-Baena, F.J.¹, Manyani, H.², Ollero, F.J.¹, Megías, M.², Bellogín, R.A.¹, y Espuny, M.R.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología y ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

³I.F.A.P.A. Centro "Las Torres-Tomejil", Alcalá del Río, Sevilla. *beagv@us.es

Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides que activan la expresión de los genes de nodulación en los rizobios. Estos genes participan en la síntesis de los factores de nodulación (factores Nod o LCOs) que están implicados en la formación de los nódulos en la raíz de la planta.

Sorprendentemente *Rhizobium tropici* CIAT899, simbionte de la judía, es capaz de sintetizar y secretar LCOs en condiciones de estrés salino (NaCl 300 mM) o ácido (pH 4,5) incluso en ausencia del flavonoide inductor apigenina. Para detectar genes implicados en la síntesis de los LCOs en estas condiciones se ha realizado una mutagénesis al azar empleando el transposón Tn5-Mob en la estirpe CIAT899 (pMP240).

Uno de los mutantes obtenidos, Cp9, presenta una baja actividad β -galactosidasa en ausencia de apigenina y condiciones de estrés salino respecto a la estirpe silvestre. En este trabajo se analiza su perfil de LCOs en condiciones de estrés ácido y salino, su comportamiento simbiótico y competitividad en la nodulación en plantas de judía así como otras características como su tasa de crecimiento y perfil de LPS.

Characterization of the Cp9 mutant of *Rhizobium tropici* CIAT899 that does not synthesize Nod factors in salt stress conditions without apigenin. Legume plant roots exudate flavonoids which activate *nod* gene expression in rhizobia. These genes are involved in Nod factor (LCO) synthesis, which initiate nodule morphogenesis.

Rhizobium tropici CIAT899, which nodulates bean plants, is able to synthesize and secrete Nod factors in the absence of the inducing flavonoid apigenin under saline (300mM NaCl) or acid (pH 4.5) stress. In order to detect genes involved in the LCO synthesis under these conditions, a random mutagenesis on CIAT899 (pMP240) using the Tn5-Mob transposon was carried out.

One of the selected mutants, Cp9, showed a low β -galactosidase activity without apigenin under salt stress conditions when compared with the wild-type strain. In this work, we analyse its LCO profile under acid and saline conditions, its symbiotic behaviour and competitiveness to nodulate bean plants, and some other characteristics such as growth rate and LPS profile.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía. Incentivos a Proyectos de Investigación de Excelencia en Equipos de Investigación. Proyecto CVI301.

SV-7

Características simbióticas de los mutantes *rkpJ* y *rkpU* de *Sinorhizobium fredii* HH103.**Hidalgo, A.¹, Margaret, I.¹, Crespo, J.C.¹, Buendía, A.¹, Moreno, J.², Rodríguez, M.A.³, Lloret, J.⁴, Ruiz-Sainz, J.E.¹, y Vinardell, J.M.^{1*}**

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España. ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España. ³Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España. ⁴Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España. *jvinar@us.es

Diversos polisacáridos superficiales bacterianos juegan un papel importante en la simbiosis rizobio-leguminosa. Recientemente, nuestro grupo ha iniciado el estudio del papel del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS) en las simbiosis de *Sinorhizobium fredii* HH103 con diversas leguminosas hospedadoras. En trabajos previos se han mutado la mayoría de los genes que constituyen la región *rkp1* de HH103, implicada en el transporte del KPS. Dichos mutantes están muy afectados en su capacidad para nodular soja y parecen no tener alteraciones en los demás polisacáridos superficiales. En este trabajo hemos completado la caracterización de la región *rkp1* mediante la mutagénesis de los genes *rkpJ* (último gen del operón *rkpAGHIJ*) y *rkpU* (gen que no ha sido estudiado previamente en ningún otro rizobio). Mediante RMN se ha comprobado que ambos mutantes carecen del KPS silvestre. Los estudios simbióticos realizados revelan que estos mutantes están negativamente afectados en su capacidad para nodular soja, pero no para nodular *Vigna unguiculata* (planta que también forma nódulos determinados). Este hecho sugiere que la importancia simbiótica del KPS depende más de la planta hospedadora que del tipo de nódulo que ésta forma.

Symbiotic phenotypes of *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkpJ* and *rkpU* mutants.

Diverse bacterial surface polysaccharides play an important role in the rhizobium-legume symbiosis. Recently, we have begun the study of the relevance of the rhizobial K-antigen capsular polysaccharide in the symbiotic interaction of *Sinorhizobium fredii* HH103 with several host legumes. In our previous work, most of the genes belonging to the *rkp1* region, which is involved in KPS transport, have been mutated. These mutants, which apparently are not affected in other surface polysaccharides, showed a clear reduction in their abilities to nodulate soybean. In the present study we have completed the characterisation of the HH103 *rkp1* region through the directed mutagenesis of the *rkpJ* (belonging to the *rkpAGHIJ* operon) and *rkpU* (which has not been previously studied in other rhizobia) genes. NMR analysis showed that both mutants lack the wild-type KPS. Symbiotic studies carried out revealed that these mutants are negatively affected to nodulate soybean but not to nodulate *Vigna unguiculata*. Since both legumes form determinate nodules, these results suggest that the symbiotic relevance of *S. fredii* HH103 KPS depends on the host legume rather than on the type of nodule formed.

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-02)

SV-8

El gen *rkpM* de la región *rkp-3* de *Sinorhizobium fredii* HH103 no sólo está involucrado en la biosíntesis del KPS sino también en la del LPS.

Margaret, I.^{1*}, Bolaños, L.², Buendía-Clavería, A.¹, Crespo-Rivas, J.C.¹, Hidalgo, A.¹, Lloret, J.², Moreno, J.³, Reguera, M.², Rodríguez Carvajal, M.A.⁴, Vinardell, J.M.¹, y Ruiz-Sainz, J.E.¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla. ²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. ³Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Sevilla. ⁴Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, Sevilla. *isa_margaret@us.es

Uno de los polisacáridos superficiales bacterianos fundamentales en la simbiosis *Sinorhizobium fredii* HH103-soja es el polisacárido capsular (KPS). En este trabajo se realizan estudios de la región *rkp-3* de *S. fredii* HH103. Se han secuenciado 6 genes de la región *rkp-3* (*rkpLMNOPQ*) implicados en la biosíntesis del ácido pseudoamínico, que es la subunidad de repetición del polisacárido capsular KPS de *S. fredii* HH103. Se han obtenido mutantes en el gen *rkpM* de la región *rkp-3* de *S. fredii* HH103. Los estudios electroforéticos y de RMN indican que estos mutantes no sintetizan el KPS silvestre. Además, el perfil electroforético del LPS de los mutantes está alterado y no es reconocido por un anticuerpo monoclonal específico del LPS del *S. fredii* HH103. El mutante *rkpM* induce pseudonódulos y nódulos que no fijan nitrógeno en *Glycine max* y *Vigna unguiculata* (nódulos determinados). En *Glycyrrhiza uralensis* (nódulos indeterminados) se forman menos nódulos pero éstos sí fijan nitrógeno.

The *S. fredii* HH103 *rkpM* gene is not only involved in KPS production but also in LPS synthesis. *S. fredii* HH103 capsular polysaccharide (K antigen) is relevant for symbiosis with soybean. In this work we identify the *rkp-3* gene region of *S. fredii* HH103 which contains six genes (*rkpLMNOPQ*) and it is involved in biosynthesis of pseudoaminoic acid, the repeating unit of KPS. The DNA of this region was sequenced and a *rkpM* mutant was obtained. This mutant does not produce wild type KPS by RMN analysis. In addition, the *rkpM* mutant shows LPS alterations and it is not recognized by a specific monoclonal anti-LPS antibody. This mutant induces pseudonodules in soybean and *Vigna unguiculata* but very few non fixing nodules are induced. In contrast, nitrogen fixing nodules are induced in *Glycyrrhiza uralensis* (indeterminate nodules) by this mutant.

Financiado por Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-08691-C02-02)

SV-9

Tres rutas de señalización regulan negativamente la movilidad de *Pseudomonas fluorescens* F113.**Navazo, A.*, Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Antequera, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., y Martín, M.***Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.***ana.navazo@uam.es*

La movilidad es uno de los factores que afectan la colonización competitiva de la rizosfera, siendo los mutantes afectados en movimiento muy malos competidores. La rizosfera selecciona variantes fenotípicos que presentan mayor movilidad y que son mejores competidores que la estirpe silvestre. Una característica común de los variantes más móviles, es la presencia de mutaciones en el sistema de dos componentes GacA/GacS, que regula el metabolismo secundario. Mediante mutagénesis por inserción en los genes *gacA* y *gacS* hemos demostrado que el sistema Gac reprime la movilidad de *P. fluorescens* a través de las proteínas RsmA y RsmE, y afecta a la expresión de *fleQ*, que codifica el regulador transcripcional de la síntesis del filamento flagelar. Los variantes hipermóviles presentan además, mutaciones adicionales que incrementan la movilidad. Así, mediante mutagénesis al azar hemos identificado varios genes que reprimen el movimiento. Destacan: *kinB* (que codifica el sensor de un sistema de dos componentes), *sadB* (que codifica una proteína con dominios sensores y efectores y ha sido relacionada con la formación de *biofilms* y la movilidad tipo *swarming*) y *wspR* (que codifica una proteína con un dominio GGDEF y que es esencial para la formación de *biofilms*). El análisis de epistasia de dobles y triples mutantes y el análisis de expresión de determinados genes en los diferentes mutantes nos está permitiendo discernir las rutas de regulación del movimiento en *P. fluorescens* F113.

Three signalling pathways negatively regulate motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. Motility is one of the main factors implicated in the competitiveness of the rhizosphere colonization, being mutants affected in motility very poor competitors. The rhizosphere selects phenotypic variants which have greater motility and are better competitors than the wild type strain. A common feature of the phenotypic variants, is the presence of mutations in the two-component system GacA / GacS, which regulates secondary metabolism. We have already demonstrated that the Gac system repress motility in *P. fluorescens* F113 through RsmA and RsmE, affecting the expression of *fleQ*, which codifies the transcriptional regulator of flagellar filament synthesis. Besides, these variants presented additional mutations that increase its motility. Thus, by random mutagenesis, we have identified several genes implicated in the motility repression: *kinB* (which encodes a sensor of a two component system), *sadB* (which encodes a protein that has been linked to the biofilms formation and swarming motility) and *wspR* (which encodes a protein with a GGDEF domain that it has been described as essential for the biofilms formation). The epistatic analysis of double and triple mutants and the expression studies of certain genes in different mutant backgrounds is allowing us to discern the regulation pathways of motility in *P. fluorescens* F113.

SV-10

Identificación de dos nuevos genes implicados en la transferencia conjugativa del pSymA en *Sinorhizobium meliloti*.

Nogales, J.*, Blanca-Ordóñez, H., Soto, M. J., Olivares, J., y Sanjuán, J.

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidin, CSIC, Granada, España. *quina@eez.csic.es*

La transferencia conjugativa del pSymA de *Sinorhizobium meliloti* esta sujeta a una represión dependiente del gen *rctA* en condiciones de laboratorio. Se han identificado dos nuevos genes implicados en la transferencia conjugativa del pSymA. Uno de ellos, *Sma0974*, codifica para una proteína que muestra un 25% identidad con RctB de *Rhizobium etli*, y la sobreexpresión de este gen promueve la transferencia conjugativa del pSymA a frecuencias 10 veces superiores a las que presenta un mutante en el gen *rctA*. De forma similar a los resultados obtenidos en *R. etli*, la sobreexpresión de *Sma0974* reduce significativamente la expresión del gen *rctA*. El segundo gen, *atrA*, presenta homología con reguladores transcripcionales de la familia GntR. Mutantes en el gen *atrA* promueven la transferencia conjugativa a frecuencias 10 veces inferiores a las que presenta un mutante en el gen *rctA*. Estudios de expresión han demostrado que la presencia de un gen *atrA* funcional reprime la transcripción de las funciones de transferencia conjugativa en condiciones de laboratorio. Parecido a lo que ocurre con otros represores transcripcionales, la transcripción del gen *atrA* parece estar autorregulada positivamente. La relación entre los genes *atrA*, *rctB* y *rctA* se esta estudiando para comprobar si existe una única o varias vías paralelas implicadas en la regulación de los elementos de la transferencia conjugativa de *S. meliloti*.

Identification of two new genes involved in the conjugative transfer of pSymA in *Sinorhizobium meliloti*. The conjugative transfer of the *Sinorhizobium meliloti* pSymA is subject to *rctA*-dependent repression under laboratory conditions. We have identified two new genes involved in pSymA conjugative transfer. One of them, *Sma0974* product shows 25% identity with RctB from *Rhizobium etli*, and the overexpression of this gene promotes pSymA conjugal transfer at frequencies 10 fold higher than those found in an *rctA* mutant. Similarly to the results obtained in *R. etli*, overexpression of *Sma0974* leads to a significant reduction in *rctA* expression. The second gene, *atrA*, shows significant homology to the GntR-family of transcriptional regulators. An *atrA* mutant promotes pSymA conjugal transfer at frequencies 10 fold lower than those shown by an *rctA* mutant. Expression studies have demonstrated that the presence of a functional *atrA* gene represses the transcription of conjugal transfer functions in standard laboratory media. Like many transcriptional repressors, *atrA* transcription seems to be positively autoregulated. The relationship between *atrA*, *rctB* and *rctA* genes will be studied to test if they participate in the control of pSymA conjugative transfer in the same or different regulatory pathways.

SV-11

Caracterización funcional de una fitoquelatina sintasa inusual de *Lotus japonicus*.

Ramos, J.¹, Naya, L.¹, Gay, M.², Abián, J.², y Becana, M.^{1*}

¹Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apartado 202, 50080 Zaragoza, y ²Laboratorio de Proteómica, CSIC-UAB, Facultad de Medicina, Edificio M, Campus Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona *becana@eead.csic.es

En plantas y otros organismos, las fitoquelatina sintasas (PCS) catalizan la síntesis de fitoquelatinas (PCs) usando glutatión como sustrato y algunos metales o metaloides como activadores. Las PCs son polipéptidos ricos en cisteína que protegen las células frente a la toxicidad de metales pesados. Hemos utilizado levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como sistema heterólogo para caracterizar dos proteínas PCS de la leguminosa modelo *Lotus japonicus*: LjPCS1 (una PCS típica) y LjPCS3 (que muestra sólo un 57% de identidad de aminoácidos con LjPCS1). Estudios *in vivo* con células transformadas de levadura muestran que los mejores activadores de LjPCS1 son el Cd y Pb y que el mejor activador de LjPCS3 es el Zn. Los análisis por HPLC y espectrometría de masas demuestran además que LjPCS3, y en menor medida LjPCS1, son activados por Fe y Al. En el caso del Cu fue necesario romper las células para que se produjera la activación de LjPCS1 o LjPCS3. Todos los metales y metaloides ensayados, excepto Cu y Hg, fueron capaces de producir PCs desglicinadas (desGly-PCs), aunque en diferentes cantidades. La LjPCS1 activada por As produce sólo la variante desGly-PC2, mientras LjPCS3 produce PC2, PC3 y sus formas desglicinadas. Proponemos que las diferencias de activación encontradas se deben a los dominios C-terminales de las dos proteínas (43% de identidad en los últimos 200 aminoácidos) y que las variantes desGly-PCs no son sólo metabolitos de la síntesis de PCs sino que juegan también un papel fisiológico en la destoxificación de metales.

Caracterización funcional de una fitoquelatina sintasa inusual de *Lotus japonicus*. In plants and certain other organisms, phytochelatin synthases (PCS) catalyze the synthesis of phytochelatin (PCs) from glutathione as substrate in the presence of metals. PCs are cysteine-rich polypeptides that protect cells against heavy metal toxicity. We have used the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as an heterologous system to characterize two PCS proteins of the model legume *Lotus japonicus*, LjPCS1 (a typical PCS) and LjPCS3 (with only a 57% amino acid identity to LjPCS1). Detailed *in vivo* studies with transformed cells expressing the plant enzymes showed that the best activators of LjPCS1 were Cd and Pb, whereas LjPCS3 was activated to a large extent by Zn. Furthermore, HPLC and mass spectrometry analyses unequivocally demonstrated that LjPCS3 and, to a lower extent, LjPCS1 were activated by Fe and Al. In the case of Cu cell disruption was required to activate LjPCS1 or LjPCS3. All the metals and metalloids tested, except Cu and Hg, were able to elicit formation of desGly-PC polypeptides, albeit at different rates. Notably, As elicited production of only desGly-PC2 by LjPCS1 and of PC2, PC3, and their desGly-PC forms by LjPCS3. We propose that the differences in metal activation of the two proteins rest on their C-terminal domains (43% identity in their last 200 amino acid residues) and that the desGly-PC variants are not only by-products of canonical PCs but play a physiological role in metal detoxification.

SV-12

Organización transcripcional de la región encargada de codificar la síntesis del flagelo en *Pseudomonas fluorescens* F113.

Redondo-Nieto, M.*, Lloret, J., Larenas, J., Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., y Martín, M.

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid. España.
*miquel.redondo@uam.es

La movilidad *Pseudomonas fluorescens* F113 depende de flagelos tipo b. El análisis de la región codificante para la síntesis del filamento flagelar ha mostrado una organización transcripcional diferente a la que aparece en flagelos tipo a. Fusiones de las regiones presumiblemente promotoras de cada gen con el gen *lacZ* y ensayos de RT-PCR con oligos específicos que amplificasen las regiones intergénicas, pusieron de manifiesto que además de los promotores ya descritos en otras *pseudomonas* que controlan la expresión de *fliC*, *fliD* y *fleQ*, existen regiones promotoras precediendo al gen *flaG* y al gen *fliS* pero no así en el gen *fliT* que se coexpresa con *fliS* indicando la existencia de un operón *fliST*. Finalmente se comprobó la funcionalidad de ambas regiones mediante ensayos de complementación en estirpes mutantes de F113 para *flaG* y *fliS*. Se buscaron los inicios de transcripción para los operones *flaG* y *fliST* mediante la técnica de RACE con el fin de localizar las regiones reguladoras de ambos promotores. Los resultados revelaron que ambas regiones parecen ser dependientes del factor σ^{70} e independientes de *FleQ*, principal regulador de la síntesis de flagelos. Dichos resultados fueron confirmados al no mostrarse ninguna alteración en la expresión de *flaG* y *fliST* en cepas de F113 mutadas en los principales reguladores transcripcionales de síntesis de flagelo.

Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas fluorescens* F113 motility depends on type-b flagella. Analysis of the region encoding the synthesis of flagellar filament has shown a different transcriptional organization to the one appearing in type-a flagella. Fusions of the putative promoter regions of each gene with the *lacZ* gene together with RT-PCR assays with specific primers amplifying intergenic regions, showed that in addition to promoters already described in other pseudomonads that control the expression of *fliC*, *fliD*, and *fleQ*, there are promoters regions preceding *flaG* and *fliS* gene, but not in the gene *fliT*, which is transcribed with *fliS* indicating the existence of an operon *fliST*. Finally, we checked the functionality of both regions through complementation assays in *flaG* and *fliS* F113 strains. Besides, transcription start site of operons *flaG* and were searched by RACE in order to locate regulatory boxes. The results revealed that both regions appear to be dependent on σ^{70} factor and independent of *FleQ*, master regulator of the synthesis of flagella. These results were confirmed on not finding any alteration in the expression of *flaG* and *fliST* in F113 mutants for the main flagella synthesis transcriptional regulators.

SV-13

Análisis de la relevancia de proteínas de exportación Tat-dependiente en *Rhizobium leguminosarum*.**Rey, L.^{1*}, Abad, J.¹, Vega, R.M.¹, Imperial, J.^{1, 2}, Ruiz-Argüeso, T.¹, y Palacios, J.M.¹**¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Departamento de Biotecnología, ETS Ingenieros Agrónomos, UPM. Ciudad Universitaria s/n Madrid 28040-España.²CSIC.*luis.rey@upm.es

La relevancia del sistema Tat de translocación de proteínas en *R. leguminosarum* bv *viciae* es objeto de análisis en nuestro grupo de investigación. En este contexto se han construido mutantes *tat* en las cepas 3841 y UPM791. Los mutantes *tat* presentaron un fenotipo pleiotrópico y simbióticamente defectivo en simbiosis con guisantes (*Pisum sativum*). El genoma de la cepa 3841 está anotado y actualmente se dispone de la mayor parte de la secuencia del genoma de la cepa UPM791. A partir de la cepa de *R. leguminosarum* 3841 se identificaron 102 proteínas como posibles sustratos dependientes del sistema Tat; 87 de estos sustratos tienen un homólogo en la cepa UPM791. La función de la mayor parte de estos sustratos es desconocida. Con el fin de obtener mutantes en los genes correspondientes a dichas proteínas se está generando por transposición aleatoria una muateca de la cepa UPM791. El análisis de estos mutantes nos permitirá evaluar la relevancia de la vía de exportación Tat en la interacción *R. leguminosarum*-leguminosas

Analysis of the relevance of the Tat system for protein translocation in *R. leguminosarum* bv *viciae*. The relevance of the Tat system for protein translocation in *R. leguminosarum* bv *viciae* is being analysed in our research group. In this context, *tat* mutants in *R. leguminosarum* bv *viciae* strains 3841 and UPM791 have been constructed. The *tat* mutants exhibited a pleiotropic and symbiotic defective phenotype in symbiosis with peas (*Pisum sativum*). The genome of *R. leguminosarum* 3841 was annotated, and most of the sequence of UPM791 genome is currently available. 102 proteins were identified as Tat-dependent substrates in the genome of *R. leguminosarum* 3841 strain; 87 of these substrates have an homologous in strain UPM791. The function of most of these proteins is unknown. In order to obtain mutants in the corresponding genes, a mutant library of UPM791 is being constructed at present. The analysis of these mutants will allow us to evaluate the relevance of the Tat transport pathway in the *R. leguminosarum*-legumes interaction.

SV-14

Genes de plantas envolvidos em simbioses actinorrízicas.

Ribeiro, A.^{1,4*}, Graça, I.^{1,4}, Santos, P.^{1,2,4}, Fortunato, A.^{1,4}, Liang, J.^{1,4}, Gouveia, M.³, e Pawlowski, K.²

¹IICT/DCN, Oeiras, Portugal; ²Dept. of Botany, SU, Stockholm, Sweden, ³Centro de Estudos da Macaronésia, Dept. of Biology, UMa, Funchal, Portugal, ⁴ITQB/UNL, Oeiras, Portugal, *aribeiro@itqb.unl.pt

Os nódulos actinorrízicos são induzidos por bactérias fixadoras de azoto do género *Frankia* em raízes de várias plantas lenhosas, designadas plantas actinorrízicas. Este grupo de plantas apresenta elevada plasticidade de adaptação ambiental e tem uma vasta aplicação agro-florestal (e.g. produção de combustíveis e madeira e cortinas quebra-vento) e ecológica (e.g. recuperação de solos marginais), constituindo um importante elemento das comunidades vegetais. Com o perigo eminente de alterações climáticas e seu impacto a uma escala global, o interesse neste grupo de plantas tem vindo a crescer cada vez mais. A nível mundial, vários grupos têm vindo a desenvolver trabalhos de investigação na área das simbioses actinorrízicas, visando a compreensão dos mecanismos que controlam o processo simbiótico e a avaliação da diversidade genética dos dois simbiontes, bem como das potencialidades do uso deste tipo de sistema simbiótico para fins ecológicos. Neste trabalho serão apresentados os progressos mais recentes referentes aos mecanismos moleculares utilizados pelas plantas actinorrízicas para controlar o processo de nodulação, com particular ênfase para os estádios iniciais da interacção e comparação com o sistema simbiótico das leguminosas.

Plant genes involved in actinorhizal symbioses. Actinorhizal nodules are induced by nitrogen-fixing bacteria of the genus *Frankia* on roots of several woody plants, called actinorhizal plants. These plants have a great plasticity for environmental adaptation and are widely used in agro-forestry (e.g. wood and fuel production, wind-breaks) and for ecological purposes (e.g. land reclamation), being important elements in plant communities. As climate changes threaten to remake the global landscape over the next decades, the interest in actinorhizal plants has increased enormously. Worldwide, several groups have been working in the field of actinorhizal symbioses aiming at understanding the mechanisms controlling the symbiotic process, and evaluating the genetic diversity of macro- and microsymbionts as well as the potentialities of the symbiotic systems for ecological purposes. Here we will report on the progress of the molecular mechanisms used by actinorhizal plants to control the nodulation process, particularly in what concerns the early stages of the interaction and the comparison between actinorhizal and legume symbioses.

Supported by grants POCI/AGR/55651 and PPCDT/AGR/55651/2004 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) and Programa Operacional Ciência e Inovação 2010, co-financed by the European Fund FEDER, and by FCT grants SFRH/BD/3130/2000, SFRH/BPD/18803/2004, SFRH/BD/6493/2001 and SFRH/BPD/23890/2005 to JL, co-financed by the Portuguese PIDDAC program and European Social Fund, under the 3rd framework program.

SV-15

Sistemas de resistência a metais pesados em *Mesorhizobium loti*: o operão arsenato.**Sá-Pereira P.^{1,2*}, Pereira, J.¹, e Videira e Castro, I.²**

¹Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia e Inovação, Grupo de Biologia Molecular, Lumiar, Portugal, ²Laboratório de Microbiologia do Solo, L-INIA, INRB, Oeiras, Portugal, Oeiras Portugal. *paula.sapereira@gmail.com

A utilização de agroquímicos e de fertilizantes inorgânicos ou orgânicos contaminados com metais pesados, pode resultar num acumular destes elementos nos solos. Os metais pesados em determinadas concentrações no solo, são tóxicos para a planta hospedeira, para os rizóbios e para a simbiose leguminosa-rizóbio, podendo influenciar a fixação simbiótica do azoto molecular. Os efeitos dependem das características químicas do solo, das espécies microbianas, e do tempo de exposição do solo contaminado. Foram assim identificados, pela primeira vez, os genes que constituem o operão *ars* na estirpe de *Mesorhizobium loti*, e que apresenta uma estrutura diferente em relação aos operões já conhecidos de outros microorganismos. A análise de sequências permitiram constatar que o operão que confere resistência ao arsénio na espécie de *Mesorhizobium loti*, é composto por quatro genes de resistência ao arsénio, *arsDABC*. O *arsD*, gene regulador da transcrição do operão, apresentou 100% de similaridade com o *arsD* da *Yersinia enterocolitica* e do *Acidiphilium multivorum*. O gene *arsA* é uma ATPase que forma um complexo com o gene *arsB*, *arsAB*, constituindo a bomba transmembranar de efluxo do arsenito. Constatou-se ainda, que dentro desse complexo transmembranar distinguem-se dois tipos de transportadores, a proteína transportadora de ligação ao substrato e a proteína transportadora do tipo permease. A arsenato reductase, *ArsC*, é identificada por homologia a uma arsenato reductase de *Bradyrhizobium japonicum*.

Heavy metals resistance systems in *Mesorhizobium loti*: the arsenate operon.

The utilization of agro-chemicals and inorganic fertilizers contaminated with heavy metals can result in the accumulation of these elements in soils. Heavy metals in some concentrations are toxic for the host plant, for rhizobial species and for the symbiotic process, affecting the fixation of molecular nitrogen. The final effects depend of the physical and chemical characteristic of soils, microbial species and time of exposure to these contaminants. It were identified for the first time, the genes that compose the arsenate operon in *Mesorhizobium loti*, that presents a different structure comparing with other *ars* operon structures already know. Sequence analysis allowed the identification of four genes - *arsDABC*. The gene *arsD*, a transcription regulator, with 100% similarity with *arsD* of *Yersinia enterocolitica* and *Acidiphilium multivorum*. Gene *arsA*, was also identified, a ATPase coupled to a transmembrane efflux pump, the codified by *arsB* and an arsenate reductase, *arsC*, homologue to *Bradyrhizobium japonicum*.

Sá-Pereira, P., Rodrigues, M., Castro, I.V., Simões, F. Identification of an arsenic resistance mechanism in strains of *Rhizobium*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, (2007). 23: 1351-1356.

Videira e Castro, I., Sá Pereira, P., Simões, F., Matos, J., Ferreira, E. Use of Lotus/Rhizobium symbiosis in regeneration of polluted soils. (2007) Lotus Newsletter 37(2): 87-88.

Philippe H., Douady C. J Horizontal gene transfer and phylogenetics, *Current Opinion in Microbiology*, (2003), 6, 498-505.

SV-16

Análisis simbiótico y transcriptómico del operón máster *visNR* del regulón flagelar de *Sinorhizobium meliloti*.

Soto, M.J.^{1*}, Scharf, B.², Schmitt, R.², Cuéllar, V.¹, Sanjuán, J.¹, y Olivares, J.¹

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España. ²Lehrstuhl für Genetik, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Universität de Regensburg, Regensburg, Alemania. *mariajose.soto@eez.csic.es

Distintos estudios realizados con cepas no isogénicas sugieren que la motilidad bacteriana es una característica importante que influye de manera positiva en la capacidad competitiva de los rizobios. Se sabe además que, al menos en *S. meliloti*, existe una regulación coordinada de genes de motilidad y de factores importantes para el establecimiento de la simbiosis.

En *S. meliloti*, la expresión de genes de quimiotaxis y motilidad depende de los genes reguladores *visN* y *visR* que codifican las subunidades de tipo LuxR del activador transcripcional heteromérico VisNR. Con objeto de investigar el papel que pueden tener estos genes reguladores y/o la motilidad en el fenotipo simbiótico de *S. meliloti*, se han realizado experimentos de nodulación en alfalfa con cepas que carecen de *visN*, *visR* o de ambos genes. Estos mutantes no mótils son capaces de nodular y fijar nitrógeno en alfalfa pero muestran diferencias en su capacidad competitiva. La comparación del transcriptoma de cada uno de los mutantes con el de la cepa silvestre revela que VisN y VisR son reguladores transcripcionales globales y no sólo específicos del regulón flagelar, afectan de forma positiva y negativa la transcripción y no requieren necesariamente formar un heterómero para modular expresión génica.

Symbiotic and transcriptomic studies of the *Sinorhizobium meliloti* flagellar master operon *visNR*. Several studies performed with non-isogenic bacteria indicate that motility is as an important behaviour influencing the competitive ability of rhizobial strains to form nodules on legume plants. Moreover, increasing evidence suggests that at least in *S. meliloti* the regulation of motility is coordinated with the expression of important genes for the establishment of symbiosis.

In *S. meliloti*, the expression of chemotaxis and motility genes depends on the master regulatory genes *visN* and *visR* which encode the LuxR-type subunits of the heteromeric transcriptional activator VisNR. In order to determine the contribution of these regulatory genes and/or motility to the symbiotic phenotype of *S. meliloti*, nodulation assays in alfalfa plants were performed with mutants lacking *visN*, *visR* or both. These nonmotile mutants are able to nodulate alfalfa and fix nitrogen. However, they showed different competitive abilities. Analysis of the transcriptomic profile of the different mutants reveals that VisN and VisR are global rather than flagella-specific transcriptional regulators, they have both positive and negative effects on transcription, and they do not need to form a heteromeric complex to modulate gene expression.

SV-17

Análise filogenética de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *Biserrula pelecinus*.**Vicente, C.^{1*}, Pérez-Fernández, M.², Pereira, G.¹, Costa, R.¹, Tavares-de-Sousa, M.M.¹**

¹Departamento de Pastagens, Forragens e Outras Culturas, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, INIA, Ex-ENMP, Elvas, Portugal ²Departamento de Física, Química y Sistemas Naturales, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Espanha.

*claudia.s.vicente@gmail.com

Estudos preliminares indicam elevada especificidade na relação simbiótica estabelecida entre a leguminosa pratense *Biserrula pelecinus*, relevante pelas suas características agronómicas e capacidade de subsistir em solos ácidos, e bactérias fixadoras de azoto pertencentes ao género *Mesorhizobium* (Nandasena *et al.* 2001). O objectivo do presente trabalho consistiu no estudo das relações filogenéticas de isolados bacterianos extraídos de nódulos de *Biserrula pelecinus* com membros dos diversos géneros de rizóbio existentes. No seguimento da análise molecular de 88 estirpes e da verificação da baixa diversidade genética associada, 5 isolados foram seleccionados, de acordo com o grau de similaridade com *Mesorhizobium ciceri*, para sequenciação do gene 16S rRNA. Procedeu-se ao alinhamento progressivo das sequências nucleótidas com estirpes de 5 géneros de rizóbio e à construção de uma árvore filogenética através do método neighbor-joining e das distâncias evolutivas de Kimura 2-parâmetros. A análise filogenética mostrou que AjuPt6, SafPt6, SafPt12 e AviSp7 revelaram cerca de 91 a 98% de similaridade com estirpe rizobiana *Mesorhizobium ciceri* subsp. *biserrulae* (AY601513). Apenas ArrPt2 revelou 97% de semelhança com a estirpe *Rhizobium leguminosarum* (U29388).

Phylogenetic analysis of bacterial strains isolated from nodules of *Biserrula pelecinus*. Preliminary studies indicate considerable specificity in the symbiotic relationship established between the pasture legume *Biserrula pelecinus*, relevant for its agronomic characteristics and the ability to subsist in acid soils, and nitrogen fixing bacteria belonging to *Mesorhizobium* genera (Nandasena *et al.* 2001). This work aims the study of the phylogenetic relationships of bacterial strains isolated from nodules of *Biserrula pelecinus* with other members of the existent rhizobia genus. Following the molecular analysis of 88 strains and the verification of low genetic diversity associated, 5 isolates were selected according to the degree of similarity with *Mesorhizobium ciceri* for sequencing of 16S rRNA gene. The progressive alignment of nucleotide sequences with 5 rhizobia genus was performed and a phylogenetic tree was constructed through neighbor-joining method and the evolution distances of Kimura 2-parameter. The phylogenetic analysis showed that AjuPt6, SafPt6, SafPt12 and AviSp7 revealed 91 to 98% similarity with rhizobia strain *Mesorhizobium ciceri* subsp. *biserrulae* (AY601513). Only ArrPt2 revealed 97% similarity with the strain *Rhizobium leguminosarum* (U29388).

Índice de autores

- Abad, J., 119
Abián, J., 117
Aguado Puig, A., 108
Aguilar, M., 65
Aguirre de Cárcer, D., 35
Aitken, M., 3
Albareda, M. (6), 11, 25, 29, 110, 111, 112
Alexandre, A. (2), 36, 48
Algar, E., 91
Alho, L., 12
Almeida, A.C., 52
Alves, P.I., 44
Anselmo, A., 27
Antequera, A., 115
Araújo, S., 89
Azcón-Aguilar, C. (2), 53, 67
Bacon, J., 3
Balaguer, L., 40
Barahona, E. (3), 61, 115, 118
Barcellos, F., 55
Barea, J.M. (2), 16, 53
Bargaz, A., 19
Barranco, J.R., 99
Barreto Crespo, M.T., 44
Barrijal, S., 38
Barriuso, J., 68
Becana, M. (2), 97, 117
Bedmar, E.J. (3), 38, 47, 94
Bellogín, R.A. (9), 21, 51, 69, 71, 75, 76, 77, 111, 112
Bergottini, V.M., 13
Bernardes da Silva, A., 89
Blanca-Ordóñez, H., 116
Blanco, D., 23
Bolaños, L. (5), 73, 78, 79, 101, 114
Bonilla, I. (4), 73, 78, 79, 101
Brhada, F., 43
Brígido, C., 36
Brito, B., 107
Buendía-Clavería, A. (6) 60, 64, 73, 79, 113, 114
Burdman, S., 84
Cabirol, N., 37
Cabrera, E., 107
Calderón, K., 37
Callaway, R., 47
Camacho, M. (6), 17, 22 82, 110, 111, 112
Campbell, C., 3
Canhoto, J.M., 20
Carlton-Smith, C., 3
Carranca, C., 14
Casanova, L., 17
Casquero, P., 42
Castagno, L.N. (2), 13, 62
Castro, R., 54
Caviedes, M.A. (3), 9, 41, 43
Cerrone, F., 15
Chahboune, R., 38
Chamber Perez, M.A., 108
Chambers, B., 3
Chaudri, A., 3
Chedly, A., 94
Chubatsu, L.S., 5
Clarke, J., 93
Coba de la Peña, T. (2), 39, 40
Collados, C., 16
Contreras Sánchez-Matamoros, R., 63
Cordero, I., 40
Corticeiro, S. (2), 54
Costa, R., 123
Crespi, M., 93
Crespo-Rivas, J.C. (2), 64, 114
Cruz, C., 98
Cruz, L.M., 5
Cubo, M.T. (7), 51, 71, 75, 76, 77, 111, 112
Cuéllar, V., 122
Dardanelli, M.S., 109
Dary, M. (3), 9, 41, 43
Daza Ortega, A. (5), 17, 22, 46, 82, 108
Dazzo, F. (2), 80, 81
De Lorenzo, L., 93
Del Castillo, I. (5), 21, 51, 55, 65, 77
Del Val, C., 105
Delgadillo, J., 9
Delgado, F., 21
Delgado, M.J., 94
Dias, L.S., 12
Díaz-Alcántara, C., 42
Donate-Correa, J., 70
Doukkali, B. (3), 9, 41, 43
Dourado, A.C., 44
Duarte, J.C., 27
Echeverría, L., 66
El Aafi, N., 43
Espuny Gómez, M.R. (9), 51, 69, 71, 75, 76, 77, 110, 111, 112
Estevez, J., 110

- Estrella, M.J. (2), 13, 62
Faghire, M., 19
Fajardo, S. (2), 26, 40
Fareleira, P. (2), 18, 44
Fatnassi, N., 94
Fedorova, E., 39
Fernández-López, M., 72
Fernández-Pascual, M. (2), 26, 40
Ferreira, E. (4), 10, 18, 24, 30
Ferreira, M., 50
Ferrol, N., 67
Fevereiro, M.P., 89
Figueira, E. (4), 24, 54, 74, 92
Filali-Maltouf, A., 43
Fortunato, A., 120
Gallina, O., 45
Gamane D. (2), 41, 43
García Cristóbal, J., 68, 85
García Trigueros, C., 109
García-Galavís, P.A. (2), 17, 46
García-Villaraco, A. (2), 55, 91
Gay, M., 117
Ghoulam, C., 19
Gibbs, P., 3
Gil Serrano, A.M. (3), 63, 63, 69
Gomes, C., 50
Gomes, F., 20
Gómez-Silván, M.C., 47
González-Andrés, F. (2), 23, 42
González-Barroso, S. (3), 69, 75, 76
González-López, J. (4), 15, 37, 47, 56
González-Luque, J.M., 110
González-Tirante, M., 45
Gouveia, M., 120
Gozalvez, M., 95
Graça, I., 120
Grande M.J. (2), 46, 82
Grijalbo, L., 26
Guasch Vidal, B. (9), 51, 69, 71, 75, 76, 77, 110, 111, 112
Gutiérrez Mañero, F.J. (5), 21, 51, 68, 90, 91
Herencia, J. F., 46
Hernández S., 23
Herrera-Cervera, J.A. (2), 19, 96
Hidalgo, A. (5), 60, 64, 107, 113, 114
Huergo, L.F., 5
Igual, J.M. (2), 45, 84
Imperial, J. (2), 107, 119
Iribarne, C. (3), 96, 99, 100
Irigoyen, J. J., 28
Jiménez, J. A., 46
Jiménez, P., 40
Jiménez-Zurdo J.I. (3), 80, 81, 105
Klassen, G., 5
Labandera, C., 4
Lafuente, A. (2), 9, 41
Laranjo, M. (2), 36, 48
Larenas, J., 118
León-Barrios, M., 70
Lerner, A., 84
Liang, J., 120
Lima, A., 54
Lloret, J. (6), 64, 73, 79, 113, 114, 118
Lluch, C. (6), 19, 95, 96, 99, 100, 102
López, M. (2), 96, 102
López-Baena, F.J. (6), 71, 75, 76, 77, 111, 112
López-Contreras, J. A., 72
López-Robles, D.J., 85
Lorite, M.J. (2), 49, 70
Loscos, J., 97
Lucas García, J.A. (3), 51, 68, 91
Lucas, M.M. (2), 39, 40
Machado, H., 50
Machado, Z., 98
Madeira, M., 14
Maiale, S., 66
Mandri, B., 19
Manrique, E., 40
Manyani H. (8), 51, 55, 63, 106, 109, 110, 111, 112
Margaret, I. (5), 60, 64, 73, 113, 114
Marques, J., 50
Marques, J.F. (3), 12, 18, 44
Marques, P., 14
Marques da Silva, M.P., 89
Martín, M. (6), 35, 59, 61, 79, 115, 118
Martínez-Granero, F. (3), 61, 115, 118
Martínez-Molina, E. (3), 33, 80, 81
Martínez-Toledo, M.V., 56
Martins-Loução, M.A., 98
Matamoros, M.A., 97
Mateos, P.F. (3), 33, 80, 81
Matos, J. (2), 30, 83
Matos, N., 18
McGrath, S., 3
Megías, E. (4), 21, 51, 55, 75
Megías, M. (11), 21, 51, 55, 63, 65, 75, 77, 109, 110, 111, 112
Mendonça, D., 83
Menéndez, A., 66
Merchan, F., 93
Merrick, M., 5

- Monteiro, R.A., 5
Montero-Calasanz, M.C. (2), 17, 22
Montes, F. (2), 21, 51
Morcillo, C. (2), 26, 40
Moreno Linares, E.J., 99
Moreno, J. (2), 113, 114
Mulas, D. (2), 23, 42
Muñoz, S., 49
Navazo, A. (3), 61, 115, 118
Naya, L., 117
Neto, M.M., 52
Nogales, J., 116
Noyola, A., 37
Nunes, C., 89
Ocaña, A., 95
Ojeda, J. (4), 21, 51, 55, 65
Okon, Y., 84
Olivares, J. (3), 49, 116, 122
Oliveira, A., 52
Oliveira, S. (2), 36, 48
Ollero, F.J. (10), 51, 60, 64, 65, 71, 75, 76, 77, 111, 112
Oruezabal, R., 105
Oufdou, K., 19
Pajuelo, E. (4), 9, 41, 43, 108
Palacios, J.M. (2), 107, 119
Palenzuela, J., 53
Palma, F. (4), 96, 99, 100, 102
Palomares, A.J. (3), 9, 41, 43
Pampulha, M.E., 52
Pawlowski, K., 120
Paz, R.C., 13
Pedrosa, F.O., 5
Pereira, G., 123
Pereira, J., 121
Pereira, S. (2), 54, 74
Pérez-Fernández, M., 123
Pérez-Montaño, F. (7), 69, 71, 75, 76, 77, 111, 112
Pérez-Paniagua F., 43
Pérez-Tienda, J., 67
Pina, J.P., 14
Ponce Díaz, A., 20
Possante, M.
Pozo, C. (2), 15, 56
Prieto, R.I., 107
Probanza Lobo, A., 85
Pueyo, J.J. (2), 39, 40
Ramos, B. (4), 51, 68, 90, 91
Ramos, J., 117
Redondo-Nieto, M. (3), 99, 115, 118
Reguera, M. (5), 73, 78, 79, 101, 114
Reguera Useros, J.I., 85
Rey, L., 119
Ribeiro, A., 120
Rigo, L.U., 5
Rincón, A.M., 40
Rivas, E., 105
Rivas, R. (3), 33, 48, 81
Rivera, L., 81
Rivilla, R. (7), 35, 59, 61, 79, 105, 115, 118
Robledo, M. (2), 80, 81
Rodelas, B. (2), 47, 56
Rodrigues, S. (2), 24, 36
Rodríguez Carvajal, M.A. (2), 63, 69
Rodríguez, M.A. (2), 60, 113
Rodríguez-Llorente, I.D. (2), 9, 41
Rodríguez-Navarro, D.N. (5), 11, 25, 29, 60, 110
Rodríguez-Rosado, A.I. (2), 111, 112
Romero de la Osa, L., 82
Romero-Cuadrado, L., 55
Ruiz, O. A. (3), 13, 62, 66
Ruiz-Argüeso, T. (2), 107, 119
Ruiz-Diez, B. (2), 26, 40
Ruíz-Girela, M., 53
Ruiz-Porras, J.C., 46
Ruiz-Sainz, J.E. (6), 60, 64, 73, 79, 113, 114
Sacristán Pérez-Minayo, G., 85
San Martín, E.P., 20
Sánchez-Díaz, M., 28
Sánchez-Peinado, M.M. (2), 15, 56
Sanjuán, J. (4), 49, 70, 116, 122
Sannazzaro A., 66
Santa Regina, I., 45
Santamaría, C. (4), 17, 22, 46, 82
Santamaría, R., 39
Santos, P., 120
Santos, V., 20
Sanz Sáez de Jáuregui, A., 28
Sá-Pereira P. (4), 27, 30, 83, 121
Scambato, A., 66
Scharf, B., 122
Schmitt, R., 122
Simões F. (2), 30, 83
Sorzabalbere, I., 20
Soto, M.J. (3), 49, 116, 122
Sousa, C. (2), 93, 111
Souza, E.M., 5
Steffens, M.B.R., 5
Tavares-de-Sousa, M.M., 123
Tejera, N.A. (3), 19, 98, 102
Temprano, F.J. (3), 11, 25, 29

Tenreiro, R. (2), 34, 44
Tenreiro, T., 44
Thompson, R., 93
Toro, N. (2), 72, 105
Torres, M.O., 14
Torres-Quesada, O., 105
Trujillo, M.E., 33
Valverde, A. (2), 45, 84
van Brussel, A.A.N., 111
Vega, R.M., 119

Velázquez, E. (5), 33, 42, 48, 80, 81
Vicente, C., 123
Videira e Castro, I., (5), 10, 24, 30, 74,
121
Villegas, L., 40
Vinardell, J.M. (7), 60, 64, 71, 73, 79, 113,
114
Wassem, R., 5
Yates, M.G., 5
Young, J.P.W., 48

Programa.

1 de Junho / 1 de junio

15:00 - 17:00 Entrega de documentação / Entrega de documentación

17:00 Sessão de Abertura / Acto de Apertura

17:30 - 18:30 Conferência de abertura / Conferencia de apertura

Steve McGrath, Rothamsted Research, Harpenden, UK

Sensitivity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to metals accumulating in soils from long-term sewage sludge applications.

18:30 Conferência convidada/Conferencia invitada

Carlos Labandera, Montevideo, Uruguay. Fijación biológica de nitrógeno y sostenibilidad de los sistemas productivos. Especial referencia a Uruguay./The biological nitrogen fixation and the sustainability of the productive systems. Special reference to Uruguay.

19:00-20:30 Sessão I / Sesión I: Aplicações agronómicas e ambientais/ Aplicaciones agronómicas y ambientales

Presidentes:

Adília Oliveira, U. Técnica de Lisboa, Portugal.

Jesús González López, U. de Granada, España

19:00 Conferência temática / Conferencia temática:

Eloisa Pajuelo, U. de Sevilla, España. Ingeniería genética de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa para su uso en biorremediación./The design of genetic traits through plant biotechnology allows the use of plants far beyond the production of food and fibers.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

19:45 **L. Alho**, U. de Évora, Portugal. Recuperação de inóculo e distribuição de nódulos em cultivares de trevo subterrâneo.

20:00 **F. Cerrone**, Instituto del Agua, U. de Granada, España. Producción de bioplásticos (PHAs) por cepas de *Azotobacter* utilizando un residuo orgánico semisólido generado en el proceso de obtención del aceite de oliva: alpeorujo.

20:15 **J.J. Irigoyen**, U. de Navarra, España. Efecto del suministro de NH_4^+NO_3 en la respuesta de plantas de alfalfa noduladas al aumento del CO_2 .

21:00 Cocktail de boas-vindas / Cocktail de bienvenida

2 de Junho / 2 de junio

9:00 - 10:15 Sessão I (cont.) / Sesión I (cont.)

9:00 Conferência temática / Conferencia temática:

Eugénio Ferreira, INRB, Oeiras, Portugal. A fixação biológica do azoto e a produtividade das pastagens em sistemas agrícolas Mediterrânicos. / Biological nitrogen fixation and pastures productivity in mediterranean farming systems.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

9:45 **M. Albareda**, IFAPA, Junta de Andalucía, Sevilla, España. Inoculación de consorcios microbianos en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. involucrados en protección frente a estreses abióticos moderados.

10:00 **D. Mulas**, Instituto de Recursos Naturales, U. de León, España. Aplicación de compost y té de compost en alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) y su implicación en el establecimiento de la simbiosis con *Rhizobium*.

10:15-11:00 Sessão I / Sesión I: Exposição de posters / Exposición de posters

Moderadores dos posters / Moderadores paneles:

Agustín Probanza, U. San Pablo-CEU, Madrid, España.

Antonio Daza, IFAPA, Junta de Andalucía, Sevilla, España.

11:00 - 11:30 Café

11:30 - 13:00 Sessão II / Sesión II: Ecologia, diversidade e evolução / Ecología, diversidad y evolución

Presidentes:

Solange Oliveira, U. de Évora, Portugal.

Miguel Ángel Caviedes, U. de Sevilla, España.

11:30 Conferência temática / Conferencia temática:

Raúl Rivas, U. Salamanca, España. Biodiversidad de bacterias con capacidad formadora de nódulos en leguminosas/ Biodiversity nodulation in legumes.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

12:15 **A.C. Dourado**, IBET/ITQB, U. Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal. Caracterização genotípica de estirpes de rizóbio isoladas de luzernas anuais por M13-PCR.

12:30 **M.C. Gómez Silván**, U. de Granada, España. *Robinia pseudoacacia* y *Mesorhizobium*: tal para cual.

12:45 **M. Laranjo**, ICAM, U. de Évora, Portugal. Análise filogenética dos genes simbióticos suporta a transferência lateral de genes no género *Mesorhizobium*.

13:00 - 14:30 Almoço / Almuerzo.

14:30 - 15:30 Presença nos posters. Sessões I, II e IIIa / Presencia en los poster. Sesiones I, II y IIIa

15:30 - 16:45 Sessão II (cont.) / Sesión II (cont.)

15:30 Conferência temática / Conferencia temática:

Rogério Tenreiro, BioFIG, F. de Ciências, U. de Lisboa, Portugal. Diazotrofia e diversidade microbiana: do isolamento em cultura à metagenómica./Diazotrophy and microbial diversity: from culture-based approaches to metagenomics.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

16:15 **E. Figueira**, U. de Aveiro, Portugal. Tolerância à salinidade e eficiência de nodulação em *Rhizobium leguminosarum* isolado de solos Portugueses com diferentes condições ambientais.

16:30 **I. Del Castillo**, U. de Sevilla, España. Estudio de biodiversidad microbiana en suelos de arrozal en las Marismas del Guadalquivir.

16:45 - 17:30 Sessão II / Sesión II

Exposição de posters / Exposición de posters

Moderadores dos posters / Moderadores paneles:

Pedro Mateos, U. de Salamanca, España.

José Javier Pueyo, CCMA, CSIC, Madrid, España.

17:30 - 18:00 Café

18:00 - 19:30 Sessão III / Sesión III: Interacções plantas microrganismos / Interacciones plantas-microorganismos.

Presidentes:

Ana Ribeiro, IICT, Lisboa, Portugal.

Tomás Ruiz-Argüeso, U. Politécnica de Madrid, España.

18:00 Conferência temática / Conferencia temática:

Marta Martín, U. Autónoma de Madrid, España. Identificación de genes y caracteres implicados en la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas*. / Identification of genes and traits relevant for rhizosphere colonization by *Pseudomonas*.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

18:45 **E. Barahona**, U. Autónoma de Madrid, España. ¿Es necesaria la capacidad de formar biofilms para la colonización de la rizosfera?

19:00 **N. Ferrol**, EEZ, CSIC, Granada, España. Mecanismos implicados en el transporte de nitrógeno en micorrizas arbusculares.

19:15 **M.J. Lorite**, EEZ, CSIC, Granada, España. Nodulación de *Lotus* por cepas de *Sinorhizobium meliloti* que portan un nuevo grupo de genes simbióticos.

19:30 - 21:00 Assembleia da SEFIN / Asamblea SEFIN

3 de Junho / 3 de junio

8:30 - 10:30 Sessão III (cont.) / Sesión III (cont.)

8:30 Conferência temática / Conferencia temática:

José María Vinardell, U. de Sevilla, España. Papel simbiótico de los polisacáridos superficiales rizobianos. / Symbiotic role of rhizobial surface polysaccharides.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

9:15 **F. Pérez Montaña**, U. de Sevilla, España. La proteína NopJ de *Rhizobium* sp. NGR234 mejora la capacidad simbiótica de *Sinorhizobium fredii* HH103 para nodular soja.

9:30 **S. Pereira**, U. de Aveiro, Portugal. A influência de exposições prolongadas a metais pesados na tolerância e na simbiose entre *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii e o seu hospedeiro.

9:45 **O.A. Ruiz**, IIB-INTECH (CONICET-UNSAM), Chascomús, Argentina. Caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizosfera de *Lotus tenuis*.

10:00 **M. Robledo**, U. de Salamanca, España. Implicación de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii en la infección secundaria de *Trifolium repens*.

10:15 **F. Simões**, INETI, Portugal. Estimulação da nodulação utilizando metabolitos secundários da planta.

10:30 - 11:00 Café

11:00 - 12:00 Sessão III (cont.) / Sesión III (cont.): Exposição de posters / Exposición de posters

Moderadores dos posters / Moderadores paneles:

Nuria Ferrol, EEZ, CSIC, Granada, España.

Javier Ollero, U. de Sevilla, España.

12:00-13:30 Sessão IV / Sesión IV: Fisiologia e Metabolismo / Fisiología y Metabolismo.

Presidentes:

Manuel Becana, EEAD, CSIC, Zaragoza, España.

Cristina Cruz, F. de Ciências, U. de Lisboa, Portugal

12:00 Conferência temática / Conferencia temática:

Anabela Bernardes da Silva, Fac. de Ciências, U. de Lisboa, Portugal. Resposta ao deficit hídrico em *Medicago truncatula* cv. Jemalong, uma leguminosa modelo./Water deficit response in *Medicago truncatula* cv. Jemalong, a model legume.

Comunicações orais / Comunicaciones orales:

12:45 **J. Loscos**, EEAD, CSIC, Zaragoza, España. Efecto del estrés abiótico y del envejecimiento sobre el metabolismo de ascorbato y tioles en nódulos de judía.

13:00 **F. Merchán**, U. de Sevilla, España. Un nuevo receptor kinasa de tipo LRR regula la respuesta de las raíces de *Medicago truncatula* en condiciones de estrés salino.

13:15 **C. Cruz**, Fac. de Ciências, U. de Lisboa, Portugal. A assinatura isotópica do azoto nas bactérias diazotróficas de vida livre.

13:30 - 15:00 almoço / almuerzo.

15:00 Visita a Sintra

4 de Junho / 4 de junio

9:00 - 10:15 Sessão IV (cont.)/ Sesión IV (cont.):

9:00 Conferência temática / Conferencia temática:

Beatriz Ramos Solano. Universidad San Pablo-CEU, Madrid, España. El potencial de la inducción del metabolismo secundario como herramienta biotecnológica para la producción de bioactivos y mejora de los mecanismos de defensa en plantas / Elicitation of secondary metabolism as a biotechnological tool to boost bioactives and defensive metabolism in plants.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

9:45 **M. Reguera**, U. Autónoma de Madrid, España. Glicoproteínas dependientes de boro en el desarrollo de simbiosomas y organogénesis de nódulos. Un modelo para un papel común del boro en el desarrollo vegetal y animal.

10:00 **N.A. Tejera**, U. de Granada, España. Respuestas antioxidantes inducidas por ácido salicílico y NaCl en la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici*.

10:15-11:00 Sessão IV (cont.) / Sesión IV (cont.): Exposição de posters / Exposición de posters

Moderadores dos posters / Moderadores paneles:

Juan José Irigoyen, U. de Navarra, España.

Luis Bolaños Rosa, U. Autónoma de Madrid, España.

11:00 - 11:30 Café

11:30-13:00 Sessão V / Sesión V: Genética e Genómica / Genética y Genómica

Presidentes:

Fernanda Simões, INETI, Portugal.

Nicolas Toro, EEZ, CSIC, Granada, España.

11:30 Conferência temática / Conferencia temática:

José Ignacio Jiménez-Zurdo, EEZ, CSIC, Granada, España. RNAs no codificantes en los endosimbiontes diazotróficos: identificación y caracterización funcional. / Non-coding RNAs in nitrogen-fixing endosymbiotic bacteria: identification and functional characterization"

Comunicações orais / Comunicaciones orales

12:15 **B. Guasch Vidal**, U. de Sevilla, España. Caracterización del mutante Cp9 de *Rhizobium tropici* CIAT899 incapaz de sintetizar factores de nodulación en condiciones de estrés salino y ausencia de apigenina.

12:30 **L. Rey**, U. Politécnica de Madrid, España. Análisis de la relevancia de proteínas de exportación Tat-dependiente en *Rhizobium leguminosarum*.

12:45 **A. Ribeiro**, IICT/DCN, Oeiras, Portugal. Genes de plantas envolvidos em simbioses actinorrízicas.

13:00 - 14:30 almoço / almuerzo.

14:30 - 15:30 Presença nos posters. Sessões IIIb, IV e V / Presencia en los poster. Sesiones IIIb, IV y V

15:30 - 16:45 Sessão V (cont.) / Sesión V (cont.)

15:30 Conferência temática / Conferencia temática:

Hamid Manyani, U. de Sevilla, España. Influencia del estrés abiótico en la interacción entre las plantas y los microorganismos beneficiosos. / Effects of abiotic stress on beneficial plant-microbe interactions.

Comunicações orais / Comunicaciones orales

16:15 **P. Sá-Pereira**, INETI, Portugal. Sistemas de resistência a metais pesados em *Mesorhizobium loti*: o operão arsenato.

16:30 **M.J. Soto**, EEZ, CSIC, Granada. Análisis simbiótico y transcriptómico del operón máster *visNR* del regulón flagelar de *Sinorhizobium meliloti*.

16:45 - 17:15 Café.

17:15 - 18:00 Sessão V / Sesión V: Exposição de posters / Exposición de posters

Moderadores dos posters / Moderadores paneles:

María José Soto, EEZ, CSIC, Granada, España.

Emilio Cervantes, IRNASA, CSIC, Salamanca, España.

18:15 - 19:30 Sessão de Encerramento / Acto de Clausura

18:30 Conferência de Encerramento / Conferencia de Clausura:

Fabio Pedrosa, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Uma visão geral da regulação da fixação de nitrogênio nos diazotrofos associativo *Azospirillum brasilense* e endofítico *Herbaspirillum seropedicae*. / An overview on the regulation of nitrogen fixation by the associative and endophytic diazotrophs *Azospirillum brasilense* and *H. seropedicae*.

21:00 Jantar de encerramento / Cena de clausura

Colaboraões/Colaboraciones

